



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

“ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNE EN UN
MODELO MURINO AL COMPLEJO GST DE
Taenia solium”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A

ISELA CASTRO FUENTES



MEXICO, D.F.



2005

**EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA**

M. 339770



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL


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

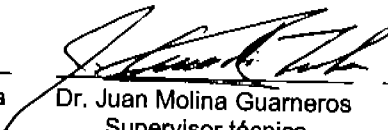
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición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


JURADO ASIGNADO

Presidente: Abel Gutierrez Ramos
Vocal: Mireya Rodriguez Penagos
Secretario: Abraham Landa Piedra
1er suplente: Patricia Elvira Berron Ruíz
2do suplente: Sonla Mayra Perez Tapia

El trabajo de investigación que se presenta fue realizado en el laboratorio de Biología Molecular de *Taenia solium* del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina, UNAM, bajo la asesoría del DR. Abraham Landa Piedra.


Dr. Abraham Landa Piedra
Asesor del tema


Dr. Juan Molina Guarneros
Supervisor técnico


Isela Castro Fuentes
Sustentante

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Isela Castro Fuentes

FECHA: 7-enero-2005

FIRMA: 

DEDICATORIA.

A mis padres, Soledad y José Doroteo por ser lo mas bello que tengo en la vida, por creer en mi y por darme los dos regalos mas hermosos: LA VIDA, que ha estado llena de amor y de momentos maravillosos e inolvidables, y MI CARRERA, en la que hemos compartido desvelos, lágrimas, sonrisas, sacrificios, buenos y malos ratos; pero gracias a Dios hemos llegado a la meta juntos y todos los esfuerzos tienen una recompensa.

Por su confianza, por su paciencia, por la oportunidad, por estar siempre conmigo, por dejarme ser yo, pero sobre todo por ser mis padres y mis amigos. . .
... GRACIAS.

A mis hermanas, Nancy y Gabriela, por ser parte de todo esto y han sufrido algunas consecuencias de mis buenos y malos ratos. Gracias por comprenderme, soportarme, apoyarme y ayudarme siempre, y por ponerle en todo momento a mi vida una chispa muy especial.

A mis tíos (as) y primos (as), porque de todos he recibido detalles únicos y especiales, y siempre han estado conmigo de una u otra manera. A cada uno de ellos, todo mi cariño y agradecimiento.

A Javier, por ser una parte importante de mi vida, por ser una persona única y especial para mi, por seguir siendo mi amigo por sobre todas las cosas, por su comprensión, su confianza y su apoyo en todo momento y por ser simplemente: Javier.

A Ervin, por ser para mí, mi amigo y hermano, por compartir desvelos y noches tristes, por su confianza, su apoyo, solidaridad y por ser una persona con la que puedo contar.

A mis amigos, Leticia, Zyndy, Nancy, Miriam, Erika, Flor, Verónica, Martha, Fátima, Silvia, Carmen, Judith, Norma, Iván, Javier Solls, Cesar y Samuel, por ser para mí eso: mis AMIGOS, sin reservas ni limitaciones; por brindarme siempre sus consejos, su apoyo, su compañía y su sonrisa en los peores y en los mejores momentos, pero en especial por darme algo tan bello y valioso como su amistad.

AGRADECIMIENTOS.

A Abraham Landa Piedra. Gracias por su asesoría a lo largo de este trabajo, por los consejos, el apoyo, la enseñanza, la paciencia, pero sobre todo porque durante todo este tiempo me brindó lo más valioso: su amistad y todo esto en conjunto nos llevó a la culminación de este trabajo.

En especial quiero agradecerle que sea una persona que sin ningún interés transmite todo lo que sabe, no sólo dentro del campo científico sino también como ser humano, y en el que logre reflejar su amor por la Investigación y al mismo tiempo despertar en sus estudiantes el interés por este campo que tiene las cualidades de ser absorbente, desconcertante, impredecible o predecible, pero siempre emocionante.

Al Dr. Juan Molina, a la Dra. Lucía Jiménez García, al Maestro Alejandro Castellano y a la Técnico Académico María Juana García Mondragón. Por su colaboración y ayuda durante y para la realización de este trabajo, además de sus consejos y su paciencia: MIL GRACIAS.

A la Técnico Académica Bióloga Alicia Ochoa Sánchez. Gracias por haberme tenido tanta paciencia conmigo, gracias por sus consejos y su ayuda durante la realización de este trabajo y gracias por haberme brindado su amistad.

Anayetzin, Yarazet, Gabriela, Ricardo, Víctor, Felipe, José, Hugo, Gladis. Gracias por su apoyo, sus consejos, su compañía y en especial por su amistad, y por hacer siempre del laboratorio un espacio lleno de alegría y de convivencia para trabajar.

A Patricia y Marlo. Por la ayuda obtenida en el laboratorio.

A mis profesores, por los conocimientos que a lo largo del tiempo fueron sembrando en mí, y que han sido la base para que siga adelante con mi formación profesional. A todos y cada uno de ellos mi agradecimiento por siempre.

A mi gloriosa Universidad. Por la oportunidad de tener una formación profesional, por seguir creciendo junto con cada uno de los estudiantes que sale de ella y gracias por el gran orgullo de ser universitaria.

A todas las personas que han formado parte de mi vida y que por algún motivo ahora ya no están conmigo: GRACIAS, por que todas y cada una de ellas, ha dejado en mí detalles que me han hecho crecer y madurar como ser humano.

A DIOS, que me ha dado vida, salud y paciencia llegar al día de hoy; además, la dicha de tener una familia maravillosa, de estar rodeada de personas increíbles, y de no conocer la soledad, por que al igual que mis amigos y la gente que me quiere, siempre ha estado conmigo.

Esta tesis fue realizada en el Laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina de la UNAM, bajo la dirección del. Dr. Abraham Landa Piedra. Esta tesis fue apoyada por DGAPA PAPIIT: IN 210603-3.

INDICE GENERAL

	Página
ABREVIATURAS	5
I. RESUMEN	6
II. INTRODUCCIÓN	8
2.1 Antecedentes	8
2.2 <i>Taenia solium</i>	8
2.3 Teniosis y cisticercosis causada por <i>Taenia solium</i>	13
2.3.1 El gusano adulto	13
2.3.2 El cisticerco	13
2.4 Epidemiología	14
2.4.1 Teniosis	14
2.4.2 Cisticercosis humana	15
2.4.3 Cisticercosis porcina	17
2.5 Diagnóstico de la Teniosis	17
2.6 Diagnóstico de la cisticercosis	18
2.6.1 Cisticercosis humana	18
2.6.2 Cisticercosis porcina	19
2.7 Control de la cisticercosis y teniosis causada por <i>T. solium</i>	20
2.8 Tratamiento de la cisticercosis	21
2.8.1 Antihelmínticos	21
2.9 La <i>Taenia taeniaeformis</i>	21
2.9.1 Ciclo de vida	23
2.9.2 Síntomas	23
2.9.3 Diagnóstico	24
2.9.4 Tratamiento y prevención	24
2.10 Respuesta inmunológica	24
2.11 Enzimas detoxificantes como mecanismo de defensa de Helminths	26
2.12 La enzima Glutatión S-Transferasa	27
2.12.1 Generalidades	27
2.12.2 Presencia de la GST en helmintos	29
2.12.3 Las GSTs de helmintos como antígeno	30
III. JUSTIFICACIÓN	32
IV. HIPÓTESIS	33
V. OBJETIVOS	34
VI. MATERIALES Y METODOS	35
6.1 Obtención de cisticercos de <i>Taenia solium</i>	35
6.2 Obtención de extracto crudo	35
6.3 Purificación del CGSTT	35
6.4 Cuantificación de proteínas	36
6.5 Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS	36
6.6 Ensayos de inmunoelectrotransferencia	37
6.7 Producción de anticuerpos	37
6.8 Obtención de huevos de <i>Taenia taeniaeformis</i>	38
6.9 Obtención de oncosferas de <i>Taenia taeniaeformis</i>	39

6.10	Ensayos de vacunación en <i>Taenia taeniaeformis</i> -rata	39
6.11	ELISA indirecto para la cuantificación de IL-2, IL-4, IL-10, TNF α	40
6.12	ELISA indirecto para cuantificar IgG1 e IgG2a antígeno Específicas	41
VII.	RESULTADOS	42
7.1	Purificación del complejo GSTT	42
7.2	Modelo de vacunación: producción de la clisticercosis hepática	43
7.3	Estimación de factores solubles inmunomoduladores (IL-2, IL-4, IL-10, TNF α)	45
7.4	Estimación de la producción de anticuerpos específicos anti-CGSTT	47
VIII.	DISCUSIÓN	49
IX.	CONCLUSIONES	53
X.	ANEXOS	54
	REFERENCIAS	62

TABLA DE ABREVIATURAS

BSA	Albúmina sérica bovina
EOX	Estrés oxidativo
ERO	Especies reactivas de oxígeno
ERN	Especies reactivas de nitrógeno
ECM	Extracto crudo de metacéstodo
Fig.	Figura
GSH	Glutati6n reducido
GST	Glutati6n S-transferasa
CGSTT	Complejo Glutati6n S-transferasa Taenia
IgG1	Inmunoglobulina clase G subclase 1
IgG2a	Inmunoglobulina clase G subclase 2A
IET	Inmunoelctrotransferencia
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-4r	Interleucina 4 recombinante
IL-5	Interleucina 5
IL-10	Interleucina 10
IL-10r	Interleucina 10 recombinante
INF- γ	Interfer6n gama
LCR	Líquido cefalorraquídeo
MCH II	Complejo principal de histocompatibilidad clase II
PBS	Soluci6n amortiguadora de fosfatos
SNC	Sistema nervioso central
TNF α	Factor de necrosis tumoral alfa
TNF γ	Factor de necrosis tumoral gama

LISTA DE ABREVIATURAS

(UNIDADES DE MEDIDA)

10X	Diez veces la concentraci6n
$^{\circ}$ C	Grados centígrados
g	Gramo
kDa	Kilodaltones
L	Litro
M	Molar
μ g	Microgramo
μ m	Micrómetros
mg	Miligramo
mm	Milímetros
Min	Minutos
p/v	Porcentaje en volumen
xg	Fuerza centrífuga relativa
v/v	Volumen a volumen
U	Unidades

I. RESUMEN

La cisticercosis es un problema de salud pública en México. Una de las estrategias que se ha adoptado para su control, ha sido la de la vacunación, por este motivo buscamos evaluar la protección y el tipo de respuesta inmune que produce el complejo de la Glutatión S-transferasa debido a que ha sido utilizado como antígeno en ensayos de protección, ya que su papel principal es la biotransformación de xenobióticos y es la principal enzima destoxicante en helmintos. En el presente trabajo se purificó el complejo Glutatión S-transferasa (CGSTT) del extracto crudo de metacestodo o cisticerco de *Taenia solium*, que fue utilizado como antígeno. Para implementar este modelo de vacunación, primero se realizaron ensayos de infección con huevos y oncosferas de *Taenia taeniaeformis* en ratas wistar macho para determinar la dosis y la muestra biológica a utilizar y obtener una infección lo más parecida al ciclo natural de *Taenia solium* en el cerdo. Con estos ensayos se pudo elegir el mejor vehículo de infección siendo éste el de los huevos de *Taenia taeniaeformis* a una dosis de 10 000 huevos por rata, obteniéndose un promedio de 30 cisticercos por rata, además de facilitar su observación y contabilidad para los estudios estadísticos. Por otro lado se realizaron ensayos de protección con diferentes dosis del CGSTT, dando como resultado que la dosis de 25 µg del CGSTT daba una protección del 90.5% que fue mayor con respecto a las otras dosis empleadas.

Con los sueros obtenidos en estos ensayos se evaluó por medio de la técnica de ELISA indirecto el tipo de respuesta que había generado el CGSTT en las ratas, observándose que no hubo una presencia de las IL-2, TNFα, IL-4 e IL-10 en ninguno de los grupos tratados con las diferentes concentraciones de la proteína, debido a esto se procedió a realizar otra evaluación de los sueros midiendo en este caso los niveles séricos de anticuerpos específicos de IgG1 e IgG2a (utilizando la técnica de ELISA indirecto), encontrando que en los niveles séricos de IgG1 no había una diferencia estadísticamente significativa entre el grupo tratado con saponina y el grupo tratado con el CGSTT. En contraste, en la IgG2a del grupo de saponina y la IgG2a del grupo tratado con el CGSTT son

diferentes estadísticamente y ésta fue del 55% a favor del grupo tratado con el CGSTT.

Estos resultados apuntan hacia una respuesta secundaria del tipo IgG2a y que las interleucinas estudiadas en este proyecto no intervienen en la respuesta inmune contra el parásito, lo cual abre la posibilidad de nuevos estudios que lleven a conocer como es activada la Inmunoglobulina IgG2a y qué tipo de Interleucinas que son activadas por esta inmunoglobulina.

II. INTRODUCCIÓN

2.1 Antecedentes.

Taenia solium es un céstodo parásito del hombre y del cerdo, conocido desde las culturas griega y egipcia. Hipócrates, Aristófanes y Treofrastos los llamaron "gusanos planos" por su parecido con las cintas o listones. Posteriormente, Aristóteles y Aristófanes observaron el estadio larvario en la lengua del cerdo y lo describieron como semejante al granizo; Rumier en 1558 comunicó por primera vez la presencia de este mismo estadio en el hombre (cisticercosis) [84].

La enfermedad no se describió como parasitaria hasta que Malpighi descubrió la naturaleza animal de los cisticercos (1698) y Goeze su condición helmíntica (1784). El nombre de cisticerco fue dado por Laenec que deriva del griego: Kistic= vesícula y cercos= cola y Rudolphi le agregó Cellulosae [84].

Kuchenmeister (1855) y Leuckart (1856) fueron los primeros en investigar su ciclo biológico y ambos demostraron que el gusano vesicular de los tejidos del cerdo era el causante de la teniosis en el hombre, mostrando que la Tenia se desarrolla a partir del cisticerco, para lo cual colocó estos parásitos extraídos de la carne de cerdo en los alimentos de algunos convictos, en quienes posteriormente durante la autopsia se les encontraron Tenias en sus intestinos (teniosis) [84].

Van Beneden en 1853 estableció la relación entre cisticercosis y teniosis. En 1909 Winberg introdujo la prueba de fijación del complemento para diagnosticar la enfermedad en cerdos usando un antígeno de cisticerco [84].

2.2. *Taenia solium*.

Reino: Animalia
Phylum: Platyhelminthes
Clase: Cestoda
Orden: Cyclophyllidea
Familia: Taeniidae
Genero: Taenia
Especie: *solium*

El adulto de *T. solium* es un gusano plano que llega a medir de 2 a 7m. En el extremo anterior presenta una estructura que no es plana llamada escólex,

generalmente cuboide como una cabeza de alfiler (1 mm de diámetro); posee 4 ventosas grandes y un rostelo notable, redondeado, que tiene una corona doble de ganchos: la interna formada por 11 a 14 ganchos largos (de 0.13 a 0.16 mm) y la externa, con igual número de ganchos pequeños (de 0.10 a 0.12 mm) [77].

Después del escólex o cabeza se encuentra una porción que todavía no está segmentada llamada cuello o región cervical, la cual es corta y de sólo la mitad de grosor del escólex. Posteriormente al cuello emplezan los segmentos o proglótidos, formando toda una cadena llamada "cadena estrobilar" o "estrobilo", el cual crece durante toda la vida de la Tenia, mediante una proliferación continua de nuevos segmentos o proglótidos. Las Tenias son hermafroditas, y cada proglótido contiene órganos sexuales femeninos y masculinos [77].

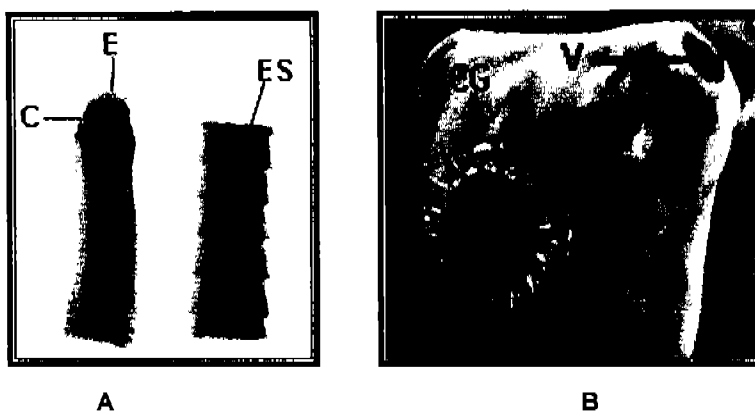


Fig. 1. A) Gusano adulto de *Taenia solium* vista por microscopia de luz: escólex (E) con su cuello (C) y estrobilo (Es). B) Escólex, en donde se puede observar sus ventosas (V) y la corona doble de ganchos (CG) vista por microscopia electrónica. (Tomado de PW. Pappas and Wardrop, 2002 y FAO. Org respectivamente con modificaciones).

Los proglótidos conforme se van alejando del escólex cambian en tamaño y presentan nuevas estructuras de acuerdo a su maduración sexual, por lo que se clasifican de la siguiente manera:

- a) Inmaduros: Son más anchos que largos y aún no contienen estructuras internas bien definidas.

- b) Maduros: Casi cuadrados, se encuentran cerca de la mitad del estróbilo. Cada uno tiene órganos reproductores funcionales tanto femeninos como masculinos.
- c) Grávidos: más largos que anchos, se sitúan en la porción terminal del estróbilo y están llenos de huevos, los cuales se encuentran dentro del útero, estructura que varía en forma y tamaño, y es típica para cada una de las especies de cestodos [77].

El útero se dirige hacia el borde anterior del proglótido. Cuando se encuentra lleno de huevos, se forman extensiones laterales que se ramifican una o dos veces a ambos lados del tronco uterino principal. Los proglótidos grávidos (terminales) llenos de huevos se separan frecuentemente del estróbilo y salen con las heces [77].

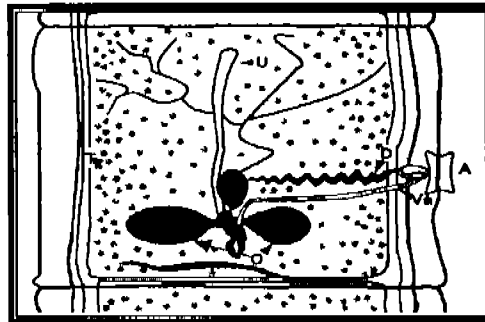


Fig.2 Reproducción esquemática de un proglótido de *Taenia solium* enfatizando el aparato reproductor A) atrio vaginal, D) ducto genital, O) ovario trilobulado, T) testículo, U) útero y V) vagina (tomado de www.geocites.com/lvasquezO/Introduccionfin.htm).

Los huevos escapan del útero a través del poro genital, estos son semi esféricos, de color ámbar a café nogal y miden de 31 a 43 micras de diámetro. Poseen varias envolturas que posibilitan la supervivencia de la oncosfera en el medio. La envoltura más externa a ésta es el vítelo o cápsula, constituida por un grupo de células formando un sincicio. Esta membrana rodea a la oncosfera o embrión hexacanto. La siguiente envoltura es el embrióforo, integrado por pequeños bloques llamados embriofóricos, que están compuestos por una proteína similar a la queratina y se encuentran unidos entre sí por material cementante, susceptible a la digestión enzimática. Esta envoltura, además de ser

la más importante en la protección de la oncosfera, confiere a los huevos su apariencia estriada característica. Finalmente la membrana oncosferal rodea directamente a la oncosfera o embrión hexacanto que posee tres paredes de ganchos [85].

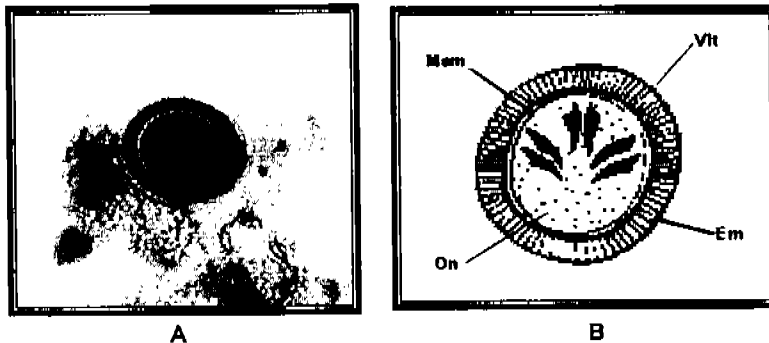


Fig.3 A) Huevo de *Taenia solium* visto mediante microscopía de luz. B) Representación esquemática de huevos de *Taenia*: vitelo o cápsula (vit); embrióforo (Em); membrana celular (mem); oncosfera (On). Tomado de www.cdfound.to.it/HTML/taen1.htm con modificaciones

Los huevos en el medio ambiente pueden permanecer viables inclusive en condiciones extremas de temperatura y de sequedad hasta que son ingeridos por el hombre o el cerdo. En el aparato digestivo descienden hasta llegar al duodeno o yeyuno, en donde por acción de los jugos intestinales su cubierta se rompe y se libera la oncosfera que tiene la capacidad de cruzar la pared intestinal hasta encontrar un vaso sanguíneo o linfático por medio de los cuales puede distribuirse en todo el organismo. La oncosfera al llegar a un tejido se convierte al cabo de 60 a 70 días en su estadio larvario denominado cisticerco [36,35].

Los cisticercos que se localizan en el cerebro humano, muestran dos tipos morfológicos: celuloso y racemoso.

El cisticerco celuloso mide de 0.5 a 2 cm de diámetro; está formado por una vesícula ovalada blanca o amarillenta, con una pared translúcida llena de líquido a través de la cual se puede observar el escólex como un gránulo sólido. Estos cisticercos, frecuentemente están separados del tejido del hospedero por una cápsula fina de colágena, casi siempre se encuentran en los espacios subaracnoideos o se encapsulan dentro del tejido cerebral. Los cisticercos

alojados en los humanos y en los cerdos, presentan características morfológicas similares [6,58].



Fig. 4 A) Cisticerco tipo celuloso y B) Cisticerco evaginando. Tomado de www.cdfound.to.it/HTML/taen1.htm con modificaciones.

En contraste, el cisticerco racemoso tiene una vesícula grande, redondeada o lobulada, circunscrita por una red delicada, o bien, similar a un racimo de uvas [32]. Estas formas parasitarias son muy grandes, pueden llegar a medir de 10 a 20 cm y contener hasta 60 ml de fluido [9,42], una de sus principales características es que carecen de escólex. En apariencia, el cisticerco inicia en algunos casos su desarrollo en el tejido cerebral y el escólex degenera más tarde hasta desaparecer mientras la pared vesicular prosigue su crecimiento y su proliferación hacia el interior del espacio subaracnoideo logrando una configuración racemosa [42]. Se ha demostrado la presencia de formas intermedias entre celulosa y racemosa que son bilobuladas [59, 60, 61], las cuales poseen un escólex claramente visible (como los cisticercos celulosos) y una vesícula muy grande (cisticercos racemosos). Tanto los cisticercos racemosos como las formas intermedias se localizan en las cavidades ventriculares y entre las meninges de las cisternas basales. Es muy posible que cuando los parásitos se localizan en áreas espaciales, tienen la libertad de crecer y de transformarse finalmente en cisticercos de este tipo [79].

El ciclo vital de *T. solium* se cierra cuando el ser humano ingiere carne de cerdo con cisticercos. En el aparato digestivo, el efecto del ácido clorhídrico y sales biliares induce la evaginación de la larva. En el primer tercio del intestino delgado el escólex sale de la vejiga parasitaria y se fija a la pared intestinal

ayudándose de las ventosas y ganchos; convirtiéndose en un gusano maduro al cabo de 5 a 12 semanas en las que empiezan a liberar proglótidos grávidos infectivos que pueden producir nuevos casos de cisticercosis humana y porcina [58].

2.3 Teniosis y cisticercosis causada por *Taenia solium*.

2.3.1 El gusano adulto.

El ser humano es el único hospedero del estadio adulto de este parásito, el cual por uno de sus extremos, vive adherido a la pared del intestino delgado provocando así la enfermedad denominada teniosis. En este sitio, el parásito no produce serios daños de salud ni una sintomatología frecuente y clara, puede causar irritación en el lugar donde se adhiere a la mucosa o bien producir oclusión intestinal, sensación de hambre, indigestión crónica y diarrea persistente o alterada con estreñimiento. Se puede presentar una eosinofilia moderada (más del 13%). Existe una complicación de la teniosis en forma excepcional y sucede cuando un proglótido se introduce en la luz del apéndice, irritando sus paredes y traduciéndose en una apendicitis verminosa [15,18].

2.3.2 El cisticerco.

La presencia de la larva provoca una secuencia típica de reacciones celulares locales (reacción inflamatoria) con la infiltración de neutrófilos, eosinófilos, linfocitos, células plasmáticas y a veces macrófagos, seguida por fibrosis y necrosis de la cápsula, con desintegración o calcificación eventual de la larva. Cuando el parásito se localiza en órganos o tejidos vitales, se producen secuelas agudas y en ocasiones fatales [85].

La ubicación de la larva en el sistema nervioso central (SNC) provoca la neurocisticercosis (NC). Esta enfermedad es un grave problema de salud debido principalmente a la importancia que tiene el sitio de alojamiento del parásito y el hecho de que los pacientes presenten una sintomatología inespecífica. En algunos casos parece que los signos y síntomas del SNC son consecuencia de la invasión

del cerebro por las larvas [33]. Dixon y Smithers [24] señalaron que en aquellos casos de epilepsia en pacientes sin antecedentes familiares de este padecimiento ni historia previa de ataques epilépticos en la infancia debe tenerse en cuenta la posibilidad de una cisticercosis. Ramírez y Verástegul, en 1953 apuntaban la aparición frecuente de crisis epileptiformes en pacientes con cisticercosis [61].

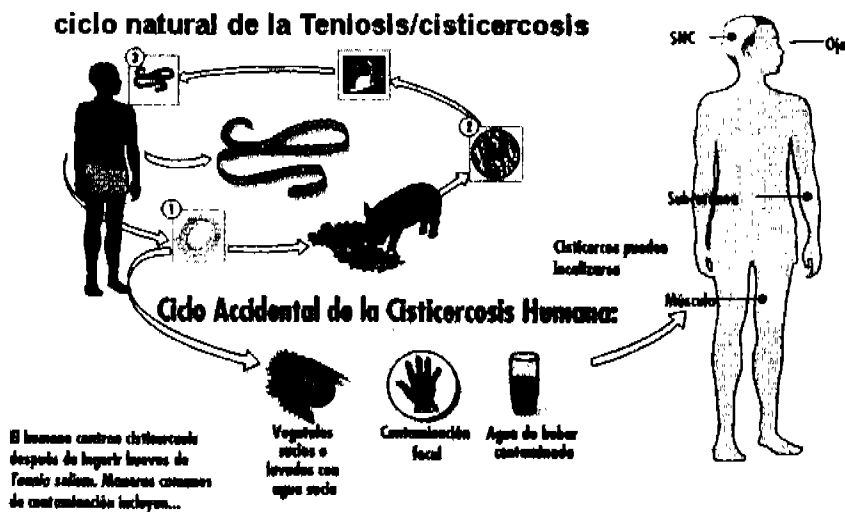


Fig.5.CICLO DE VIDA DE *Taenia solium* (1) El adulto habita en el intestino delgado del humano, liberando huevos en las heces. (2) Infección de cerdos por ingestión de huevos. (3) Infección del humano por ingestión de carne de cerdo con cisticercos (tomado de FAO.org).

2.4 Epidemiología

2.4.1. Tenosis.

La *Taenia solium* es de distribución cosmopolita y un parásito importante del hombre donde quiera que éste consuma carne de cerdo que no haya sido verificada por las autoridades de salud. Es común en pueblos eslavos (checos, croatas, serbios, etc.), en el norte de China, Pakistán, la India y los países Latinoamericanos, inclusive se ha llegado a considerar en ciertas poblaciones como parte de su cultura (Fig.7). En México la tenosis representan tanto un problema de salud pública como económico [2, 44, 74].

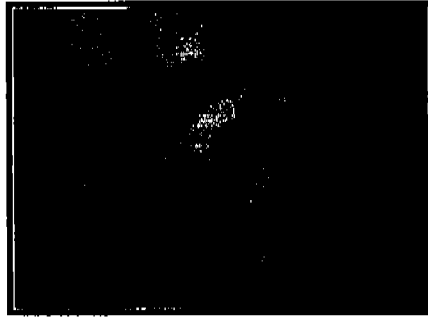


Fig. 6 Cisticercosis parenquimatosa en diversos estadios evolutivos (quistes vesiculares (flecha recta), quistes coloidales (flecha curva), granulomas (cabeza de flecha) y calcificaciones (flecha abierta). (Tomado de mneumonica.org/docs/patologia/Neurocisticercosis.doc).

El conocimiento de la prevalencia de esta parasitosis es incierto, ya que los métodos de diagnóstico generalmente son por antecedentes de expulsión del parásito en el cual alrededor del 95% es *Taenia saginata*; exámenes coproparasitológicos detectan del 50 al 78% de *Taenia sp*; el raspado perianal que detecta del 75 al 85% de *Taenia saginata* [29].

A pesar de que los estudios epidemiológicos no han sido sistemáticos, los datos disponibles en publicaciones científicas indican que la frecuencia de teniosis en nuestro país en las últimas décadas varía entre el 0.2 al 3.4% [66] y los datos de las autoridades de salud notifican un promedio anual de 13000 casos entre 1986 y 1990, mientras que a partir de 1991 dicho promedio se ha sostenido en 8000 casos en promedio [71,65]

2.4.2. Cisticercosis humana.

Muchos autores coinciden en la dificultad para establecer el diagnóstico debido a la gran variedad con que se presentan las manifestaciones. Las estadísticas oficiales disponibles reportan 500 casos anuales como promedio, variando la seroprevalencia positiva entre el 0.1 al 12% dependiendo de la región estudiada y la técnica de diagnóstico empleada [68].

La frecuencia de cisticercosis humana se obtiene principalmente de necropsias. En México el análisis de múltiples autopsias proporciona una frecuencia de NCC cercana al 2% [70], mientras que en el reporte de estudios clínicos muestra que alrededor del 10% de los enfermos que asisten a unidades

de neurología tienen NCC y los estudios de seroprevalencia reportan que hasta el 12% de la población mexicana tiene anticuerpos anti-cisticerco [74]. En México se han realizado tres censos seroepidemiológicos: En el primero se detectaron anticuerpos anti-cisticerco en el 1% de las muestras obtenidas en Chiapas [29], en el segundo, el 3.2% de muestras de Oaxaca [34] y en el tercero, el 1% global de 18 417 muestras obtenidas en todo el país [67]. En este último estudio se encontraron áreas con diferencias significativas en la frecuencia de anticuerpos anti-cisticerco. El área que incluye "El Bajío" tuvo una frecuencia más alta, esto llama la atención debido a que es la principal área porcicultora del país [44,47], con la mayor prevalencia de cisticercosis porcina [5,63].

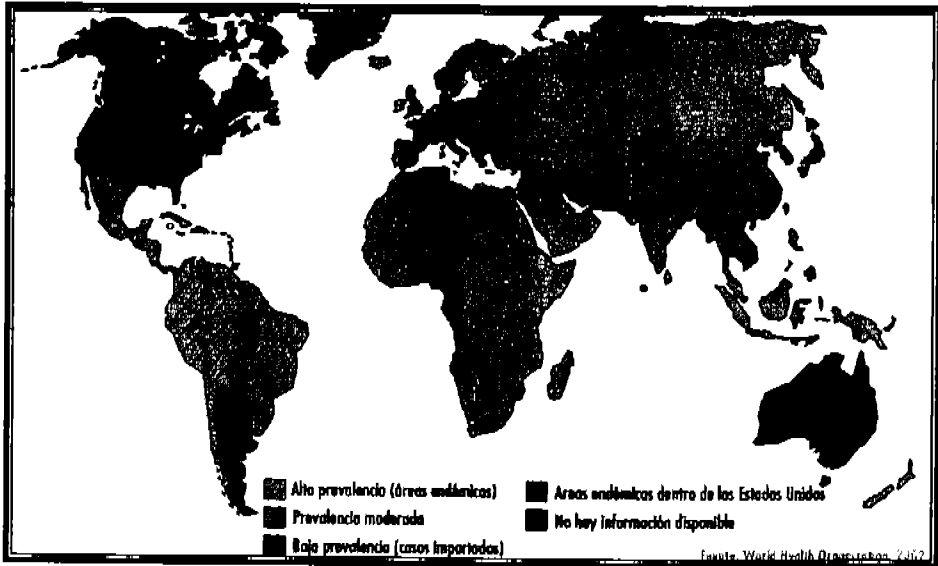


Fig.7. Distribución mundial de *Taenia solium* (tomado de FAO.org)

La forma de cisticercosis más grave es aquella en la que el cisticerco se desarrolla en el SNC, lo que dependiendo de la localización, número, estado y tipo de parásito puede ser asintomático ó causar graves trastornos incluyendo la muerte [21,79]. La neurocisticercosis es la principal causa de epilepsia tardía en nuestro país con un 50% de frecuencia [51].

2.4.3 Cisticercosis porcina.

La cisticercosis porcina es importante, deben tomarse en cuenta los métodos de crianza de los cerdos, ya que la práctica de alimentarlos con heces humanas, lejos de ser insólita o accidental, es común en las regiones rurales de los países afectados por teniosis/cisticercosis y sus principales causas se encuentran en las condiciones económicas de los habitantes [5].

En la actualidad no se utilizan métodos de diagnóstico de la cisticercosis porcina antemorten, debido a esto, la frecuencia de estas parasitosis se obtienen en los rastros. En México, las cifras oficiales indicaron que durante 1980-81 el promedio de cisticercosis porcina fue de 1.5%. Sin embargo, estos datos pueden no reflejar la prevalencia real de la cisticercosis en México, ya que no todos los cerdos llegan a los rastros oficiales y además, no se realiza la inspección en todos ellos [5].

2.5 Diagnóstico de la teniosis.

La teniosis es difícil de detectar ya que no produce daño en la mucosa intestinal. Para su diagnóstico se emplean las técnicas de coproparasitoscópicas, para la observación de los huevos y proglótidos de *Taenia*, este diagnóstico no identifica el género (*Taenia sp.*) ya que los huevos de *Taenia saginata*, y de *Taenia solium* son morfológicamente idénticos [85]. El ELISA (Enzyme linked Immunosorbent Assay) se ha utilizado para la detección de teniosis detectando coproantígenos, y aunque no puede distinguir entre *Taenia saginata* y *Taenia solium*, es una técnica muy eficiente que ha diagnosticado casos que fueron negativos en la historia clínica [4]. También se están desarrollando nuevas variantes diagnósticas; entre ellas, se encuentran los anticuerpos monoclonales dirigidos a detectar antígenos específicos que pueden diferenciar entre *Taenia solium* y *Taenia saginata*. Se han obtenido secuencias repetidas específicas de ADN para emplearlas en el diagnóstico por hibridación y se ha iniciado el estudio de anticuerpos locales y sistemáticos en la teniosis, los que quizá también podrían ser utilizados para el diagnóstico. Estas pruebas diagnósticas aún están en etapa experimental y no se encuentran en el mercado [31].

2.6 Diagnóstico de la cisticercosis.

2.6.1. Cisticercosis humana.

Para efecto del diagnóstico, la cisticercosis se puede clasificar en: 1) cisticercosis fuera del sistema nervioso central y 2) cisticercosis en el sistema nervioso central o neurocisticercosis [58,57].

A) Cisticercosis fuera del sistema nervioso.

1. La **cisticercosis ocular** se revela por problemas visuales y es diagnosticada fácilmente al ver al parásito en el ojo [61].
2. La **cisticercosis subcutánea**, se sospecha por medio de la palpación de nódulos bajo la piel, y el diagnóstico definitivo se puede obtener fácilmente por extracción quirúrgica y observación de la larva bajo el microscopio [85].
3. La **cisticercosis muscular** puede presentarse con dolor muscular y en algunos casos hipertrofia de los músculos afectados. Estudios de imágenes pueden revelar larvas en los músculos. Si las larvas se han calcificado, los rayos X pueden revelar su presencia [9,28].

B) Cisticercosis dentro del sistema nervioso.

Debido al pleomorfismo clínico con que puede presentarse, el diagnóstico de la NCC continúa siendo un reto para la medicina moderna. En general se acepta que el diagnóstico definitivo de NCC debe basarse en la combinación de diversos estudios incluyendo [85]:

- a) **Inmunoelctrotransferencia (IET)**. Es una técnica que ha permitido eliminar el problema de las reacciones cruzadas por el empleo de antígenos glicoproteicos específicos purificados por afinidad a la lectina *Lens culinaris* (GPs). Las GPs son separadas por electroforesis en geles de poliacrilamida y transferidas a membranas de nitrocelulosa. Posteriormente, sobre éstas, se lleva a cabo un ensayo Inmunoenzimático en el cual se emplea suero o líquido cefalorraquídeo (LCR) del paciente y se revelan de 1 a 7 antígenos glicoproteicos específicos denominados por su peso molecular (GP50, GP39-42,

GP24, GP21, GP18, GP14 y GP13). la sensibilidad de éste método es 98% [28,73]. Las desventajas que presenta son la complejidad para realizarla, ya que para dicho fin se requiere de personal capacitado y su costo es elevado.

- b) **ELISA (Eszyme Linked Immunosorbent Assay)**. Esta técnica se basa en la captura de anticuerpos mediante un antígeno previamente adsorbido a una fase sólida [26,22]. Es un método con alta sensibilidad y con el que es posible detectar los anticuerpos tanto en suero como en LCR, la desventaja que se presenta por emplear extractos crudos o fracciones semipuras de cisticercos son las reacciones cruzadas [23,27].
- c) **Tomografía computarizada (TC) y resonancia magnética (RM)**. Cuando afecta al SNC las manifestaciones dependen del número, localización y estado evolutivo del parásito; las más comunes son epilepsia de inicio tardío y cefalea. Su localización más común es la subaracnoidea, seguida de la parenquimatosa, por lo cual esta técnica es utilizada como apoyo para el diagnóstico [69]. La RM es utilizada con mayor frecuencia en la práctica clínica, debido a que es más sensible que la TC para diagnóstico de neurocisticercosis activa. Lamentablemente estas técnicas que son las mejores, no están al alcance de la mayor parte de la población enferma [16].

2.6.2 Cisticercosis porcina.

En este hospedero intermediario el parásito se puede detectar de la siguiente manera.

- a. **En pie!**. En los cerdos vivos, el diagnóstico se realiza tratando de palpar los cisticercos en la lengua, así como buscando nódulos superficiales.
- b. **Durante las inspecciones sanitarias en los rastros**. Consiste en realizar dos cortes en la canal del cerdo, uno en el músculo anconio y otro en el tríceps para encontrar a las larvas. En México, las canales de cerdo infectadas se separan según el número de cisticercos encontrados. Cuando hay más de 2 a 4 parásitos, la carne se incinera,

salvando la piel del animal; pero si el número es menor, ésta se utiliza para preparar carmitas, platillo típico en el cual la carne se somete a un proceso prolongado de cocción llamado fritura que no siempre mata al parásito [2].

2.7 Control de la cisticercosis y teniosis causada por *T. solium*.

Si cortáramos el ciclo de vida del parásito en cualquiera de sus etapas, nos daría la posibilidad de disminuir la incidencia de ambas enfermedades parasitarias [54].

Algunas de las posibilidades, es la de matar al parásito una vez que éste se ha establecido en sus hospederos o evitar el establecimiento del parásito en ellos. Para evitar que el parásito se establezca en los hospederos, se utiliza la prevención y ésta puede lograrse mediante el uso de buenas prácticas sanitarias, mejorando la crianza de cerdos o con la administración de vacunas o fármacos, para evitar que se establezca en los hospederos [31,46,56].

Otras alternativas efectivas con las que se cuenta son las campañas educativas, que se enfocan en la difusión y conocimiento del ciclo de vida del parásito, hábitos de higiene, identificación de la carne infectada, evitar el fecalismo al aire libre [64]. Los factores socioeconómicos y culturales han influenciado para que este tipo de campañas no tengan aún el impacto esperado en la población.

Otra alternativa que se ha propuesto ya que existen fármacos antihelmínticos muy efectivos, es la de dar un tratamiento masivo con estos fármacos para la erradicación del gusano adulto de los portadores (humanos) con administración de una dosis única de prazicuantel o niclosamida. Sin embargo, en estudios previos no obtuvieron muy buenos resultados debido a fallas en su aplicación, observándose una disminución de la incidencia de la cisticercosis en el primer año pero un incremento del doble de la parasitosis al año después de haber suministrado el fármaco, lo que sugiere que no se erradicó completamente al gusano de todos los portadores [66].

2.8 Tratamiento de la cisticercosis.

2.8.1 Antihelmínticos.

Los antihelmínticos son fármacos que destruyen o expulsan a los helmintos del tubo digestivo y de órganos y tejidos. Para el tratamiento de la cisticercosis y la tenosis se utilizan fármacos sintéticos. La droga de elección para la tenosis es la niclosamida, que actúa directamente sobre los proglótidos, haciéndolos susceptibles a la acción de las enzimas proteolíticas del hospedero. No tiene acción contra los huevos ni contra los cisticercos. Esta droga no se encuentra en el mercado mexicano [85].

El prazicuantel es el segundo fármaco de elección, ejerce dos efectos importantes en helmintos, a las concentraciones mínimas eficaces, intensifica la actividad muscular seguida de contracciones y parálisis espástica. Los céstodos se separan de los tejidos del hospedero, es bien tolerada por los humanos, tiene una toxicidad baja y mínimos efectos secundarios. Por último, cabe señalar que el prazicuantel es el tratamiento de elección recomendado por la OMS a una dosis única de 10 mg a 20 mg por kg de peso [55].

El albendazol es el tercer fármaco de elección, sobre todo en menores de 5 años de edad. Es bien tolerado por los humanos y produce efectos secundarios mínimos en ellos. La ventaja de este medicamento es que no sólo actúa contra la *Taenia sp*, si no también contra la mayor parte de otros helmintos y nemátodos frecuentes y puede llegar a zonas del cerebro donde prazicuantel no llega. Su desventaja es que debe de administrarse durante un mes a dosis de 15mg/kg/día [82].

2.9 La *Taenia taeniaeformis*

Nombre común: La solitaria de gato

Reino: Animalia

Phylum: Platyhelminthes

Clase: Cestoda

Orden: Cyclophyllidea

Familia: Taeniidae

Genero: *Taenia*

Especie: *taeniaeformis*

La *Taenia taeniaeformis* en gatos mide de 15 a 60 centímetros de longitud. Si varios parásitos están presentes, son generalmente más pequeños (Fig.8). La cabeza se arma con un anillo doble grande de 26 a 52 ganchos claramente visibles. Los ganchos miden de 315-485 μm de largo y por lo tanto distinguen a la *T. taeniaeformis* del resto de las especies de *Taenia*. Esta solitaria tiene un cuello muy corto, casi invisible. Los primeros proglótidos son muy cortos, miden de 8 a 10 mm de largo, los siguientes proglótidos tienen una forma característica de reloj y miden de 5 a 6 mm de ancho teniendo de 16 a 18 ramas laterales [87].

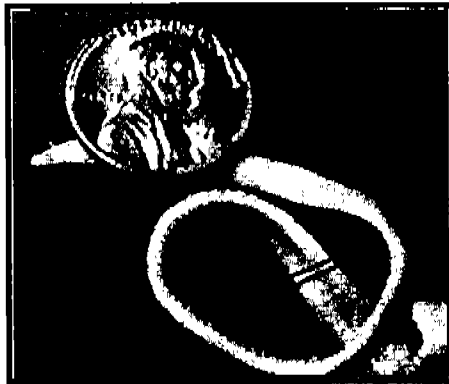


Fig. 8 Fotografía de gusano adulto de *Taenia taeniaeformis* (tomado de 86)

Los gatos pueden abrigar las solitarias (adultos) por varios años. Los estudios del predominio han establecido que es la especie más común de la solitaria de los gatos domésticos que viven al aire libre y de gatos perdidos. Estos se depositan en la vejiga del gato, en gatos salvajes muertos se han encontrado hasta 30 parásitos en un sólo animal. En los gatos caseros que no cazan su presa, la solitaria felina no ocurre puesto que la infección es transmitida solamente por carnivorismo. Un gato infectado elimina cerca de cuatro proglótidos maduros diariamente. Los proglótidos contienen de uno a dos mil huevos en promedio. Los proglótidos se desintegran y los huevos son expuestos al medio ambiente siendo viables por meses [87].

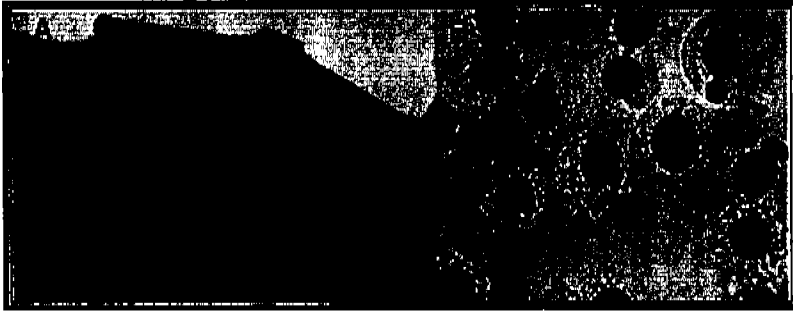


Fig. 9 A) Proglótido de *Taenia taeniaeformis* B) Huevos de *Taenia taeniaeformis* visto por microscopio de luz (tomados de 87).

2.9.1 Ciclo de vida

El frente del gusano de la vejiga tiene 4 a 5 milímetros de ancho y tiene un bolsillo en el cual el escólex está invaginado [86]. La extremidad termina en una ampolla como del tamaño de un guisante. La longitud completa del gusano de la vejiga varía entre 3 y 20 centímetros. En el hígado de ratas o de ratones este gusano se enrolla cuidadosamente en forma de un quiste y se llama estrobilocercos. Cuando un gato ingiere al anfitrión intermedio (rata o ratón) infectado, se digiere en la vejiga, pero no el escólex del estrobilocercos, de esta forma el escólex se une al intestino y produce nuevos proglótidos. Después de un período de 34-80 días, la tenia o solitaria se convierte en una forma madura que puede vivir por 6 meses a 3 años. Los gatos desarrollan poca inmunidad contra solitarias felinas y por lo tanto siguen siendo susceptibles a la reinfección [87]. En ratas la presencia del estrobilocercos tiene un efecto muy negativo en fertilidad en machos y hembras [86].

2.9.2 Síntomas

Las solitarias felinas se unen con sus ganchos a la membrana mucosa causando daño local en el intestino y reacciones inflamatorias provocando síntomas apenas susceptibles. Cuando el gato sufre una infección masiva éste pierde su apetito e incluso rechaza el alimento. Un breve episodio de diarrea es seguido por el estreñimiento y el animal desarrolla un abdomen apretado y contraído. El gato no puede moverse y no parece oír o ver cualquier cosa [87].

2.9.3 Diagnóstico

Los gatos que comen un gran número de ratones o ratas se infectan a menudo con *T. taeniaeformis*. De vez en cuando, una infección sospechosa se puede confirmar por la detección de proglótidos. Pueden estar en las heces o ser vistos alrededor del ano o aún estar pegados en la cola del gato. La observación microscópica de las heces puede revelar los huevos típicos de la tenia. La autopsia puede poner de manifiesto a los gusanos del adulto o a los proglótidos de éstos en el intestino delgado. Con la migración post mortem pueden incluso estar en el estómago [86].

2.9.4 Tratamiento y prevención

El tratamiento con un antihelmíntico potente, tal como prazicuantel (5 mg/kg oral), es adecuado, pero no prevendrá obviamente la reinfección; es decir las solitarias nuevas del adulto pueden estar presentes después de 6 a 7 semanas. La administración repetida de benzimidazoles, tales como mebendazol, fenbendazol y flubendazol, puede también ser eficaz contra solitarias felinas. Para evitar la infección, los gatos deben de no comer ratones o ratas. La única alternativa es guardar a los animales dentro de la casa todo el tiempo [86].

2.10 Respuesta inmunológica

La respuesta inmune en contra de la cisticercosis tiene componentes tanto de la respuesta celular como de la humoral, ya que encontramos una participación activa de células T cooperadoras CD4⁺, designadas Th1 y Th2 de acuerdo con el patrón de citocina que producen [13]. La participación de los linfocitos Th1 y Th2 en la cisticercosis ha sido estudiada en modelos experimentales de ratón y en pacientes humanos; en ambos casos los resultados sugieren que en los individuos con cisticercosis crónica, la respuesta inmune celular está polarizada hacia el fenotipo Th2. En tanto que en los individuos en donde los parásitos son destruidos, o su desarrollo está limitado, la respuesta inmune se encontró polarizada hacia un fenotipo Th1 [39].

La fase de activación de los linfocitos T nativos de CD4⁺ o Th (del inglés "helper"), está dada por el reconocimiento de determinantes antigénicos presentados en el contexto de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad de la clase II (MHC-II), expresada sobre células presentadoras de antígeno profesionales, como células dendríticas, linfocitos B y macrófagos [80]. Últimamente se han hecho avances muy importantes en el conocimiento de la respuesta inmune contra parásitos. Una de las observaciones clave para el control o el favorecimiento de las parasitosis es la polarización de la respuesta inmune de los linfocitos T CD4⁺ en Th1 o Th2 (Fig. 10). Los linfocitos Th1 secretan Interferón γ (INF- γ), Interleucina 2 (IL-2) y factor de necrosis tumoral α (TNF- α). Estas citocinas participan en la activación de macrófagos y de la hipersensibilidad retardada. Por su parte, los linfocitos Th2 producen IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, cooperando con la respuesta inmune humoral a través de la proliferación de linfocitos B y del cambio de isotipo de los anticuerpos para la producción de Inmunoglobulina E (IgE) e IgG1 (en ratón) o IgG4 (en humanos), y promoviendo la diferenciación de eosinófilos y mastocitos. Debido a estas funciones, el Fenotipo Th2 se ha asociado con alergias. Existe otra subpoblación de linfocitos T CD4⁺ que produce una mezcla de citocinas Th1/Th2 a la cual se le ha denominado Th0 [1,17]. Además, existen datos de estudios realizados con céstodos murinos que indican que la respuesta Th1 se asocia al efecto protector contra el cisticerco, mientras que la respuesta Th2 permite al parásito su desarrollo y reproducción [40,77]. En el modelo de cisticercosis por *Taenia taeniaeformis* se observó que la destrucción del estadio oncosfera del parásito, que previene el desarrollo del cisticerco, está mediada principalmente por anticuerpos del subtipo IgG2a y complemento [38,45].

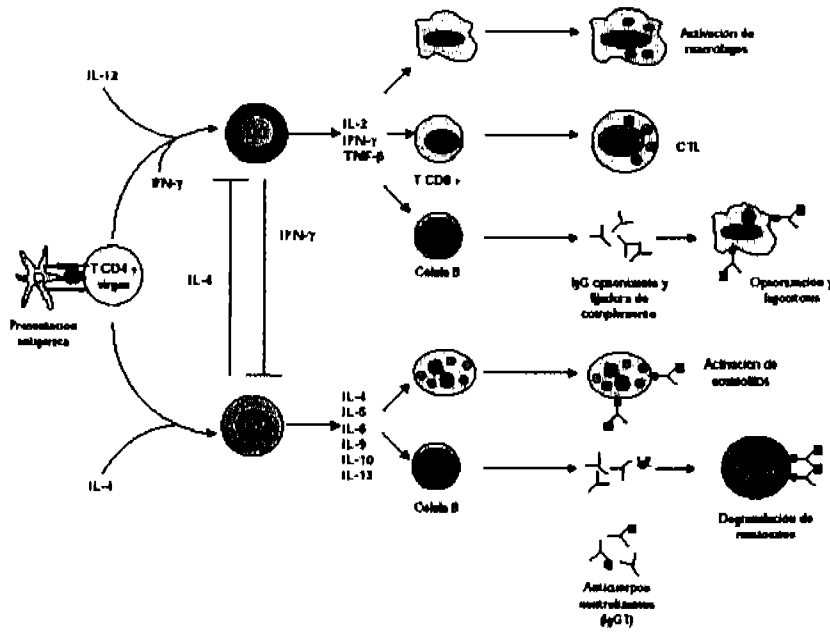


Fig. 10 Funciones efectoras de las subpoblaciones T CD4⁺ (Th1 y Th2). Tomado de Terrazas et al. 1998.

2.11 Enzimas detoxificantes como mecanismo de defensa de helmintos.

Como se sabe, varios helmintos permanecen en su hospedero por un tiempo indefinido, lo cual logran gracias a la capacidad que tienen de evadir los mecanismos de defensa que contra él, monta el hospedero. Uno de estos mecanismos es la utilización de enzimas antioxidantes que le permiten inactivar los radicales de oxígeno y otras moléculas tóxicas producidos por los leucocitos [12].

Como respuesta a la presencia de agentes extraños, células del proceso inflamatorio llevan a cabo un fenómeno llamado estrés oxidativo (Eox), el cual implica la producción y excreción de sustancias tóxicas como las especies reactivas de oxígeno (ERO) primarias, como el ión superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el ión hidroxilo (HO^\cdot) [39]. Estas ERO son capaces de causar daño a lípidos de membranas, proteínas y ácidos nucleicos. Los ERO primarios al

reaccionar con moléculas producen otros ERO tales como los hidroperóxidos lipídicos y carbonilos citotóxicos, ambas entidades químicas pueden tener efectos adversos más agresivos, que los causados por sus precursores, sobre las moléculas mencionadas anteriormente [13].

Por otro lado, los hospederos poseen la contradefensa enzimática y no enzimática para inactivarlos. Las enzimas antioxidantes de helmintos involucradas en la protección del parásito son la superóxido dismutasa (SODs) una familia de metaloenzimas las cuales catalizan la dismutación del superóxido ($O_2^{\cdot-}$) a H_2O_2 y O_2 ; las catalasas (CAT), las glutatión peroxidases (GPX) y las Peroxiredoxinas (Prx) con actividad catalítica para descomponer H_2O_2 y producir H_2O y O_2 . También las GPXs, las Glutatión S-transferasas (GSTs) y las Prx son capaces de reducir hidroperóxidos lipídicos formando la segunda línea de defensa en los organismos. Una tercera línea de defensa se ha observado en los helmintos con enzimas como las GSTs, las Glutatión y aldehído reductasas que inactivan carbonilos citotóxicos [14].

2.12 La enzima Glutatión S-transferasa

2.12.1 Generalidades

La Glutatión S-transferasa fue identificada en 1961 (GSTs; EC 2.5.1.18) y son una superfamilia de enzimas multifuncionales dimericas que conjugan el azufre de la cisteína del Glutatión reducido (GSH: γ -glutamil-cisteinil-glicina) a centros electrofílicos de compuestos orgánicos, hidrofóbicos, que pueden ser proveídos por un átomo de carbón, nitrógeno o azufre. Estos conjugados se hacen más solubles, facilitándose su eliminación de las células [75,76].

La reacción general que cataliza esta enzima es la siguiente:



Esta reacción es una de las primeras etapas de la vía del ácido mercaptúrico, en la cual los xenobióticos hidrofóbicos (sustancias químicas que no

tienen utilidad metabólica y que pueden ser tóxicos) son inactivados y eliminados del organismo [37]. Las GSTs son consideradas vitales para el metabolismo efectivo de detoxificación de xenobióticos electrofílicos en una gran variedad de organismos [38]. Además, estas enzimas pueden detoxificar compuestos tóxicos producidos endógenamente, incluyendo los productos secundarios de la peroxidación de lípidos [43].

La enzima realiza 4 tipos de reacción catalíticas con sus sustratos llamadas 1) adiciones reversibles tipo Michael de cetonas y aldehídos α,β insaturados, 2) isomerización, 3) sustitución nucleofílica aromática y 4) apertura de anillos epóxidos. El 1-cloro-2,4-dinitrobenceno (CDNB) es considerado el sustrato universal de las GSTs [43]. La enzima liga con alta afinidad a esteroides, bilirrubina, grupo hemo, carcinógenos, hidrocarburos aromáticos policíclicos, dexametasona y numerosos aniones orgánicos [50].

Las GSTs citosólicas se clasifican en ocho principales clases ($\alpha, \mu, \theta, \pi, \sigma, \omega, \kappa, \psi$). Una nomenclatura estandarizada para GSTs de mamíferos se propuso en 1992 [50] y se fue extendiendo para incluir otras especies en 1995 [49]. Esta nomenclatura identifica a cada GST, primero se denota con la primera letra de la especie usando minúsculas "GST" (h para el humano, r para la rata, m para el ratón, etc.), seguido por la letra en mayúscula de la clase (A, M, P, T, Z, etc), entonces un número árabe que denota la subfamilia (1, 2, 3...), y en algunos casos, una letra minúscula que denota variantes alélicas del mismo gen (a, b, c...), denotando los genes con cursivas [20].

Estas enzimas existen como proteínas dimericas formando homodímeros o heterodímeros que poseen subunidades con masa aproximadamente de 25 kDa por cada monómero. La superfamilia de las GSTs tiene distintas formas con diferente peso molecular y dentro de ellas pueden existir isoformas, las cuales poseen el mismo peso molecular, pero presentan diferencias en su estructura primaria y como consecuencia, diferencias en su estructura secundaria y terciaria, influyendo esto en sus características metabólicas, por lo que pueden existir isoformas con diferentes habilidades para metabolizar un sustrato en particular y con localizaciones específicas [50].

En los mamíferos las familias de las GSTs se encuentran codificadas en diferentes genes, las alfa se encuentra en el cromosoma 6, las mu en el cromosoma 1, las theta en el cromosoma 22, las pi en el cromosoma 11, las zeta en el cromosoma 14, las sigma en el cromosoma 4, las kappa (aun no se ha encontrado su localización) y las omega en el cromosoma 10 [62].

2.12.2 Presencia de la GST en helmintos.

La actividad enzimática de GST ha sido descrita en extractos crudos de adultos y larvas de varios helmintos como céstodos (*Dipylidium caninum*, *Ligula intestinalis*); tremátodos (*Schistosoma intescalatum*, *Schistosoma margrebowiei*,) y nemátodos (*Ascaris lumbricoides*, *Toxocara canis*, *Trichostrongylus colubriformis*, *Nippostrongylus brasiliensis*, *Cooperia onchopora*, *Brugia pahangi*, *Onchocerca gutturosa*) [12,41,57]. Se han purificado por cromatografía de afinidad varias formas de la enzima GST de pesos moleculares que van desde los 23 a los 28.5 kDa. Además, se han purificado varias isoformas de la enzima en una misma especie de parásito, por ejemplo en los céstodos como *Moniezia expansa* que presenta cuatro formas [11], mientras que *Schistocephalus solidus* presenta siete isoformas [10].

En nemátodos tenemos ejemplos como el de *Dirofilaria immitis*, la cual presenta una forma microsomal y otra citosólica [42], el adulto de *Heligmosomoides polygyrus* presenta dos formas microsomales y cuatro isoformas citosólicas [14].

Dentro de los tremátodos, cuatro especies del género *Schistosoma* (*bovis*, *haematobium*, *japonicum* y *mansonii*) presentan dos formas, una de 26 y otra de 28 kDa y cada una de estas formas presenta isoformas [73].

La localización de la enzima GST en helmintos ha sido detectada en el parénquima, en la hipodermis, en las paredes del receptáculo seminal y de espermatozoides, asociadas al epitelio intestinal y se sugiere que la expresión de las isoformas de GST es tejido específicos [19].

Hay evidencia suficiente acerca de la distribución de la enzima GST en diferentes estructuras del parásito, su alta concentración y presencia en la

interfase hospedero-parásito y el hecho de que se está secretando, indican que esta enzima juega un papel importante en el metabolismo de los parásitos sobre compuestos tóxicos producidos endógenamente por el parásito o de origen exógeno producidos o ingeridos por el hospedero.

Para las GSTs de helmintos no hay una clasificación establecida, por lo que cuando se caracteriza bioquímicamente o genéticamente una forma de clasificarlas comúnmente es asignarle una clase de GSTs de mamíferos. Sin embargo, las características de las GSTs de helmintos no permite, en ocasiones, incluirla dentro de las ocho principales clases citosólicas establecidas (α , μ , θ , π , σ , ω , κ , ψ), por ejemplo las cuatro formas principales de GSTs descritas para *Moniezia expansa* no muestran una clara relación bioquímica con ninguna de las clases mencionadas, sin embargo la secuencia amino terminal, las ubica entre las clases μ y α [11]. En *T. solium* se ha purificado dos GSTs que tienen relación con las clases α y μ , clasificadas como se menciona anteriormente [54].

2.12.3 Las GSTs de helmintos como antígenos.

La función de detoxificación que realiza la GST y su abundancia, así como la carencia en céstodos de las enzimas como catalasa, glutatión peroxidasa y citocromo P450, la hacen importante para la supervivencia de éstos. Esta es la razón por la que varias GSTs de helmintos han sido empleadas como antígenos en ensayos de vacunación donde las protecciones alcanzadas van desde el 0% hasta el 89%, incluyendo las GSTs de *T. solium* donde se alcanzaron hasta el 82% [53].

La importancia de la enzima y la factibilidad de usarla como antígeno protector fue puesto de manifiesto en un experimento en el cual se obtuvieron ratones transgénicos que expresaban la GST de 28 kDa de *S. mansoni*. Si estos ratones transgénicos eran infectados con el parásito la carga parasitaria se incrementaba significativamente respecto a los ratones no transgénicos. En contraste, los niveles de IgGs anti GST de 28 kDa de *S. mansoni* en los animales transgénicos eran significativamente más bajos que en los no transgénicos, encontrándose los mismos resultados cuando el experimento fue repetido con

ratones previamente inmunizados con la GST de 28 kDa de *S. mansoni* [54]. Esto argumenta a favor de que la enzima GST tenga un papel importante en la viabilidad del parásito [78]. Por otro lado, ratas inmunizadas intradérmicamente con un plásmido conteniendo ADN que codifica para la GST de 28 kDa de *S. mansoni* produjeron IgG_{2a} e IgG_{2b} en su suero. El perfil inmunológico fue de tipo Th1, además de que el suero de estas ratas indujo una respuesta celular citotóxica dependiente de anticuerpos *in vitro* [25].

III. JUSTIFICACIÓN.

La cisticercosis es un serio problema de salud no sólo en el tercer mundo, sino también empieza a serlo en los países desarrollados. Se han adoptado varias medidas para su erradicación, siendo la más avanzada la de vacunación. Para ello, se ha utilizado para proteger a los cerdos, desde extractos crudos hasta péptidos recombinantes generando buenos niveles de protección. Cabe mencionar que los antígenos mencionados han sido previamente estudiados en modelos de cisticercosis murinos.

Por otro lado, la GST es una enzima de la fase II de detoxificación en los organismos y la principal enzima detoxificante en helmintos. Esta enzima realiza la conjugación de Glutatión a genoblóticos de naturaleza electrofílica, inactivando y eliminando sustancias tóxicas como los hidroperóxidos lipídicos y carbonilos reactivos producidos por el metabolismo oxidativo propio del parásito y del hospedero. Estos compuestos destruyen proteínas, DNA y lípidos, generando mutaciones en el genoma y muerte del parásito. Es ya conocido que la GST es un buen candidato para formar parte de una vacuna en contra de varios helmintos como *Schistosoma mansoni*, *S. japonicum*.

IV. HIPÓTESIS.

La vacunación con el CGST en rata generará una respuesta inmune protectora del tipo celular o humoral en contra de la infección causada por *Taenia taeniaeformis*.

V. OBJETIVOS

5.1. OBJETIVO GENERAL.

Evaluar la protección y el tipo de respuesta inmune que produce el complejo de GSTT en la rata.

5.2. OBJETIVOS PARTICULARES.

5.2.1. Implementar un modelo de cisticercosis en rata con *T. Taeniaeformis*.

5.2.2. Purificar la Glutación S-transferasa.

5.2.3. Realizar ensayos de vacunación con el CGSTT en el modelo rata-*T. taeniaeformis*.

5.2.4. Determinación por ELISA de citocinas (IL-4, IL-2, IL-10 y TNF α)

VI. MATERIALES Y METODOS

6.1 Obtención De Cisticercos De *Taenia solium*.

Los cisticercos se obtuvieron de cerdos infectados de manera natural, localizados en rastros de la ciudad de México. Por disección de su tejido muscular se colectaron los cisticercos y posteriormente, se congelaron a -70°C hasta su uso. Los cisticercos de *Taenia taeniaeformis* se recuperaron de infecciones experimentales de ratas y los huevos del mismo parásito de gatos infectados experimentalmente en la Facultad de Medicina.

6.2 Obtención De Extracto Crudo.

Se pesaron 10 gr de cisticercos, se les agregó 50 ml de solución de extracción más inhibidores de proteasas (**Anexo 1**), todo mantenido a 4°C . Se homogeneizaron en un Polytron (Brinkmann Instruments) a máxima velocidad durante un minuto, este paso se repitió 3 veces manteniendo siempre el homogenizado en frío. La suspensión obtenida se centrifugó a 1700 xg. Se colectó el sobrenadante por aspiración, se hicieron alícuotas y se congelaron a -20°C . A este extracto se le denominó extracto crudo (EC).

6.3 Purificación Del CGSTT.

La purificación de la Glutatión S-transferasa a partir del extracto crudo (EC) del parásito, se realizó por cromatografía de afinidad, utilizando una columna de 2ml de sefarosa-4B unida a Glutatión reducido (GSH, Gibco-BRL). La columna de sefarosa-GSH se lavó con 10 ml de solución de fosfatos salina pH 7.4 (PBS), posteriormente se equilibró con 10 ml de una solución de PBS-Tritón 1% (amortiguador de columna, **Anexo 1**). Aproximadamente, 10 ml de EC diluido 1:1, previamente con amortiguador de columna y filtrado a través de una membrana Millipore de $0.22\mu\text{M}$, fueron aplicados a la columna. Una vez pasado el EC por la columna, ésta se lavó con 20 ml de PBS con la finalidad de remover todo lo que no se unió

específicamente a la columna de sefarosa-GSH. La elución del material unido se hizo por medio de una solución 5 mM de GSH en 50 mM de Tris-HCl, pH 8.0 (solución de elución, **Anexo 1**). Se colectaron fracciones de 1 ml, a las cuales se les determinó su concentración de proteína a 280 nm. Los tubos con mayor cantidad de proteína se juntaron y se almacenaron a -20°C hasta su uso (**Anexo 1**). La fracción de Glutatión S-Transferasa purificada, a partir del extracto crudo de cisticercos de *Taenia solium* por cromatografía de afinidad en la columna sefarosa-4B-GSH, se le denominó CGSTT.

6.4 Cuantificación De Proteínas.

Las proteínas obtenidas fueron cuantificadas por dos métodos: 1) espectrofotométricamente, midiendo la absorbancia a 280 nm, utilizando como blanco de calibración el amortiguador en que estaba disuelto la proteína a evaluar; y 2) por el método de Lowry [48], como se describe enseguida. Por duplicado, se colocaron en tubos de ensayo 200 μ l de la muestra y se les agregó 1 ml de la solución "C" (**Anexo 4**) compuesta por 50 partes de la solución "A" más una parte de solución "B", la mezcla se agitó, después se dejó reposar por 10 min. a temperatura ambiente. Posteriormente se le agregaron 100 μ l de la solución de Folin diluido 1:2 y se dejó reposar 40 min. Posteriormente se leyó la absorbencia a 660 nm en un espectrofotómetro.

6.5 Electroforesis En Geles De Poliacrilamida Con Dodecil Sulfato De Sodio

(SDS-PAGE).

Aproximadamente, 50 μ g de EC de parásito o fracciones semipurificadas y 5 μ g de proteínas puras se mezclaron volumen a volumen (v/v) con amortiguador de muestra de Laemmli 2X (**Anexo 2**), y se hirvieron durante 2 min. Las muestras conteniendo las proteínas fueron separadas en geles de poliacrilamida al 12% con dodecil sulfato de sodio. Los geles

fueron teñidos por 2 horas en una solución con azul brillante de Coomassie al 0.1 % (Anexo 3) y destefidos en una solución de ácido acético al 10 %, en agitación a temperatura ambiente hasta que las bandas de proteínas fueron observadas.

6.6 Ensayos De Inmunoelctrotransferencia.

Después de separar los polipéptidos en los geles de poliacrilamida, éstos fueron transferidos a membranas de nitrocelulosa. La transferencia se llevó a cabo utilizando la cámara para transferencia Mini-Trans-Blot de la marca BioRad. Los geles, las membranas de nitrocelulosa, el papel filtro del tamaño de los geles y las esponjas se humedecieron en solución amortiguadora de transferencia, posteriormente se colocaron estos elementos en la cámara de transferencia de acuerdo al siguiente orden, se colocan 1 fibra - 1 papel filtro - membrana de nitrocelulosa - gel - 1 papel filtro - 1 fibra, orientados hacia el polo positivo, la transferencia se realiza a 100 mV por 1 hr. Cuando se termina la transferencia, se corta la nitrocelulosa en tiras de 3 mm, se bloquean durante 1 hr a temperatura ambiente con una solución de PBS Tween-20 al 0.3% v/v (PBS-Tween) y con leche al 5% p/v. Se agrega el suero o el anticuerpo a evaluar (1^{er} anticuerpo) a la dilución adecuada en la misma solución de bloqueo y se incuban durante 1 hora a temperatura ambiente, posteriormente las tiras se lavaron durante 5 min, tres veces con una solución de PBS-Tween. Se agregó un segundo anticuerpo anti-IgG de conejo peroxidado diluido (1:2000) y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Se realizaron 3 lavados con PBS-Tween y uno con PBS. Las Inmunoglobulinas unidas a la membrana se revelaron utilizando el sustrato 3-3diamino bencidina y H₂O₂ (Anexo 6) [54].

6.7 Producción De Anticuerpos.

Para la producción de anticuerpos se utilizaron conejos Nueva Zelanda de 2 meses de edad. Se inmunizaron con 200 µg de antígeno

diluido en PBS y se mezclaron v/v con adyuvante Completo de Freund para la primera inmunización e Incompleto para las inmunizaciones subsecuentes. Se inmunizaron 3 veces cada 15 días. Después de la tercera inmunización se sangró al conejo para evaluar la producción de anticuerpos. Se determinó el título del suero por ELISA usando el antígeno con que se inmunizó pegado a la placa. Cuando se obtuvo el mayor título se sangró a blanco al conejo por punción cardíaca. El suero sanguíneo se obtuvo mediante centrifugación después de la coagulación de la sangre, se hicieron alícuotas de suero y se guardaron a -20°C . La fracción de inmunoglobulinas anti-CGSTT se purificó por medio de una cromatografía de afinidad utilizando una columna de Proteína A unida a sefarosa 4B. El suero (1 ml) se diluyó 1:1 con amortiguador I (**Anexo 7**) y se pasó a través de la columna de Proteína A, esta se lavó 3 veces, y las IgGs se eluyeron con 5ml de solución II (**Anexo 7**). El eluido se neutralizó inmediatamente con 5 ml de la solución III (**Anexo 7**). Las IgGs obtenidas se dializaron contra PBS, se concentraron por liofilización y se reconstituyeron en PBS para su almacenaje a -20°C hasta su uso.

6.8 Obtención De Huevos De *Taenia taeniaeformis*.

Se recolectaron proglótidos de gusanos adultos de *Taenia taeniaeformis* provenientes de gatos, por un período de 1 mes y se almacenaron a 4°C hasta su uso. Los proglótidos fueron rasgados con una aguja de calibre 29 (Insulina) y se depositaron en un tamiz de $150\ \mu\text{m}$ de poro, enseguida se maceraron con un gendarme de porcelana, se filtraron por goteo con PBS pH 7.2 a temperatura ambiente. Los huevos obtenidos se centrifugaron a $140\ \text{Xg}$ por 10 min. Se retiró el sobrenadante y los huevos se resuspendieron en 10 ml de PBS, se les adicionó 16 ml de percoll (Research Organics, Inc.), se centrifugaron a 1000 rpm durante 60 min. Se retiró de nuevo el sobrenadante y los huevos se resuspendieron con 20 ml de PBS. Se centrifugó nuevamente a $140\ \text{Xg}$ durante 10 min, repliéndose este paso por triplicado. Finalmente, los huevos se

resuspendieron en 5 ml (solución stock de huevos) y se contaron utilizando una cámara de New Bauer.

6.9 Obtención De Oncósferas De *Taenia taeniaeformis*.

Se tomó un volumen de 350 μ l del stock de huevos y se le agregaron 350 μ l de una solución preparada de hipoclorito de sodio al 6% y se contó el tiempo hasta observar la ruptura del bloque embrifórico. En ese momento se paró la reacción diluyendo con PBS pH 7.2 y aforando a 14 ml en un tubo Falcon de 15 ml. El tubo con la mezcla se centrifugó a 140 xg durante 10 min y el precipitado se lavó por 3 veces en el mismo amortiguador, el precipitado obtenido se resuspendió en 3 ml de PBS y se le adicionaron 10 ml de Percoll Sigma (densidad 1.13) con mucho cuidado gota a gota sobre la pared del tubo. El tubo se centrifugó a 140 xg durante 30 min. Se recuperó de la interfase un anillo blanquecino muy delgado (oncósferas), se tomaron unos milímetros del líquido por encima del anillo y unos por debajo. Éste se depositó a otro tubo de 15 ml y se lavó 3 veces centrifugando a 140 xg durante 10 min cada vez, finalmente las oncósferas se resuspendieron en 1 ml de PBS. Se contó el número y la viabilidad de las oncósferas con azul tripano (10 μ l de muestra y 10 μ l de Tripano) en cámara de New Bauer. Las oncósferas tratadas se dejaron en medio RPMI en una incubadora con 5% de CO₂ v/v con el objeto de medir su tiempo de viabilidad a las 72 horas.

6.10 Ensayo de Vacunación en *T. taeniaeformis* -RATA.

Se inmunizaron ratas Wistar de 4-6 semanas de edad 2 veces cada 15 días por la vía subcutánea, 7 días después de la última inmunización se infectaron con huevos o con oncósferas utilizando una sonda gástrica. Un mes después las ratas se sacrificaron y se contaron el número de larvas establecidas en su hígado. El grupo control con PBS sirvió para calcular el porcentaje de protección, de acuerdo al siguiente criterio.

$$\% \text{ de protección} = \frac{\# \text{ parásitos en el grupo testigo} - \# \text{ parásitos en el grupo experimental}}{\# \text{ parásitos en el grupo testigo}} \times 100$$

Para establecer diferencias estadísticas entre los grupos, se realizó un análisis de varianza y si las diferencias no tenían una distribución normal, se realizó la prueba de percentiles [81].

6.11 ELISA Indirecto Para La Cuantificación De IL-2, IL-4, IL-10, TNF α .

Los sueros obtenidos de las ratas de los grupos inmunizados, infectadas y normales con los huevos de *Taenia taeniaeformis*; previo a la inmunización, 7 días después de la primera inmunización, 15 días después de la segunda inmunización, al mes del reto e inmediatamente después del sacrificio se utilizaron para medir la presencia de las interleucinas. Las placas de ELISA (Maxisorp, Nunc) fueron "cubiertas" con (0.5 μ g/pozo) de los siguientes anticuerpos (Pharmingen): la primera fue con IgG de conejo anti-IL-2 de rata, la segunda placa fue cubierta con anticuerpo monoclonal de ratón anti-IL-4 de rata (clona OX-81), la tercer placa fue cubierta con anticuerpo monoclonal de ratón anti-IL 10 de rata (clona A5-6) y la última placa fue cubierta con anticuerpo monoclonal de hamster anti-TNF α de rata (clona TN3-19.12) en amortiguador de carbonatos pH 9.5 a 4°C durante toda la noche. Las placas se lavaron con PBS-Tween-20 al 0.1% v/v (Anexo 8) y posteriormente bloqueadas con 150 μ l de BSA al 1% p/v en amortiguador de carbonatos pH 9.5 a temperatura ambiente durante 4 horas. Los sueros de las ratas (100 μ l) diluido 1:500 en PBS pH 7, se adicionaron a los pozos. Después de 2 horas de incubación a temperatura ambiente, las placas se lavan con PBS-Tween 20 (0.1% v/v) y se incubaron por 1 hora a temperatura ambiente con los anticuerpos de detección (Pharmingen): monoclonal de ratón anti-IL-2 de rata-biotinilado (clona A38-3); monoclonal de ratón anti-IL-4 de rata-biotinilado (clona B11-3); monoclonal de ratón anti-IL-10 de rata-biotinilado (clona A5-6); policlonal de conejo anti-TNF α de rata-biotinilado respectivamente. Las placas se lavaron 3 veces con PBS-Tween 20. Una segunda incubación de 1 hora y a temperatura ambiente se llevó a cabo en la oscuridad con avidina-

conjugada y con fosfatasa alcalina (Sigma). Finalmente, las placas se lavaron como antes con PBS-Tween-20 y el desarrollo del color se realizó agregando el sustrato (1 M de dietanolamina, 10 mM de 4-p-nitro-fenilfosfato, 0.25 mM de $MgCl_2$) en amortiguador de Tris-HCl 10 mM, pH 9.5. La reacción se detuvo con 50 μ l de NaOH 2M (ELISA;[54]).

6.12 ELISA Indirecto Para Cuantificar IgG₁ e IgG₂, antígeno específicas.

La determinación de Inmunoglobulinas IgG₁ e IgG₂, en suero de ratas inmunizadas con la fracción del CGSTT e infectadas con los huevos de *Taenia Taeniaeformis*, se llevó a cabo en placas de ELISA cubiertas con 1 μ g/pozo (100 μ l de amortiguador de carbonatos pH 9.5 0.15 M) de los antígenos del CGSTT y extracto crudo de cisticercos (control positivo). Las placas fueron lavadas y bloqueadas como ya se mencionó antes. Se adicionó 100 μ l de suero diluido 1:500 en PBS pH 7 y se incubó 2 horas a temperatura ambiente. La placa se lavó con PBS-Tween-20 al 0.1% y se agregaron los anticuerpos monoclonales de ratón (Pharmingen), con fosfatasa alcalina anti-IgG₁ de rata (clona RG11-39.4) y anti-IgG₂, de rata (clona RG7/1.30) conjugado a biotina por 2 horas, seguido de una incubación por 1 hora con avidina-conjugada con fosfatasa alcalina (Sigma) a temperatura ambiente en agitación. La placa se lavó con amortiguador de Tris-HCl, 10 mM a pH 7.2 y se reveló con el sustrato (1 M de dietanolamina, 10 mM de 4-p-nitro-fenilfosfato, 0.25 mM de $MgCl_2$) en amortiguador de Tris-HCl, pH 9 (10 mM) por 1 hora, la reacción se detuvo con 50 μ l de NaOH 2M (ELISA; [54]).

Las absorbencias de las placas de ELISA se midieron en un lector de microplacas Biotek EL311 a 405 nm con un filtro de referencia a 630 nm. Se graficaron las absorbencias con el programa SigmaPlot V 3.0 y se hicieron las comparaciones estadísticas para los diferentes tratamientos con respecto al grupo control con el programa SigmaStat V 2.0 (Jandel Scientific), estableciendo un valor de α de 0.05.

VII. RESULTADOS

7. 1 Purificación Del Complejo GSTT.

En la figura 11A se muestra los pasos de la purificación del CGSTT a partir de los cisticercos de *Taenia solium*. El análisis por SDS-PAGE muestra en el carril 1 el EC preparado a partir de cisticercos. Este contiene más de 100 proteínas con tamaños moleculares en el rango de 8 a 200 kDa. El carril 2 muestra al EC pasado por la columna de sefarosa 4B unida a Glutatión reducido, en el que se observa un número similar de proteínas. En contraste, el carril 3 muestra la fracción eluida de la columna con el GSH. Esta fracción fue denominada complejo de Glutatión S-transferasa de *Taenia solium* (CGSTT), éste exhibe principalmente 2 bandas una con $M_r = 26.5$ y otra M_r de 25.5 kDa, respectivamente (Fig. 11A, carril 3). Con este proceso de purificación se obtuvo un rendimiento de 1 mg de CGSTT cuando se partió de 10 mg de EC.

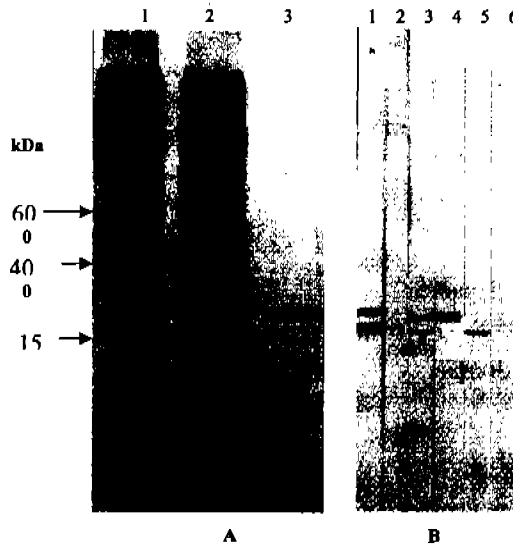


Fig11. Purificación del CGSTT a partir del cisticerco de *Taenia solium*. A) SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie: (1) Extracto crudo de cisticerco de *Taenia solium* (ECTs), (2) ECTs no unido a la columna GSH-Sefarosa y (3) complejo eluido de la columna GSH-Sefarosa con GSH (CGSTT). B) Inmunoelctrotransferencia. En la membrana 1: ECTs, 2: ECTS no unido a la columna de GSH-sefarosa, 3-6 contienen el CGSTT. Membranas 1-3 fueron enfrentadas con anticuerpos anti-CGSTT, membrana 4: con anticuerpos anti-GST 26.5 kDa, membrana 5 contra anticuerpos anti-GST 25.5 kDa, las membranas 6 con anticuerpos normales de conejo (control negativo).

En el análisis realizado por Inmunolectrotransferencia en el que se utilizaron anticuerpos IgG de conejo hechos previamente contra la fracción del CGSTT, la GST 26.5 y la GST 25.5 kDa (estos 2 últimos producidos en el laboratorio), se muestran en la Fig. 11B. Los anticuerpos anti-CGSTT identificaron las 2 bandas con $M_r = 26.5$ y 25.5 kDa en las fracciones ECTs (carril 1) y la fracción eluida de la columna de sefarosa-GSH el CGSTT (carril 3) y no identificaron ninguna banda en el ECTs pasado por la columna de sefarosa-GSH (carril 3). En contraste los anticuerpos elaborados contra la GST de 26.5 kDa y en contra de la GST de 25.5 kDa reconocieron solamente la banda con la que fueron producidos (carriles 4 y 5). Como control negativo se utilizó un anticuerpo de conejo normal enfrentado en contra el CGSTT, en el cual no detectó ninguna banda en esta fracción (carril 7).

7. 2 Modelo De Vacunación: Producción De La Cisticercosis Hepática.

Para determinar qué muestra biológica; si huevos u oncosferas de *Taenia taeniaeformis* infectaban mejor a las ratas para causarles cisticercosis, se realizaron los siguientes experimentos: grupos de ratas se infectaron con una dosis de 10,000 huevos o 10,000 oncosferas. La infección se llevó a cabo por medio de una sonda gástrica para asegurar que las ratas se comían toda la dosis del material biológico. Después de 30 días de la infección, las ratas se sacrificaron y se contó el número de cisticercos establecidos en el hígado. Este experimento fue repetido 3 veces utilizando diferentes lotes de huevos y se observó que la dosis de 10,000 huevos originó alrededor de 35 cisticercos, en contraste con las oncosferas que produjeron alrededor de 10 cisticercos en el hígado de las ratas.

Una vez determinada la muestra biológica a utilizar para producir la cisticercosis en la rata (10,000 huevos), se procedió a realizar los experimentos para determinar el número de huevos que nos permitieran medir la cisticercosis experimental en las ratas. Para ello, se utilizaron diferentes dosis de huevos: 2500, 5000 y 10,000 huevos (Fig.12). Se encontró que la cantidad de cisticercos instalados en el hígado de la rata, en la dosis de 2500 era de 8 parásitos y su

tamaño era muy pequeño, para la dosis de 5 000 se empieza a presentar una pequeña inflamación en el hígado de las ratas, la infección no es homogénea y se observan cisticercos pequeños y grandes en un rango de 1 a 3 mm de diámetro respectivamente. Finalmente, se encontró que la mejor dosis para poder contar los cisticercos en el hígado de las ratas, fue cuando estas se infectaron con 10, 000 huevos (Fig.12), puesto que se obtuvieron un promedio de 30 cisticercos en el hígado de las ratas con un tamaño regular de 3 mm, adecuados para poder cuantificar la infección.

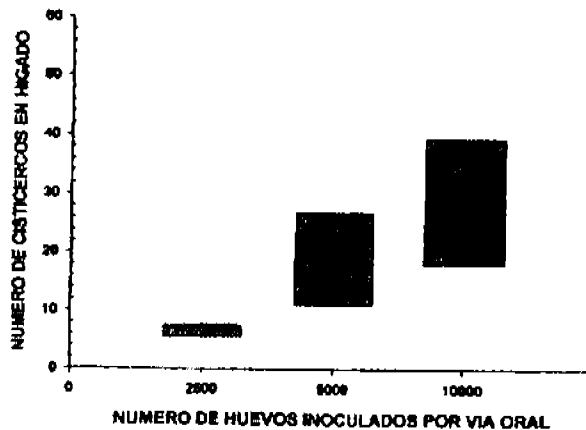


Fig. 12 Relación entre el número de huevos inoculados de *Taenia taeniaeformis* y el número de cisticercos establecidos en el hígado a los 30 días post-inoculación en ratas wistar macho.

Una vez elegida las dosis de huevos para establecer la infección, se procedió a buscar qué dosis del antígeno (CGSTT) confería la mejor protección en contra de la cisticercosis en este sistema murino. Para ello, se hicieron grupos de ratas y se probaron las dosis de 5, 25 y 100 μ g de CGSTT. Se utilizó la vía intradérmica para su administración y dos inmunizaciones con un intervalo de 15 días. Se utilizó un grupo control con PBS (Control de la infección) y otro con adyuvante Saponina SAP (Control de adyuvante) (Fig.13). La infección se llevó a cabo con 10,000 huevos de *Taenia Taeniaeformis* a los 30 días de la segunda inmunización. Los datos sugieren que la dosis de CGSTT de *Taenia solium*, a la concentración de 25 μ g genera una protección del 90.5% presentando una

diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.016$ Mann-Whitney), en comparación con el grupo control que usó sólo SAPONINA. La concentración de 5 μg de antígeno muestra una protección del 75% ($p > 0.089$ Mann-Whitney) y la concentración de 100 μg del antígeno muestra una protección del 67% ($p > 0.226$ Mann-Whitney) no mostrando una diferencia estadísticamente significativa.

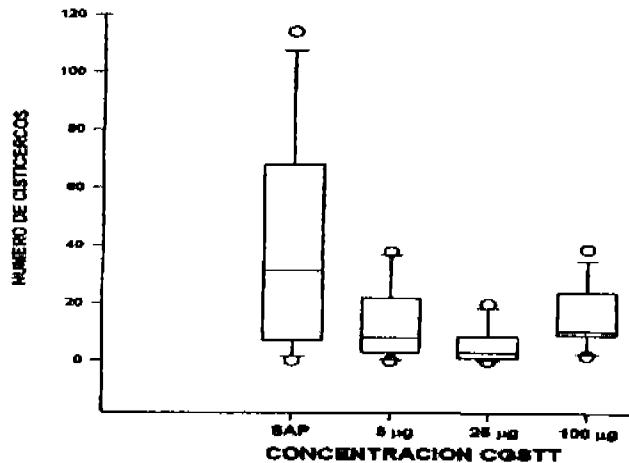


Fig.13 Número de cisticercos en hígado posterior a la infección con 10,000 huevos de *Taenia taeniaeformis* en ratas vacunadas con CGSTT.

7.3 Estimación De Factores Solubles Inmunomoduladores (IL-2, IL-4, IL-10 y $\text{TNF}\alpha$).

Se pudo determinar la presencia de IL-2r (estándar) en un rango de concentraciones entre 0 a 5 Unidades, mediante el ensayo de ELISA utilizado. Como control negativo se usó pozos cubiertos con BSA ó incubados con PBS en lugar del suero de animales tratados. Las absorbencias de los sueros del grupo de animales control (tratado con saponina), fueron iguales a las de los pozos incubados con PBS. En los sueros de los grupos de animales tratados con las diferentes concentraciones de CGSTT no se detectó la presencia de IL-2 en ninguno de ellos (Fig.14A).

Para el caso de $\text{TNF}\alpha$, se utilizó un ensayo semejante, empleando como control positivo del ensayo $\text{TNF}\alpha$ -r, se pudo detectar este factor en el rango de concentraciones entre 0 a 10 ng. Como control negativo se usó pozos cubiertos con BSA ó incubados con PBS en lugar de los sueros de animales tratados. Las absorbancias de los sueros del grupo de animales control (tratado con saponina), fueron iguales a las de los pozos incubados con PBS. No se observó la presencia de $\text{TNF}\alpha$ en los sueros de los grupos de ratas tratadas con las diferentes concentraciones de la proteína (Fig. 14B).

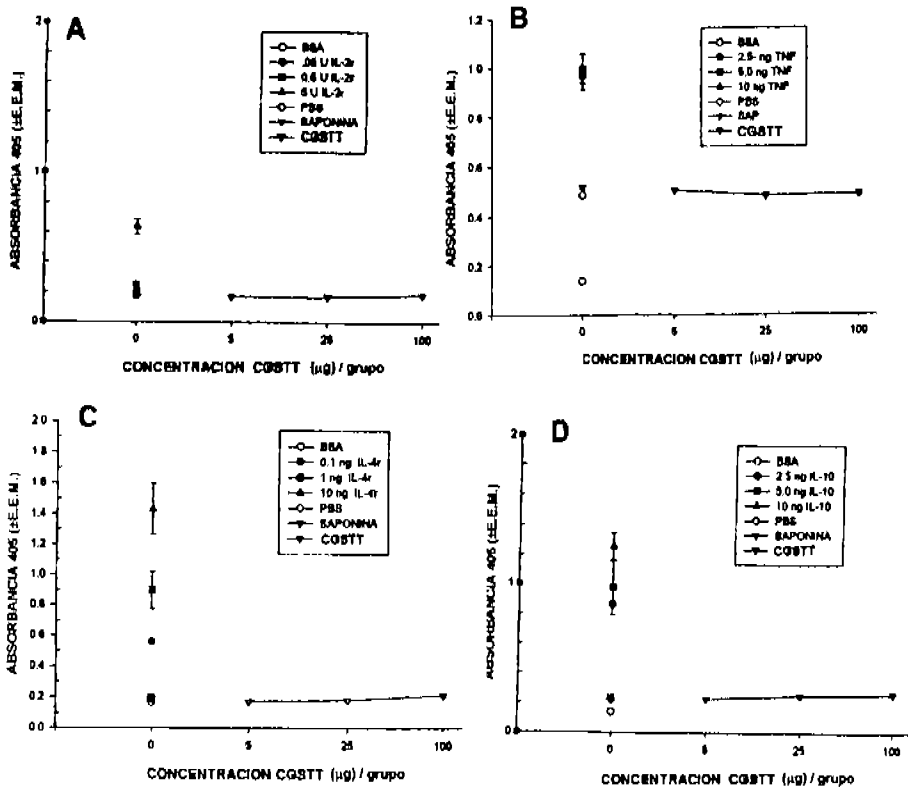


Fig.14 Determinación por ELISA de los niveles séricos de: A) IL-2, B) $\text{TNF}\alpha$, C) IL-4 y D) IL-10, en ratas wistar macho inmunizadas con CGSTT e infectadas con *Taenia taeniaeformis*.

Para estudiar la presencia en suero de la IL-4 se montó un ensayo en el cual el control positivo utilizado fue la IL-4 r en el rango de concentración de 0 a 10 ng. Como control negativo se usó PBS o pozos cubiertos con BSA. Las absorbencias de los sueros del grupo de animales control (tratado con saponina), fueron iguales a las de los pozos incubados con PBS. En los sueros de los grupos de animales tratados con las diferentes concentraciones de CGSTT utilizadas, no se detectó la presencia de IL-4 en ninguno de ellos (Fig.14C).

Para estudiar la presencia en suero de la IL-10 se montó un ensayo que utilizó como control positivo IL-10 r en el rango de concentración de 0 a 10 ng. Como control negativo se utilizó pozos cubiertos con BSA o PBS. Las absorbencias de los sueros del grupo de animales control (tratados con saponina), fueron iguales a las de los pozos incubados con PBS. En los sueros de los grupos de las ratas tratados con las diferentes concentraciones de CGSTT no se detectó la presencia de IL-10 en ninguno de ellos (Fig. 14D).

7.4 Estimación De La Producción De Anticuerpos Específicos Anti CGSTT

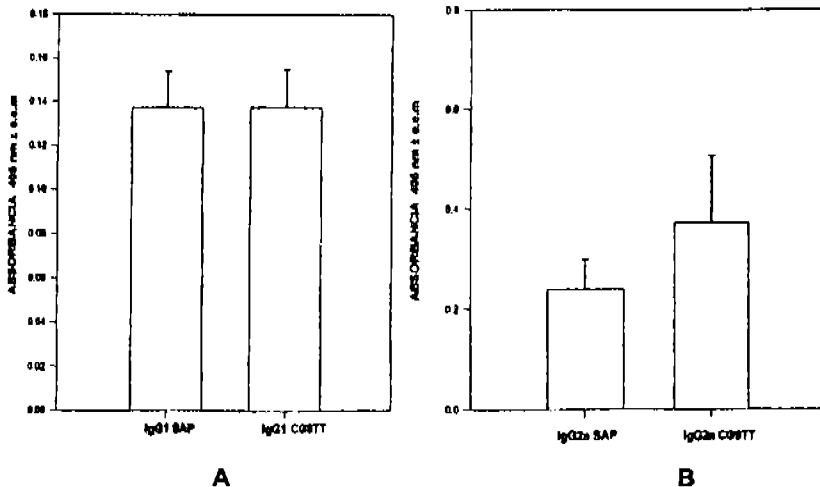


Fig.15 Determinación de anticuerpos específicos en el suero de ratas vacunadas con CGSTT e inoculadas con huevos de *Taenia taeniaeformis*, mediante ELISA indirecto. A) Isotipo IgG1 y B) IgG2a

Al estudiar la respuesta Inmune humoral de las ratas vacunadas posteriormente al reto (sangrado de 1 mes después), empleando el CGSTT como antígeno, encontramos que los niveles séricos de anticuerpos específicos IgG₁ entre el grupo tratado con saponina y el tratado con el CGSTT no presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$, "t de student"; Fig.15A) empleando el sistema de ELISA Indirecto. En cambio al estudiar los niveles séricos de IgG_{2a}, entre estos mismos grupos, observamos diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.007$), la media del grupo control fue de 0.239 y la del grupo tratado con el complejo fue de 0.371, lo que corresponde a un incremento del 55% a favor del grupo tratado con el complejo (Fig.15B).

VIII. DISCUSIÓN

Uno de los obstáculos para realizar estudios de vacunación contra la cisticercosis por *Taenia solium* es la dificultad para obtener los huevos del parásito para realizar los desafíos en los cerdos, por lo que se han implementado varios modelos de cisticercosis en murinos para determinar la eficacia de los antígenos, tales como *Taenia crassiceps*-ratón y *T. taeniaeformis*-rata, antes de probarlos en el cerdo [8,54]. Estudios experimentales en la cisticercosis murina con *T. crassiceps* han mostrado que una respuesta Th1 está involucrada en la resistencia, en contraste con la respuesta Th2 que se ha asociado con el incremento de la carga parasitaria [69,72].

El propósito de desarrollar el modelo de vacunación en el modelo de cisticercosis de *T. taeniaeformis*-rata tiene por objetivo estudiar la protección y la respuesta inmune que desarrollan los antígenos de *Taenia solium*, éste es el caso para el complejo CGSTT. Cabe señalar que la forma de adquisición de la cisticercosis en este modelo es igual con la forma en la que el cerdo y/o el humano adquieren la cisticercosis al ingerir huevos de *T. solium*, en contraste con otros modelos en donde la cisticercosis es causada por la inyección intraperitoneal de cisticercos, ejemplo el modelo de cisticercosis en *T. crassiceps*-ratón.

La *Taenia solium*, ha desarrollado al igual que otros organismos, mecanismos de defensa de tipo enzimático contra las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ERO y ERN) y contra diversos xenobióticos. Una de estas defensas está constituida por la Glutatión S-transferasa (GSTs: E.C.2.5.1.18), familia de enzimas de la fase II de detoxificación, que cataliza el ataque nucleofílico de GSH a sustratos electrofílicos [14,76]. Esta enzima representa entre el 3 al 4% de la proteína soluble total de *T. solium*, indicando su alto nivel de expresión en el parásito. Además, ante la carencia de otras enzimas detoxificantes como la Glutatión peroxidasa, Catalasa y Citocromo P450, la GST se ha postulado como el principal sistema de detoxificación en los helmintos [7,54]. Estudios previos de vacunación en varios organismos realizados con esta

enzima demuestran que provee un alto grado de protección, reduciendo considerablemente la carga parasitaria [6].

Como primer paso en este trabajo se purificó el antígeno a utilizar para los ensayos de vacunación. Se obtuvo el complejo Glutatión S-transferasa (CGSTT) a partir de cisticerco de *Taenia solium*, utilizando una columna GSH-Sefarosa. La pureza y composición de la muestra fueron analizadas por medio de un SDS-PAGE e Inmunolectroforesis. El primer ensayo mostró que el CGSTT se compone de 2 bandas proteicas y la IET con anticuerpos específicos contra cada una de ellas mostró que ambas eran dos glutatión S-transferasas de 25.5 y 26.5 kDa. El proceso de purificación fue simple y rápido ya que se aprovechó la propiedad de la enzima de unir al GSH. Este procedimiento determinó que el CGSTT corresponde aproximadamente al 10% de las proteínas solubles del extracto crudo del parásito, valor que está de acuerdo con lo reportado por otros autores [55].

Una vez purificada la enzima CGSTT se procedió a determinar con qué material biológico huevos u oncosferas se producía una cisticercosis estadísticamente significativa y observable en ratas, se utilizaron las dosis de 10,000 oncosferas o huevos. Se observó que los huevos producían una cisticercosis en la que se implantan en el hígado de la rata el 0.3% de los parásitos, en contraste con las oncosferas en la que se implantaron solo el 0.1%. Esto puede ser debido a que el tratamiento con cloro daña a las oncosferas por lo que disminuye su capacidad infectiva. La cubierta o embrióforo de los huevos protege a las oncosferas de daños ocasionados por el ambiente del hospedero (jugos gástricos) motivos por el cual infectan mejor a la rata, mostrando que los huevos son el mejor material para producir una cisticercosis, como sucede en la naturaleza [47]. Con este resultado se procedió a realizar ensayos variando las dosis de huevos (2500, 5000 y 10,000) para encontrar una dosis que nos permitiera tener una mejor infección y realizar una estadística simple. El resultado confirmó que la mejor dosis infectante era la de 10,000 huevos. Determinada la dosis de huevos se procedió a determinar la concentración de la dosis del antígeno (CGSTT) que genere una mejor protección. Los resultados mostraron

que la CGSTT produce una protección del 90% con la dosis de 25 μ g, del 75% con la dosis de 100 μ g, y de 67% con la dosis de 5 μ g, resultados que son comparables a los obtenidos por otros autores (3, 54).

Para caracterizar el fenotipo de la respuesta inmune Th1/ Th2 nos basamos en los perfiles de citocinas e inmunoglobulinas característicos de cada una de estas respuestas. El tipo de respuesta Th1 se caracteriza por la presencia de IL-2, TNF α , IFN γ e IgG2a y en el modelo de *T. crassiceps*-ratón están asociados a resistencia de la parasitosis, en contraste la Th2 se caracteriza por la presencia de IL-4, IL5, IL-10, e IgG1 y en el mismo modelo está asociado a un aumento en el crecimiento de los parásitos. En el caso de una respuesta citotóxica, la que no se determinó en este trabajo, debido a que no se conoce su participación en estas parasitosis, sin embargo está determinada por la presencia de Linfotóxina, IFN γ , TNF α [72]. Para el caso de nuestro modelo en rata-*Taenia taeniaeformis*, los resultados obtenidos no muestran la presencia de IL-2 e TNF α , en los sueros de las ratas tratadas con el CGSTT, pero sí el incremento de IgG2a con respecto al grupo control con saponina. Tampoco IL-4, IL-10 e IgG1 fueron encontrados en esta infección. Debido solo a la presencia de IgG2a específica contra el antígeno, carecemos de datos para establecer si la respuesta protectora es de tipo Th1, o bien la respuesta podría ser de tipo citotóxico o bien humoral.

Por otro lado, se ha observado que transferencias pasivas de inmunoglobulinas totales en el modelo de *T. taeniaeformis*-rata confieren una protección del 85% y que la IgG2a es la mayor responsable de esta protección, en contraste en el modelo *T. taeniaeformis*-ratón en la cual IgG2a no participa en este tipo de protección. La elevación de IgG2a en nuestro modelo coincide con el estudio realizado por Musoke y Williams realizado en el modelo de *T. taeniaeformis*-ratón, en donde se observó además que la destrucción del estadio de oncosfera del parásito a cisticerco está mediada principalmente por anticuerpos del subtipo IgG2a y complemento [39,52,53].

En el futuro inmediato otros estudios se deben realizar para detectar la participación de otras inmunoglobulinas (anticuerpos) involucradas en la destrucción del parásito como son la IgE o IgG2b para reforzar la idea de la vía

humoral. Por otro lado, la no detección de las interleucinas IL-2, IL-4, IL-10 y TNF α en el suero de las ratas debe ser confirmado utilizando otros métodos alternos de medición como son cultivos de linfocitos *in vitro*, con la meta de aclarar el tipo de respuesta inmune que la rata está utilizando para destruir al parásito en este modelo de *T. taeniaeformis*-rata.

IX CONCLUSIONES

- Los huevos son mejores que las oncosferas para producir la cisticercosis.
- El CGSTT es un candidato más para ser incluido en una vacuna contra *Taenia solium*.
- El modelo de *Taenia taeniaeformis*-rata sirve para estudiar el tipo de respuesta inmune que producen los antígenos de Tenias.
- IgG2a correlaciona con la disminución de la carga parasitaria.

X. ANEXOS.**Anexo 1.****PREPARACIÓN DE GST DE *Taenia Solium*.**

1. Pesar 10 gr de cisticerco congelados a -70°C .
2. Adicionarlos inmediatamente a 50 ml de solución de extracción, mantenida en hielo.
3. Homogenizar en el polytron por 1 minuto y con descansos de un minuto cada vez, repita este proceso tres veces manteniendo en hielo.
4. Vierta la suspensión en tubos de centrifuga y centrifugue por 15 minutos a 1700 xg.
5. Colecte el sobrenadante y diluya con un amortiguador de columna. (10ml 1:2 con amortiguador de columna).
6. Determine proteína y realice un SDS-PAGE.
7. Pasar el extracto a través de la columna de Glutación-sefarosa.
8. Lave la columna con 10-20 ml de PBS pH 7.4
9. Equilibre el gel con 6 ml de amortiguador de columna.
10. Aplique el sobrenadante del paso 5. Si el SN tiene agregados vuelva a centrifugar a filtro por $0.45\ \mu\text{m}$.
11. Lave la columna con 10 ml de PBS 2X.
12. Eluya el material unido a columna con 10 ml de amortiguador de elusión y colecte fracciones de 1-2 ml y lave con PBS 2X.
13. Regenerar con PBS conteniendo 3M NaCl (para guardar por largo tiempo)
14. Para guardar la columna por largo tiempo, lave la columna con 5 volúmenes de amortiguador de PBS conteniendo 20% de etanol y guardarla a 4°C .

SOLUCIONES**Amortiguador De Extracción Para 60 MI**

6.0 ml PBS 10X pH 7.4
0.6 ml tritón comercial + inhib. de proteínas 250 μl PMST (200 mM)/50 ml
0.6 μl EDTA (0.5 M)

Amortiguador De Columna

PBS pH 7.4, Tritón 1%

Amortiguador De Elusión

5 mM Glutathione en 50 mM de Tris HCl pH 7.4

Anexo 2.**Sistema de Geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio(SDS-PAGE).**

Aproximadamente 50 µg de EC de parásito o fracción purificada se mezclan volumen a volumen (v/v) con amortiguador de Laemmli 2X y se deja hirviendo durante 2 min.

Amortiguador de Laemmli 2X

SDS	3 % v/v
Tris HCL	62.5 mM
2-β mercaptoetanol	5 % v/v
pH	6.8

GELES DE POLIACRILAMIDA**SEPARADOR**

Soluciones	10%	12%
Acrilamida 30% p/v		
Bis 0.8% p/v	3.3 ml	4.1ml
Tris 1.5M, pH 8.8	2.5 ml	2.5 ml
H ₂ O dd	3.4 ml	2.6
SDS 10% p/v	200 µl	200 µl
Persulfato de amonio	66 µl	68 µl
Temed	6.6 µl	6.6 µl

CONCENTRADOR

Soluciones	10 %	12 %
Acrilamida 30% p/v		
Bis 0.8 % p/v	1 ml	1.25 ml
Tris 0.5M, pH 6.8	1.5 ml	1.5 ml
H ₂ O dd	3.02 ml	2.8 ml
SDS 10% p/v	60 µl	60 µl
Persulfato de sodio	20 µl	20 µl
Temed	3 µl	3 µl

Anexo 3.**Tinción con el colorante Azul de Coomassie al 0.1%**

Azul de Coomassie	0.1 g
Metanol al 50 % v/v	50 ml
Acido acético al 7 % v/v	10 ml

1. Mezclar los reactivos y agitar hasta homogeneizar perfectamente. Filtrar para remover cualquier material insoluble y aforar a 100 ml con agua.
2. Colocar el gel en un recipiente al menos por 3 h a temperatura ambiente o 30 min. aplicando calor . El tiempo requerido depende del grosor y de la concentración del gel.
3. Desteñir con ácido acético al 10 % v/v y hacer varios cambios hasta obtener bandas teñidas contra el fondo transparente del gel.

Coomassie brilliant Blue R-250
No 1610400 BIO-RAD.

Anexo 4. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS LOWRY

Cuantificación de proteínas por el Método de Lowry.
Estándar de Albúmina Sérica Bovina (BSA): 1 mg / ml

Tubo	Concentración de BSA
1	0.5000 mg / ml
2	0.2500 mg / ml
3	0.1250 mg / ml
4	0.0625 mg / ml
5	0.0313 mg / ml
6	0.0156 mg / ml
7	0.0078 mg / ml
8	0.0039 mg / ml

Soluciones

Solución A:

Na₂CO₃ 10 gr
NaOH 2 gr
NaK tartrato 0.1 gr

Aforar a 500 ml

Solución B: CuSO₄ 5H₂O 0.5 gr/ lt

Solución C: 50 partes de A + 1 parte de B (se prepara en el momento de utilizarse)

Solución D: reactivo de Folin, diluido en partes iguales con agua.

Solución E: Albumina de bovino estándar.

1. Se diluye la muestra a un volumen final de 0.2 ml.
2. Se le agrega a cada tubo 1 ml de solución C, bien mezclado, se deja reposar a temperatura ambiente durante 10 min.
3. Se agrega 0.1 ml del reactivo de Folin diluido 1:1 en agua.
4. Se dejan a temperatura ambiente durante 40 min.
5. Leer a 660 nm usando muestras blanco de agua y para curva patrón albumina.

Anexo 5. Inmunoelctrotransferencia

El gel para el Western se fija con buffer semidry (en otro recipiente se mojan 4 filtros Whatman y una membrana de nylon del tamaño del gel) por 15 min.

Se colocan 2 fibras- 1 papel filtro – membrana – gel – papel filtro – 2 fibras y se realiza la transferencia en la cámara de transferencia (3 mV por cada cm² del gel) a 100 mV 1 hr.

Cuando se termina la transferencia se coloca la membrana entre dos filtros, se retira el gel (se guarda o desecha) previamente humedecidos los filtros con H₂O o PBS 1X y se congela a -20°C.

Anexo 6. Wester Blot

1. Se requiere de PBS 1X, PBS(1X) + Tween 20 (0.3%) (500 ml PBS + 1.5 ml Tween), leche (tratada) 2.5 g/50 ml PBS Tween.
2. Se descongela la membrana y se cortan las tiras que corresponden a los pozos; estas tiras se colocan en las cámaras para Wester Blot y se les agrega a cada carril 1 ml de leche (en realidad 998 µl los otros 2 µl corresponden al suero) 1:500
3. Cubrir la cámara con papel aluminio
4. Se deja incubar 1 hr.
5. Después de incubar se lava 3 veces cada carril con PBS 1X + Tween, dejando 5 min. de agitación a cada lavado.
6. Después del tercer lavado se agrega Ab en dilución 1:2000 (0.5 µl de Ab * 999.5 µl de PBS + Tween). Se deja incubar 1 hr. (600 – 400 µl por tira).
7. Después de incubar se lava con PBS + Tween 3 veces dejando 5 min. en agitación entre c/lavado, posteriormente se lava 1 vez con (PBS dejar 5 min.)
8. Terminando el lavado con PBS se revela con DAB (10 ml de PBS + 100 µl DAB +1 µl de H₂O₂). Dejar 3 min.
9. Lavar con H₂O cuando el revelado haya concluido.

BUFFER DE TRANSFERENCIA (pH 8)

Tris al 0.025 M	15.4 g	3.08 g	6.16 g
Glicina al 0.193 M	72.4 g	14.48 g	28.96 g
Metanol absoluto	1 L	200 ml	400.0 ml
Aforar con agua hasta	5.0 litros	1.0 litros	2.0 Litros

Anexo 7.**Columna De Afinidad Para Purificar IgG (Albumina de Conejo).**

1. Equilibrar la columna c/15 ml de Buffer I
2. Pasar 1 ml de suero diluido 1:1 c/Buffer I (Total 2ml), 3 veces por la columna. (cuando este turblo centrifugar a 15 000 xg/2') Dejar que casi se seque la columna
3. Lavar la columna c/15 ml de la solución de Buffer I
4. Eluir las IgG c/5 ml de solución II.
5. Neutralizar la elución c/5 ml de la solución III "es importante nunca mezclar la solución III con Buffer I".
6. Se vuelve a equilibrar la columna si se va a pasar más suero (paso 1). Si no se va a utilizar se lava y se le pone ácida de sodio y se guarda a 4°C.
7. La elución se dializa contra PBS 0.1X y se liofiliza.
8. Cuantificar proteína y correr un gel de acrilamida.
9. Probar las IgG en un Western Blot

DIALIZAR EN PBS 0.1 M**SOLUCIÓN I**

Fosfato de sodio 0.02 M pH 7.0

SOLUCIÓN II (opcional, se puede utilizar cualquiera)

- a) Ácido cítrico 0.1 M pH 3-6
- b) Ácido acético 1.0 M pH 3.0
- c) Glicina 0.1 M pH 3.0

SOLUCIÓN III

Tris - HCl 1.0 M pH= 9.0

**Anexo 8.
ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay).****ELISA para la tipificación de inmunoglobulinas en suero de rata sensibilizados (ensayo indirecto).**

Se emplearon placas de fondo plano (flat Bottom EIA/RIA Costar Corporation

1. Se les agregó 1 μg del antígeno en amortiguador de carbonatos. Se sensibilizan los pozos de poliestireno con un volumen de 100 μl de la solución de antígeno
2. Se incuba la placa de ELISA a 4°C durante toda la noche o bien a 37°C durante 30 min.
3. Se elimina la solución vertiendo el contenido de los pozos y se seca el exceso sobre una gasa.
4. Se lava 5 veces con 200 μl / pozo con una solución de lavado. Entre cada lavado se sigue la indicación del paso 3.
5. Se bloquea con 100 μl de BSA al 1% en PBS-Tween 20 al 0.05%
6. Incubar durante 30 min. a 37°C.
7. Se repiten los pasos 3 y 4.
8. Se prepara una dilución 1:500 de los sueros a evaluar (100 μl por pozo), por duplicado.
9. Se incuban a 37°C durante 2 horas.
10. Se repite el paso 3 y 4.
11. Se prepara los anticuerpos conjugados a la enzima peroxidasa, en una dilución 1:1000 y se colocan 100 μl por pozo.
12. Se incuba a 37°C durante una hora.
13. Se lava como en el paso 3 y 4.
14. Se prepara el sustrato para peroxidasa .
15. se incuba durante 10 min. y al término de este tiempo se detiene la reacción con 50 μl de H_2SO_4 0.1M.
16. Para leer la densidad óptica a una longitud de onda de 495 nm en un lector para placas de ELISA (Microplate Reader Model 550. Biorad)

RACTIVOS EMPLEADOS.**SUEROS**

Durante los ensayos de protección cada una de las ratas fue sangrada, con los sueros de cada rata de cada grupo se les determino la presencia de anticuerpos contra el antígeno que se uso para inmunizar a ese grupo en particular, tomando como valor basal los obtenidos con los sueros pre-inmunes (semana 0).

Solución amortiguadora de carbonato (pH 9.6).

Carbonato de Sodio Anhidro (Na_2CO_3)	0.003 M
0.159 g/ 50ml	
Carbonato Acido de Sodio (NaHCO_3)	0.069 M
0.293 g/ 50ml	
Azida de Sodio (NaN_3)	0.0061 M
0.020 g/ 50 ml	

PBS-Tween 20 al 0.1% v/v (pH 7.2)

Un ml de Tween 20 para un litro de PBS 1X

Solución de lavado. (PBS-Tween 20 al 0.1%).

Cloruro de Sodio (NaCl)	0.015 M
16 g/ 2L	
Fosfato de Potasio Dibásico (K_2HPO_4)	0.0014 M
0.4 g/ 2L	
Fosfato de Sodio Dibásico (Na_2HPO_4)	0.02 M
5.8 g/ 2L	
Cloruro de potasio (KCl)	0.0026 M
0.4 g/ 2L	
Azida de Sodio (NaN_3)	0.0061 M
0.4 g/ 2L	
Tween 20	0.1 %
2 ml/ 2L	

Enzima empleada:**Peroxidasa**

Acido cítrico 0.1M	2.43 ml
Fosfato de Sodio 0.2M	2.57 ml
Ortofenilendiamina	4.0 mg
Peróxido de hidrógeno al 30 % v/v	150 μl
Agua	5.0 ml

XI. REFERENCIAS

11.1 Hemerográficas

1. Abbas A., Murphy K., Sher A. (1994) Functional diversity of helper T lymphocytes. *Annu Rev Immunol*;12:227-257
2. Acevedo-Hernández A. (1982). Economic Impact of Porcine Cysticercosis. In Flisser A, Willms K, Lacleste JP., Larralde C., Ridaura C., Beltran F (ed): Cysticercosis. Present state of knowledge and perspectives, New York. Academic Press. p 63-68.
3. Akira Ito., Henrik O.B., Marshall W.L., Graham F.M., Tsuyoshi T., Masao K., Kazuo O., Michael D.R. (1991). Vaccination against *Taenia taeniaeformis* infection in rat using a recombinant protein and preliminary analysis of the induced antibody response. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 44: 43-52
4. Allan JC., Craig PS., García J., Mencos F., Liu D., Wang Y., Wen H., Zhou P., Stringer R., Rogan M., Zeyhle E. (1992). Coproantigen detection for immunodiagnosis of echinococcosis and taeniosis in dogs and human. *Parasitol*. 104: 1-9.
5. Aluja A. (1982). Frequency of porcine cysticercosis in Mexico. In Flisser A, Willms K, Lacleste JP., Larralde C., Ridaura C., Beltran F., (eds): Cysticercosis. Present state of knowledge and perspectives, New York. Academic Press. P 53.
6. Aluja A., Escobar A., Escobedo F., Flisser A., Lacleste JP., Larralde C., Madrazo I., Velásquez V., Willms K. (1987). Cysticercosis. Una recopilación actualizada de los conocimientos básicos para el manejo de cisticercosis causada por *Taenia solium*. México: Fondo de Cultura Económica. Pp 19, 20, 115.
7. Armstrong R.M. (1997). Structure, catalytic mechanism and evolution of the Glutathione S-transferases. *Chem. Res. Toxicol*; 10:2-18
8. Benítez-Guzmán MA. (1992) Estudio de la respuesta inmune humoral en el modelo experimental de *Taenia solium* en el hamster dorado. Tesis. México, D.F. Facultad de Química, UNAM, 1992
9. Berman JD., Beaver PC., Cheever AW., Quindie EA. (1981). Cysticercosis of 60 milliliter volume in human brain. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 30: 616-619.
10. Brophy P.M., Papadopoulos A., Touraki M., Coles B., Körting W., Barrett J. (1989). Purification of cytosolic glutathione transferase from *Schistocephalus solidus* (plerocercoid): Interaction with anthelmintics and products of lipid peroxidation. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 36: 187-196.

11. Brophy P.M., Southan C., Barrett J. (1989). Glutathione transferases in the tapeworm *Moniezia expansa*. *Biochem. J.* 262: 939-946.
12. Brophy P.M., Barrett J. (1990). Glutathione transferase in helminthes. *Parasitology.* 100: 345-349.
13. Brophy P.M., Pritchard D.I. (1992). Immunity to helminthes: ready to tip the biochemical balance. *Parasitology Today.* 8: 419-422.
14. Brophy P.M., Pritchard D.I. (1994). Parasitic helminth glutathione S-transferase: An update on their potential as targets for immuno and chemotherapy. *Experimental Parasitology.* 79: 89-96
15. Carpio A. (2002). Neurocysticercosis: an update. *Lancet Infect Dis.* 2:751-762
16. Castillo M, Salgado P, Rojas R, Sotelo J, Sánchez J, Mukheri S. (1996). Unusual imaging manifestations of neurocysticercosis. *Int J Neuroradiol.* 2: 168-175.
17. Constant S., Bottomly K. (1997). Induction of Th1 and Th2 CD4⁺ T cell responses. The alternative approaches. *Annu Rev Immunol;* 15: 297-322.
18. Correa MD., Filsser-Steinbruch A., Sarti-Gutiérrez., Valdespino-Gómez JL., Del Rio-Zolezzi A., Velasco-Castrejón D., Escobar AA., Ibáñez-Bernal S., Magos-López E. (1994). Teniasis y cisticercosis. Ed. Enfermedades Tropicales en México, D.F.: Secretaria de Salud.
19. Creaney J., Wliffels G.L., Sexto J.L., Sandeman R.M., Spithill T.W., Parsons J.C. (1995). *Faciola hepatica*: localization of glutathione S-transferase isoenzymes in adult and juvenile liver fluke. *Experimental Parasitology.* 81: 106-116.
20. L David., K Theo., Bammler and Eaton. (1999). Concise Review of the Glutathione S-transferases and their significance to toxicology. *Toxicology Sciences* 49: 156-164.
21. Del Brutto O.H., Sotelo J. (1988). Neurocysticercosis: an update. In *Reviews of Infections Disease.* 6: 1075-1087.
22. Díaz S, Candil , Uribe M, Willms K, (1990). Serology as an indicator of *Taenia solium* tapeworm infections in a rural community in Mexico. *Trans R Soc trop Med Hyg.* 84:563-566.
23. Diwan AR., Coker-Vann M., Brown DB., Subianto, Yolken R., Desowitz R., Escobar A., Clarence J., Gibbs JR., Carleton GD. (1982). Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) for the detection of antibody cysticercoci of *Taenia solium*. *Annals Trop Med Hyg.* 31:364.

24. Dixon HBF., Smithers DW (1934). Epilepsy in cysticercosis (*Taenia solium*). A study of seventy-one cases. Q. J. Med. 3:603-616.
25. Dupre L., Poulain-Godefroy O., Ban E., Ivanoff N., Mekranfar M., Schacht A.M., Capron A., Riveau G. (1997). Interdermal Immunization of rats with plasmid DNA encoding *Schistosoma mansoni* 28 Kda glutathione S-transferase. Parasite Immunology. 79: 505-513.
26. Engvall E., Perlmann P. (1972). Enzyme-linked Immunosorbent assay, ELISA. III. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labelled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes. J Immunol. 109: 129-135.
27. 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(4): 536-541.
28. 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.
29. Flisser A., Bulnes I., Díaz ML., Luna R., Woodhouse B., Beltrán F., Martínez Bl., Larralde C. (1971). Estudios seroepidemiológicos de la cisticercosis humana en poblaciones predominantemente indígenas y rurales del estado de Chlapas. Arch Invest Med. 7: 107.
30. Flisser A., Woodhouse E., Larralde C. (1980). Human cysticercosis: Antigens, antibodies and non-responders. Clin Exp Immunol. 39: 27.
31. Flisser A., Correa D., Plancarte A., Sandoval MA., Avila G., Vallejo V. (1990). New approaches for the diagnosis of *Taenia solium* taeniosis/cysticercosis. Ann Parasitol Hum Comp: 65 suppl1:95:8
32. Flisser A., Madrazo I., Delgado H. (1997). Cisticercosis humana. Edít. Manual Moderno. México D.F: pp 1-176.
33. Gajdusek D.C. (1978). Introduction of *Taenia solium* into West New Guinea with a note on an epidemic of burns from cysticercus epilepsy in the Ekarl people of the Wissel Lakers area. Papua New Guinea Med. J. 21:329-342.
34. Golsmith RS., Kagan IG., Reyes-González MA., Cedeño-Ferreira J. (1971). Estudios seroepidemiológicos realizados en Oaxaca, México, I. Encuesta de anticuerpos parasitarios mediante la prueba de hemaglutinación indirecta. Biol. Of Sanit Panam. 71:500.
35. Gönnert R., Meister G., Strufe R., Webbe G. (1967). Biologische Probleme bei *Taenia solium*. Zeitschr. Tropenmed. Parasitol. 18:76-81.

36. Habig, W.H., Pabs M.J. & Jakoby. (1974). Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercaptúrico acid formatlon. J. Biol. Chem. 22: 7130-7139.
37. Hayes J.D Pulford D.J. (1995). The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST* and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotetion and drug resistance. Crit. Rev. Biochem. Mol. Boil. 30: 445-600.
38. Héctor Samuel L.M. (2002). Cestodiasis tisulares: participaclón de los Infocitos T cooperadores 1 y 2. Revista Salud Pública de México; 44: 145-152.
39. Henkle-Dührsen K. & Kampkötter K. (2001). Antloxidant enzyme families in parasitic nematodes. Molecular & Biochemlchal Parasitology. 18: 112-129.
40. Hermánek J., Prokopic JJ (1989) Influence of thymic preparation on the result of expermental infection with *Taenia crassiceps* (Zeder, 1800) in ICR mice. Folia Parasitol (Praha) 36: 331-340
41. Jaffe J., Lambert R.A. (1986). Glutathione S-transferase in adult *Dirofilaria immitis* and *Brugia pahangi*. Molecular and biochemical Parasitology. 20: 199-206.
42. Jung RC, Rodríguez MA., Beaver PC., Schenthal JE., Levy RW. (1981). Racemose cysticercus in human brain. A case report. . Am J Trop Med Hyg. 30: 620-624.
43. Ketterer B, Meyer D.J., Clark A.G. (1988). Soluble glutathione transferase isoenzymes. Academic Press, London, U.K., p. 73-135.
44. Larralde C., Padilla A., Hernandez M., Govezensky T., Sclutto E., Gutierrez C., Tapia-Conyer R., Salvatierra B., Sepúlveda J. (1992). Seroepidemiología de la cisticercosis en México. Revista Salud Pública de México. 34: 197-210.
45. Leld R.W., Williams J.F. 1974. The Immunological response of the rat to infection with *Taenia taeniaeformis*. Immunology. 27: 195-207
46. Lightowlers M.W, Colebrook A.L., Gauci C.G., Gauci S.M., Kyngdon C.T., Monkhouse J.L., Vallejo C.R., Read A.J., Roife R.A., Sato C. (2003). Vaccination against cestode parasite: anti-helminth bacines that work and why. Veterinary Parasitology 115: 83-123
47. López-Rosado DG (1977) "Historia de la Agricultura y la Ganadería". México: Editorial Herrero, S.A. p 350.

48. Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Bio. Chem.* 193: 355.
49. Mannervik B., Alln P., Guthenberg C., Jennson H., Kallm T.M., Warholm M., Jornvall H. (1985). Identification of 3 classes of cytosolic glutathione transferase common to several mammalian species: Correlation between structural data and enzymatic properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States America.* 82: 7202-7206.
50. Mannervik B, Awasthi Y.C., Board P.G., Hayes J.D., Di Illo C, Ketterer B, Listowsky I, Morgenstern R, Jornvall H., Allan J.C., Candil R.A. (1992). Nomenclature for human glutathione transferases (letter). *Biochem. J.* 282: 305-306.
51. Medina MT, Rosas E, Rublo-Donnadieu F., Sotelo J. (1990). Neurocisticercosis as the main cause of late onset epilepsy in México. *Archives of Internal Medicine* 150:325-327.
52. Musoke A.J., Williams J.F. 1975. Immunoglobulins associated with passive transfer of resistance to *Taenia taeniaeformis* in the mouse. *Immunology.* 28: 97-101
53. Norverto V. and Abraham L.P. (1998). Glutathione S-transferase in helminth parasites. *Lat. Amer. Microbiol.* 40: 73-85.
54. O'leary K.A., Tracy J.W. 1988. Purification of three cytosolic Glutathione S-transferases from adult *Schistosoma mansoni*. *Archives Brasileiro Medicina veterinaria Zootecnia.* 39: 135-150.
55. Pawlowski Z. (1991). Efficacy of low doses of praziquantel in tenosis. *Acta Tropical.* 48: 83-88.
56. Penberton K.D., Barret J. (1989). The detoxification of xenobiotic compounds by *onchocerca gutturosa* (Nematoda: Filarioidea). *International Journal of Parasitology.* 19: 875-878.
57. Rabiela MT, Lombardo L, Flores F (1972) Cisticercosis cerebral. Estudio de 68 casos de autopsia. *Patología (Méx).* 10:27-40.
58. Rabiela M.T., Ricas A., Castillo F., (1982) Anatomopathological aspects of human brain cisticercosis, In Filisser A., Willms K., Lactette J. P., Larralde C., Ridaura C., Beltrán F (eds): *Cysticercosis. Present state of knowledge and perspectives*, New York. Academic Press. pp179-200.
59. Rabiela MT, Rivas A, Castillo S, González-Angulo A (1985). Pruebas morfológicas de que *C. cellulosa* y *C. racemosus* son larvas de *Taenia solium*. *Arch Onvest Med (Méx).* 16: 83-86.

60. Rabiela MT., Rivas A., Flisser A (1989). Morphological types of *Taenia solium* cysticercl. Parasitol today. 5:357-359.
61. Ramirez A., Verástegui P. (1953). Patología del campo visual en la cisticercosis cerebral. Med Cong Cien Mexicano, 8 (Cien. Med.) pp 198-199.
62. C. Richard., A. Monica., R. Sudarshan., A. Anthony. (2001). Glutathione S-transferase family of enzymes. Mutation research. 482: 21-26.
63. Sarti E., Schantz P., Plancarte A., Wilson M., Gutiérrez I., López A., Lara R., Gómez H., Díaz F. (1992). Prevalence and risk factors for *Taenia solium* tenosis and cysticercosis in humans and pigs in a village in Morelos Mexico. Am J trop Med Hyg.
64. Sarti E., Schantz P., Plancarte A., Wilson M., Gutiérrez I., Aguilera J., Gleizer M., Loya M., Flisser A. (1994). Epidemiological investigation of *Taenia solium* tenosis and cysticercosis in a rural village of Michoacán State, México. R Soc Trop Med Hyg. 60(1-2):53-67.
65. Sarti E., Flisser A., Schantz P., Gleizer M., Loya M., Plancarter A., Schantz P., Aguilar J. (1997). Development and evaluation of health education intervention against *Taenia solium* in a rural community in Mexico. Am J Trop Med Hyg. 56: 127-132.
66. Sarti E. (1997) La tenosis y cisticercosis en México. Revista Salud Pública de México 39: 225-231.
67. Sarti E. (1998). Estrategias de investigación para la prevención y control de la tenosis y cisticercosis en áreas rurales de México. Tesis Doctoral. Facultad de Medicina. Universidad Nacional Autónoma de México. México. D.F.
68. Schantz PM., Morre AC., Muñoz JL., Hartman BJ., Schaefer JA., Aron AM., et al. (1992). Neurocisticercosis in an Orthodox Jewish community in New York City. New Engl J Med. 327: 692-695.
69. Schenone H., Villaroel F., Rojas A. A., Ramirez R. (1982). Epidemiology of human cysticercosis in Latin America. In: A Flisser, K Willms, JP Lacleste, C Larraide, C Ridaura, F Beltran (eds). Cysticercosis. Present State of Knowledge and Perspectives. ISBN 0-12-260740-6. Academic Press, New York. Pp 25-38.
70. Secretaría de Salud. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Boletín epidemiológico 2000; 52 (17):16
71. Terrazas L.I., Cruz M., Rodríguez-Sosa M., Bojalil R., García -Tamayo F., Larraide C. (1998). Th1-type cytokines check resistance to murine cisticercosis caused by *Taenia crassiceps*. Parasitol. Res. 85: 135-141

72. Trottein F., Godin C., Pierce R.J., Sellin B., Taylor M.G., Gorillot I., Silva M.S., Lecocq J.P., Capron A. (1992). Inter-species variation of schistosome 28Kda glutathione S-transferase. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 54: 63-72.
73. Tsang W., Wilson M., Govezenky T., Fragoso G., Sculto E. (1994). Characterization of Glutathione S-transferase. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 54: 63-72.
74. Velasco Suárez M., Bravo Becherelle MA., Quirasco F. (1982). Human clsticercosis: medical-social implications and economic impact. En Flisser A., Willms K., Laclette JP., Ridaura C., Beltrán F. (eds). *Cysticercosis. Present State of knowledge and Perspective*. ISBN 0-12-260740-6. Academic Press, New York. 25-38.
75. Wilce M.C.J. & M.W. Parker. (1994)). Structure and function of glutathione S.transferases. *Bloch. Biophys. Acta*. 1205: 1-18.
76. Williams J., Egelkirk P., Linddsay M. (1982). Mechanisms of immunity in rodent cysticercosis En: Flisser A. Willms K., Laclette I eds *Cysticercosis Present state of knowfedge and perspectives*. New York: Academic Press. Pp 621-632.
77. Xu X., Lemaire C., Grzych J.M., Pierce R.J., Raccurt M., Muller F., Zelmech F., Decavel J.P., Peyrol S., Llu J., Fontaine J., Lafitte S., Capron A., Cesbron J.Y. (1997). Expression of a *Schistosomo mansoni* 28 Kda glutathione S-transferase In the livers of transgenic mice and its effect on parasite infection. *Infection and Immunity*. 65: 3867-3874.
78. Yoshino K. (1993) Studies on the post embryonal development of *Taenia solium*. Part III. On the development of cysticercus cellulosa within the definite intermedlate host. *J Med Ass Formosa* 32: 166-169
79. Zenteno-Alanis G. (1982). A classification of human clsticercosis. In *cysticercosis: Present State of knowledge and Perspectives*. A. Flisser, K. Willms, J.P. LACLETT, c. Larralde, (Eds), Academic Press, New York. Pp 107-126

11.2 Bibliográficas

80. Abbas A., Lichtman A. H., Pober J. *Citocinas: Inmunología celular y molecular*. Idem, 4ª, McGraw Hill, España, 2002. pp 5-101.
81. Glantz Stanton A. *Primer of biostatstics*. Fourth edition, Mc Graw Hill. Pg 16-21.

82. Goodman & Gilman. The pharmacological basis of therapeutics. 10th Edition
Hardman, JG, Limbird, LE, Goodman Gilman A. (eds) McGraw-Hill, New
York, USA. 2001.pp 1086-1087

11.3 Electrónicas

- 84 www.imblomed.com.mx/Juarez/Juv61n2/espanol/wju42-05.html
85 www.FAO.org/ag/againfo/resources/documents/multimedia/Taenia
86 www.cal.vet.upenn.edu/dxendopar/parasitepages/taeniaformis.htm
87 www.janssenpharmaceutica.be/jah/pages/portraits/p_cat3.html