



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

"ESTANDARIZACIÓN Y DETECCIÓN DE IL-5 POR
HIBRIDACIÓN *in situ* EN LA MUCOSA INTESTINAL
DE HÁMSTERES INFECTADOS CON *Taenia solium*"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A :

SOFÍA AURORA VELASCO VELASCO



MÉXICO, D.F.

2005

m343583



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

Presidente: Abel Gutiérrez Ramos
Vocal: Raquel Ortega Muñoz
Secretario: Guillermina Ávila Ramírez
1er suplente: Patricia Elvira Berrón Ruíz
2do suplente: José Cordero Hernández.

La presente tesis se realizó bajo la asesoría de la Dra. Guillermina Ávila Ramírez y la dirección de la Dra. Ana Flisser en el Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México. Este trabajo fue financiado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica de la Universidad Nacional Autónoma de México, con clave: IN206703, bajo el nombre de "Determinación de citocinas en gerbos y hámsteres infectados con *Taenia solium*".

Asesor:



Dra. Guillermina Ávila Ramírez

Sustentante:



Sofía Aurora Velasco Velasco

A mis padres Lilia y Elías

A mis hermanos Elías, Lilia y Salvador

Con todo mi amor...

AGRADECIMIENTOS

Gracias a mi *alma mater* la Universidad Nacional Autónoma de México y a todos los profesores que me formaron en mi trance por la facultad de Química.

Gracias a la Dra. Ana Flisser por permitirme realizar este trabajo en su laboratorio, por sus consejos, apoyo y sobretodo por su amistad y confianza en mí.

Gracias a la Dra. Guillermina Ávila por sus comentarios, críticas e invaluable consejos durante la realización del presente trabajo.

Gracias a la histotecnóloga Verónica Rodríguez Mata, a la MC Laura Aguilar Vega y especialmente a la QFB Sandra G. Solano Gálvez por su apoyo técnico.

Gracias al profr. Abel Gutiérrez y la MC Raquel Ortega por las correcciones precisas a mi trabajo.

Gracias a mis compañeras de laboratorio, Biol. Olivia Reynoso, Mayra Cruz y Cristina Paredes por su sincera amistad y por hacer de ese espacio un viaje muy divertido. Al Dr. Javier Ambrosio por atenderme en mis dudas y brindarme su amistad.

Gracias a Betty por su cariño, consejos, apoyo y comprensión durante todos estos años, por cada momento desde la infancia...por todo lo que la amistad significa.

Gracias al incondicional Rodrigo y a las divertidas Claudia (Miss Clau), Paola (amibita) y René, por su inigualable amistad, por todos los momentos compartidos, por nunca juzgarme y siempre escucharme.

Gracias a Ricardo ("papa Baloo"), Brenda, Luis, Anayetsin, Iaraset, Víctor, Lili, Juan e Isabel por su apoyo, por el cariño que me han brindado.

Gracias a Sergio, Gloria y Moisés por su confianza e invaluable amistad.

Gracias a Felipe por ser un entrañable compañero, por ser mi mejor amigo y mi mayor crítico, por hacer de mi estancia en Ciudad Universitaria una experiencia inigualable y divertida, pero sobretodo, por creer en mí.

CONTENIDO

| | |
|---------------------------------------------------------------------------|----|
| INDICE DE FIGURAS..... | 3 |
| ABREVIATURAS..... | 4 |
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 5 |
| 1.1 Clasificación y Morfología..... | 6 |
| 1.2 Ciclo de vida..... | 10 |
| 1.3 Diagnóstico..... | 11 |
| 1.4 Relación hospedero-parásito en teniosis..... | 14 |
| 1.5 Modelos experimentales en teniosis..... | 16 |
| 1.6 Respuesta inmune en el intestino delgado..... | 17 |
| 1.7 Inmunidad contra parásitos..... | 21 |
| 1.8 Hibridación <i>in situ</i> | 24 |
| 2. JUSTIFICACIÓN..... | 26 |
| 3. HIPÓTESIS..... | 27 |
| 4. OBJETIVOS..... | 28 |
| 4.1 Objetivos particulares..... | 28 |
| 4.2 Objetivos generales..... | 28 |
| 5. MATERIAL Y MÉTODOS..... | 29 |
| 5.1 Animales experimentales..... | 30 |
| 5.2 Cisticercos..... | 30 |
| 5.3 Grupos experimentales y protocolo de infección..... | 31 |
| 5.4 Obtención del adulto de <i>T. solium</i> | 31 |
| 5.5 Procesamiento de las muestras de tejido para cortes histológicos..... | 32 |
| 5.6 Tratamiento de portaobjetos con silano..... | 32 |
| 5.7 Marcaje de oligonucleótidos con digoxigenina..... | 32 |
| 5.8 Cuantificación del marcaje de los oligonucleótidos..... | 34 |

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 5.9 Hibridación <i>in situ</i> | 36 |
| 5.9.1 Prehibridación..... | 36 |
| 5.9.2 Hibridación..... | 37 |
| 5.9.3 posthibridación..... | 37 |
| 5.9.4 Detección inmunológica..... | 38 |
| | |
| 6. RESULTADOS..... | 40 |
| 6.1 Obtención del adulto de <i>T. solium</i> | 40 |
| 6.2 Estandarización de la Técnica de HIS..... | 42 |
| 6.2.1 Marcaje de las ondas..... | 42 |
| 6.2.2 Inactivación de la actividad de la fosfatasa alcalina endógena..... | 43 |
| 6.2.3 Prehibridación..... | 46 |
| 6.2.4 Permeabilización..... | 46 |
| 6.3 HIS del la sonda de IL-5 en la mucosa intestinal de hámsteres infectados con <i>T. solium</i> | 50 |
| | |
| 7. DISCUSIÓN..... | 56 |
| | |
| 8. CONCLUSIONES..... | 63 |
| | |
| 9. APÉNDICE..... | 64 |
| | |
| 10. REFERENCIAS..... | 68 |

INDICE DE FIGURAS

| | | |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 | Micrografía electrónica de barrido del escólex de <i>Taenia solium</i> | 7 |
| Figura 2 | Representación esquemática de un proglótido maduro de <i>Taenia solium</i> | 8 |
| Figura 3 | Micrografía electrónica de barrido de un huevo de <i>Taenia solium</i> | 8 |
| Figura 4 | Ciclo de vida de <i>Taenia solium</i> | 11 |
| Figura 5 | Funciones efectoras de las subpoblaciones T CD4+ (Th1/ Th2)..... | 18 |
| Figura 6 | Microscopía de luz de un corte longitudinal de intestino delgado humano..... | 20 |
| Figura 7 | Estrategia experimental para la detección de IL-5 | 29 |
| Figura 8 | Esquema de marcaje y detección de oligonucleótidos | 33 |
| Figura 9 | Esquema de verificación y cuantificación del marcaje de los oligonucleótidos..... | 35 |
| Figura 10 | Inmunopunto de oligonucleótidos marcados con digoxigenina..... | 42 |
| Figura 11 | Actividad de la FA endógena en cortes de intestino delgado del hámster dorado..... | 44 |
| Figura 12 | Actividad de la FA endógena en cortes de intestino delgado del hámster dorado..... | 44 |
| Figura 13 | HIS de la sonda de α -Tubulina y HPV | 49 |
| Figura 14 | HIS con la sonda para IL-5 en cortes de intestino delgado de hámsteres infectados con <i>T. solium</i> a los 2 DPI y de hámsteres no infectados..... | 52 |
| Figura 15 | HIS con la sonda para IL-5 en cortes de intestino delgado de hámsteres infectados con <i>T. solium</i> a los 4 y 8 DPI | 53 |
| Figura 16 | HIS con la sonda para IL-5 en cortes de intestino delgado de hámsteres infectados con <i>T. solium</i> a los 12 y 16 DPI..... | 54 |
| Figura 17 | HIS con la sonda para IL-5 en cortes de intestino delgado de hámsteres infectados con <i>T. solium</i> a los 20 y 24 DPI..... | 55 |

ABREVIATURAS

| | |
|----------|---------------------------------------------------------------------------|
| °C | Grados Celsius |
| APC | Célula presentadora de antígenos |
| BCIP | 5-Bromo,4-cloro,5-indoilfosfato |
| CCK | Colecistocinina |
| CMNL | Células mesentéricas de los nódulos linfáticos |
| GM-CSF | Factor estimulante de crecimiento de granulocitos y monocitos |
| cDNA | Ácido desoxirribonucleico complementario |
| CPS | Examen coproparasitológico |
| dd-UTP | Dideoxiuridin trifosfato |
| DEPC | Dietilpirocarbonato |
| DIG | Digoxigenina |
| DIG-dUTP | 2'-dideoxiuridin-5'-trifosfato, acoplado a digoxigenina por el carbono 11 |
| DPI | Días post-infección |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| DTT | Ditiotreitol |
| EDTA | Ácido tetraetilendiaminoacético |
| ELISA | Ensayo inmunoenzimático en placa |
| FA | Fosfatasa alcalina |
| Fc | Fracción constante de las inmunoglobulinas |
| FcR | Receptores Fc |
| FISH | Hibridación <i>in situ</i> fluorescente |
| GALT | Tejido linfoide asociado a intestino |
| GPI | Péptido inhibidor gástrico |
| HI | Hemoaglutinación indirecta |
| HIS | Hibridación <i>in situ</i> |
| VPH | Virus Papiloma Humano |
| IET | Inmunolectrotransferencia |
| IFI | Inmunofluorescencia indirecta |
| Ig | Inmunoglobulina |
| IL | Interleucina |
| INF | Interferón |
| LCR | Líquido cefalorraquídeo |
| LP | Lámina propia |
| □m | Micrometros |
| M | Molar |
| mM | Milimolar |
| MALT | Tejido linfoide asociado a mucosas |
| MPA | Metilprednisolona |
| mRNA | Ácido ribonucleico mensajero |
| NBT | Nitro azul de tetrazolio |
| PBS | Amortiguador salino de fosfatos |
| RM | Resonancia Magnética |
| RNA | Ácido ribonucleico |
| SPI | Semanas post-infección |
| SSAF | Solución amortiguadora con fosfatos salino |
| SSC | Solución de citrato de sodio |
| TGF | Factor transformante del crecimiento |
| TNF | Factor de necrosis tumoral |
| tRNA | Ácido ribonucleico de transferencia |
| α-Tub | Alfa-Tubulina |

INTRODUCCIÓN

Taenia solium es el parásito causal de dos parasitosis: la cisticercosis y la teniosis. La cisticercosis es el padecimiento producido en el hombre y en el cerdo por el cisticerco o forma larvaria del cestodo que se contrae por la ingestión de huevos liberados por el parásito adulto. La teniosis se adquiere al consumir carne de cerdo infectada con el metacéstodo (cisticerco) del parásito.

Puesto que el ser humano es el hospedero definitivo de *T. solium*, es el único responsable de la dispersión de los huevos del parásito. La defecación al aire libre o la inadecuada eliminación de excretas son motivos de riesgo de infección, así como también la falta de control sanitario de la carne de cerdo, su manejo y los hábitos de alimentación que incluyen el consumo de carne poco cocida o cruda, así como la crianza de cerdos que tolere o promueva el contacto de éstos con el excremento humano y permita la infección.^{1,2} Las condiciones sociales, económicas y culturales están muy estrechamente vinculadas con la permanencia del binomio teniosis-cisticercosis debidas a *T. solium*. La transmisión del parásito se favorece debido a la falta de higiene personal y a la mala condición económica que conlleva a la falta de letrinas, agua potable y drenaje, así como a la educación pobre o nula.

La cisticercosis humana es considerada un problema de salud pública en países en vías de desarrollo.³ Los primeros estudios para conocer la frecuencia de neurocisticercosis se realizaron en hospitales y en series de necropsias. En México, los resultados de los estudios en hospitales, arrojaron frecuencias de hasta 8.6 casos por cada cien pacientes hospitalizados, y

en las series de necropsias de hasta 2 453 casos por cada 100 000 habitantes, señalándose que aproximadamente el 43% de los casos eran asintomáticos y el 80% fueron hallazgo de autopsia.^{4,5} Las frecuencias de infecciones por *T. solium* dadas por estadísticas oficiales señalan alrededor de 13 000 casos anuales y a partir de 1991 la notificación ha sido menor pues se reportaron 8000 casos anuales de *Taenia sp.*^{4,6}

Clasificación y morfología de *Taenia solium*

T. solium se clasifica de la siguiente manera (Linnaeus, 1758):

Phylum Platyhelminthes
Clase Cestoidea
Subclase Eucestoda
Orden Cyclophyllidea
Familia Taeniidae
Género *Taenia*
Especie *solium*

El estadio adulto de *T. solium* es un gusano plano y segmentado, con simetría bilateral, carece de tubo digestivo, mide de 1 a 5 metros de longitud y posee en la parte anterior el escólex (cabeza) de forma cuadrangular de aproximadamente 1 mm de diámetro. El escólex posee cuatro ventosas en forma de copa que miden 0.4 mm de diámetro aproximadamente y un rostelo armado por una doble corona de ganchos, cada una formada por 13 unidades

aproximadamente. Los ganchos de la corona interna tienen una longitud de 130-160 μm y los de la corona externa de 100-120 μm aproximadamente (Fig.1). Posteriormente sigue el cuello que es corto de aproximadamente la mitad del grosor del escólex. El cuello es la porción germinal que da origen a los proglótidos, segmentos hermafroditas que constituyen la unidad de reproducción (Fig. 2) y conforman la última porción corporal, el estróbilo.

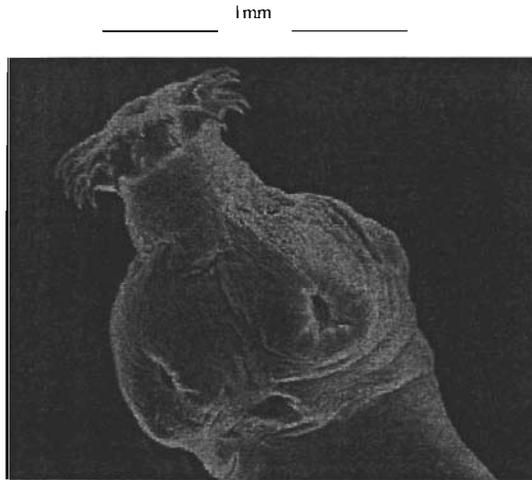


Fig. 1. Micrografía electrónica de barrido del escólex de *Taenia solium*. (Cortesía del Dr. Juan Pedro Laclette).

El estróbilo está formado por 800-1000 proglótidos, los que se dividen según su grado de desarrollo en proglótidos inmaduros, posteriormente están los maduros y en la última región los proglótidos grávidos. Los huevos que se encuentran en las ramas uterinas de los proglótidos grávidos, miden de 31 a 51 micras de diámetro, son de paredes gruesas y tienen apariencia radial cuando se observan bajo el microscopio de luz; encierran en su interior al embrión hexacanto (llamado así por presentar 6 ganchos) u oncosfera que es la forma infectante para el

cerdo o para el hombre (Fig. 3). Los proglótidos grávidos, conteniendo miles de huevos, se desprenden periódicamente del resto de la cadena estrobilar, y son expulsados con las heces, permaneciendo viables durante largo tiempo.⁷

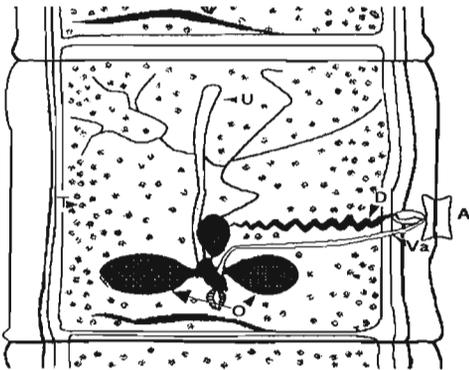


Fig. 2

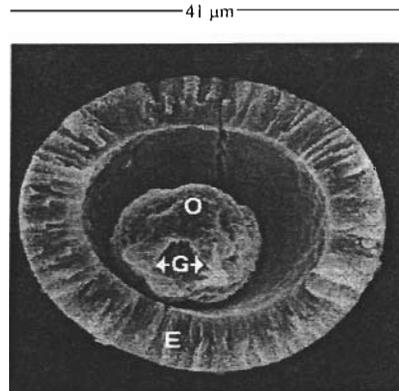


Fig. 3

Fig. 2. Representación esquemática de un proglótido maduro de *Taenia solium*. A: atrio genital, D: conducto deferente, O: ovario bilobulado, T: testículos, U: útero y Va: vagina. Fig. 3. Micrografía electrónica de barrido de un huevo de *Taenia solium*. E: embrión, G: ganchos oncosferales, O: oncosfera. Figuras tomadas de: <http://www.facmed.unam.mx/grid/photos.htm>

El huevo de *T. solium* está rodeado por varias envolturas, la más externa es el vitelo, capa delgada que se caracteriza por la presencia de elementos citoplasmáticos, tales como mitocondrias y glucógeno, que le proporcionan nutrición y protección a la oncosfera antes de que el embrión esté bien formado. El vitelo no se encuentra en los huevos presentes en la materia fecal, ya que usualmente se pierde en las heces. Debajo del vitelo se encuentra una membrana flexible y discontinua con apariencia de cráter llamada membrana embriofórica

externa, relacionada con la superficie externa del embrióforo. Este último protege al embrión del ambiente exterior y está formado por bloques electrodensos de proteínas parecidas a la queratina, unidos por una sustancia cementante.^{7, 8}

Los bloques proteicos son resistentes a los jugos digestivos, no así la sustancia cementante, por lo que se da la separación de los bloques cuando las enzimas proteolíticas del estómago e intestino actúan sobre ésta, liberándose la oncosfera. La célula embriofórica es de origen sincicial con apariencia granular, la cual se extiende por debajo de la superficie interna del embrióforo y tiene la función de sintetizar al mismo. La envoltura siguiente y la más interna es la membrana oncosférica, la cual se permeabiliza con los jugos digestivos permitiendo la activación del embrión.^{7, 8}

El cisticerco es una vesícula translúcida y ovoide, mide de 5 a 20 mm de diámetro con un escólex invaginado y puede permanecer en los tejidos del hospedero intermediario durante varios años.⁸ La superficie externa de la vesícula está rodeada por una cubierta de microvellosidades limitadas por una membrana plasmática, que a su vez está cubierta por una capa vellosa de glucocálix. La vesícula está llena de un fluido transparente que contiene proteínas del parásito y del hospedero. El tegumento contiene vesículas de diferentes tamaños y el límite interior del mismo se le llama sincicio. El sincicio es una banda protoplasmática continua sostenida por una membrana basal de tejido conjuntivo. El tegumento y la pared vesicular son el sitio de contacto del parásito con el hospedero y desempeña un papel central en el mantenimiento de la relación hospedero-parásito.^{7, 8, 9}

Ciclo de Vida de *Taenia solium*.

El ciclo de vida se inicia cuando el hospedero definitivo (ser humano), que es el portador del parásito adulto, libera al medio ambiente los proglótidos grávidos llenos de huevos con las heces. El ser humano y el cerdo adquieren la cisticercosis al ingerir los huevos. Las enzimas proteolíticas del estómago e intestino destruyen las envolturas protectoras del huevo y liberan la oncosfera. El embrión hexacanto activado atraviesa la mucosa intestinal probablemente por la acción combinada de sus ganchos que desgarran el tejido y de secreciones líticas que digieren la mucosa. Posteriormente, el embrión alcanza los capilares sanguíneos y linfáticos que lo llevan a diferentes órganos, en donde se desarrolla hasta convertirse en un cisticerco.^{7, 8, 9}

El ciclo se cierra cuando el ser humano consume carne de cerdo infectada (cruda o mal cocida) e ingiere uno o varios cisticercos viables. La masticación, las sales biliares y las proteasas digestivas destruyen la pared vesicular e inducen la salida o evaginación del escólex. Una vez evaginado, el escólex se fija en la mucosa del primer tercio del intestino delgado por medio de sus ventosas y ganchos rostelares. A partir de entonces, el estróbilo comienza a crecer y diferenciarse hasta convertirse en gusano adulto (Fig. 4).^{7, 8, 10}

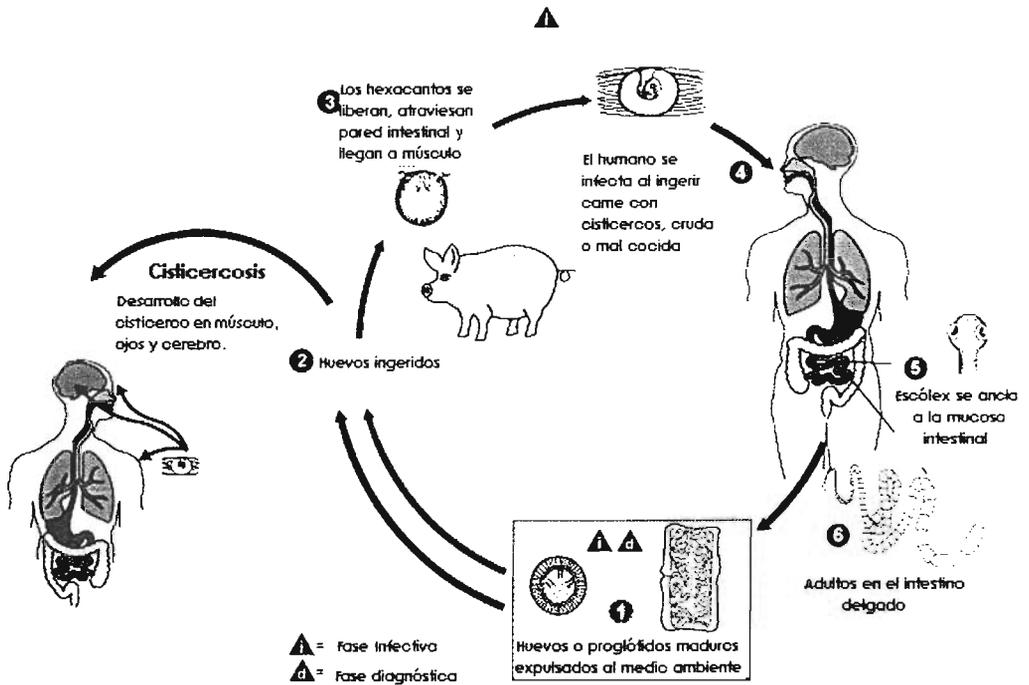


Fig. 4. Ciclo de vida de *Taenia solium*. Figura tomada y adaptada de: <http://www.dpd.cdc.gov>

Diagnóstico

La teniosis generalmente cursa con signos y síntomas vagos: dolor abdominal, náusea, debilidad, pérdida de peso, aumento de apetito, cefalea, falta de hambre, diarrea, constipación, o no presenta sintomatología a no ser por la expulsión de proglótidos.⁵

Las técnicas empleadas en la detección de teniosis dependen básicamente del hallazgo de proglótidos o huevos en las heces mediante exámenes coproparasitológicos (CPS) de sedimentación (Ritchie), flotación (Faust) o de frotis grueso, cuya sensibilidad no es mayor al

60%.^{11,12,13} El diagnóstico específico se hace contando el número de ramas uterinas principales en los proglótidos grávidos, ya que los huevos no pueden diferenciarse de los de *T. saginata*, siendo un menor número para *T. solium*, de 7 a 13, y de 15 a 20 para *T. saginata*.¹⁴ Otra alternativa es la observación del escólex, ya que se puede ver la doble corona de ganchos y cuatro ventosas en *T. solium*, mientras que *T. saginata* no posee rostelo.

Con la finalidad de desarrollar pruebas rápidas, sensibles y específicas que permitan detectar a los portadores de *Taenia sp.*, se ha estandarizado un ensayo inmunoenzimático en placa ó ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) de captura de antígenos de *Taenia sp.* en heces de personas infectadas y de animales infectados experimentalmente con sensibilidad del 100% y especificidad del 94%,¹⁵ sin embargo, esta técnica no permite distinguir entre *T. solium* y *T. saginata*. Con el fin de optimizar un método que prometa una mayor sensibilidad, se ha ensayado la hibridación directa utilizando sondas de DNA (secuencias repetidas específicas de DNA aisladas de *T. solium* y *T. saginata*) marcadas radiactivamente mediante el empleo de bibliotecas genómicas de cDNA, lo que ha permitido la identificación de un secuencia repetida para *T. solium* (pTsol-9C), que puede ser usada para distinguir los huevos de *T. solium* de los de *T. saginata*.¹⁶

En el ser humano los cisticercos se localizan principalmente en el cerebro, ocasionando la neurocisticercosis, y se encuentran preferentemente en la región subaracnoidea, seguida de la parenquimatosa. El periodo entre la infección inicial y la aparición de los síntomas es muy variable y puede ser de algunos meses o de varios años.^{17,18} La manifestación clínica de la cisticercosis es polimórfica ya que puede ser desde asintomática, incapacitante o mortal, y el

cuadro clínico dependerá del número, localización y estado evolutivo del parásito, siendo la epilepsia de inicio tardío y la cefalea, las manifestaciones clínicas más comunes.¹⁸

El diagnóstico clínico de la neurocisticercosis se debe apoyar con estudios de tomografía computarizada o de resonancia magnética (RM), considerada como la técnica de elección en la práctica clínica, ya que es más sensible que la tomografía computarizada en el diagnóstico de neurocisticercosis activa.¹⁸ Diferentes métodos inmunológicos se han utilizado para el diagnóstico de la cisticercosis: hemoaglutinación indirecta (HI), la inmunofluorescencia indirecta (IFI) y la fijación del complemento (FC) en suero y líquido cefalorraquídeo (LCR).^{19, 20} La prueba de ELISA tiene una sensibilidad de 75 al 90%,²⁰ sin embargo, la determinación de anticuerpos da reacciones cruzadas con sueros de portadores de otras helmintiasis.²¹ La utilización de antígenos puros tales como el antígeno B y algunas glicoproteínas de superficie del cisticerco han disminuido algunas reacciones cruzadas con algunos parásitos, pero no han podido realizar el diagnóstico diferencial entre cisticercosis e hidatidosis ^{21, 22} (parasitosis causada por especies del género *Echinococcus*).

La técnica de inmunoelectrotransferencia (IET) como prueba diagnóstica utilizando un extracto completo de *T. solium* y sueros de pacientes con cisticercosis, tiene una especificidad del 100%.²³ Aplicando la misma estrategia, pero utilizando fracciones de glicoproteínas purificadas de *T. solium* por medio de cromatografías de afinidad con lectinas, se tiene una sensibilidad del 98% y un 100% de especificidad,²⁴ pero dichos resultados dependen del número y localización de los parásitos.

Relación hospedero-parásito en teniosis

En la mayoría de las infecciones por helmintos aparecen grandes cargas de parásitos a pesar de la abundante respuesta Th₂ y la evidencia directa, *in vivo*, del papel de los eosinófilos, IgE o mastocitos para controlar la infección por helmintos es escasa.²⁵ En roedores, dichas infecciones están asociadas con la generación de hiperplasia de células cebadas en el intestino (mastocitosis intestinal)²⁶ y con el aumento de eosinófilos, así como las altas concentraciones de IgE e IgG₄.²⁷ Sin embargo, no está claro el papel que tiene esta respuesta en la protección o si es la responsable de la patología que se observa en algunas parasitosis o si, tal vez, interviene en los dos aspectos.²⁶

En el caso de las infecciones por cestodos, se pensaba que los adultos no inducían una respuesta inmune debido a que el escolex de la tenia no penetraba completamente en la mucosa intestinal y no había suficiente sensibilización del sistema inmune del hospedero.²⁸ En estudios histológicos realizados en la mucosa intestinal de hámsteres inmunodeprimidos e infectados con *T. solium*, se observó que el escólex de las tenias se encontraba adherido en el primer tercio del intestino delgado (duodeno-yeyuno), indicando que el rostelo está completamente extendido en el tejido del hospedero, con los ganchos penetrando la submucosa y las cuatro ventosas abarcando una o más vellosidades del intestino.²⁹ Por otro lado, en infecciones causadas por cestodos adultos como *E. granulosus* y *E. multiloculares*, cuyos escólices penetran la mucosa intestinal e interactúan con el hospedero, se ha demostrado que pueden sensibilizar el sistema inmunológico e inducir la síntesis de anticuerpos específicos.³⁰

En estudios realizados con hámsteres infectados con cisticercos de *T. solium*, se detectaron coproantígenos desde la primera semana post infección (SPI) hasta la décima primera SPI (semana en la que se expulsaron todas las tenias del hospedero), mientras que los antígenos circulantes se detectaron desde la tercera SPI hasta la novena SPI. En los animales infectados e inmunodeprimidos se detectaron coproantígenos desde la primera SPI hasta la semana de expulsión de las tenias (17 SPI) y no se detectaron antígenos circulantes. Ambos grupos de animales desarrollaron anticuerpos IgG contra al teniosis, inmunoglobulinas que fueron detectadas desde la segunda SPI y fueron disminuyendo después de la expulsión del parásito, pero sólo en animales no inmunodeprimidos se detectó IgG específica para *Taenia solium* en sobrenadantes fecales.³¹

También se ha estudiado la respuesta inmune celular en hámsteres infectados con *T. solium*, encontrándose que se desarrolla una reacción inflamatoria en la mucosa intestinal de animales no inmunodeprimidos, la cual estaba conformada por macrófagos, células epitelioides, células caliciformes y algunas células plasmáticas mientras que en jerbos inmunodeprimidos e infectados con *T. solium*, se encontró un leve incremento de células caliciformes y mastocitos; y en los jerbos infectados con *T. solium* y no inmunodeprimidos hubo además un aumento considerable de células caliciformes y mastocitos.³²

Modelos experimentales de teniosis

Existen diversos inconvenientes en el estudio de la relación hospedero-parásito en la teniosis por *T. solium* debido a que el ser humano es el único hospedero definitivo para el estadio adulto, por ello es necesario recurrir a modelos experimentales como alternativas para el estudio de esta parasitosis. Se ha intentado obtener la forma adulta de *Taenia solium* utilizando diversos mamíferos (cobayos, conejos, perros, gatos, cerdos, monos, ratones, ratas albinas, entre otros); los mejores resultados han sido obtenidos en el gibón (*Hylobates lar*), en el hámster dorado (*Mesocricetus auratus*), en el jerbo (*Meriones unguiculatus*) y en la chinchilla de cola larga (*Chinchilla laniger*).^{33,34,35} Pero sólo en un gibón y en el modelo de chinchilla ha sido posible recuperar proglótidos grávidos y se comprobó la infectividad de los huevos de *T. solium* obtenidas de chinchillas al infectar a un cerdo, confirmando de esta manera la reproducibilidad de todo el ciclo de vida de éste parásito en modelos experimentales.^{35, 36}

El parásito adulto puede crecer en el intestino delgado del modelo experimental del hámster dorado,³⁴ el cual al ser inmunodeprimido con acetato de metilprednisolona (MPA), presenta mayor susceptibilidad a la infección.³³ En este modelo, la etapa estrobilar de *T. solium* sobrevive más de 16 semanas en animales inmunodeprimidos y alrededor de 10 semanas en animales no inmunodeprimidos. Asimismo, el número de parásitos recuperados en la necropsia es mayor en los primeros.³⁵ Debido al fácil manejo de los animales, la satisfactoria obtención de productos de material antigénico del parásito adulto, fue posible el desarrollo de pruebas diagnósticas para teniosis,¹⁵ determinar componentes de la respuesta inflamatoria intestinal y de la respuesta inmune humoral.^{29,31,32,37}

En el modelo experimental de jerbos inmunodeprimidos no se obtienen proglótididos grávidos, al igual que en el modelo del hámster dorado,^{32,35} sin embargo, cuando los animales son tratados con corticoesteroides se pueden obtener ejemplares sexualmente maduros con proglótididos pregrávidos y las infecciones duran hasta 12 semanas, aunque se recuperan menos tenias que en hámsteres.³⁵ Estos dos roedores muestran también diferencias en la dosis de esteroides necesaria para mantener la infección, ya que se necesita una dosis cuatro veces mayor en los jerbos, siendo el desarrollo del parásito más rápido, así como su expulsión.^{32, 35}

Respuesta inmune en el intestino delgado.

En forma general, el sistema inmunitario puede generar dos tipos de respuesta, la humoral y la celular. Posterior a la presentación del antígeno, se dispara una cadena de señalización y los linfocitos TCD4+ entran rápidamente en un programa de diferenciación (Fig.5). En el caso de las infecciones crónicas, como lo son las infecciones por parásitos, éste proceso de diferenciación puede resultar en una respuesta inmune altamente polarizada, no así en el caso de las infecciones agudas, donde es común observar una respuesta más heterogénea.³⁸ En forma particular, el microambiente del intestino está aparentemente orientado para la producción de citocinas de tipo Th₂: IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 y TNF- α ,³⁹ y Th₃: TGF- β e IL-10. En contraste con la respuesta tipo Th₁ y Th₂, la respuesta tipo Th₃ aparentemente proporciona ayuda para la producción de IgA y la secreción primaria de TGF- β .⁴⁰

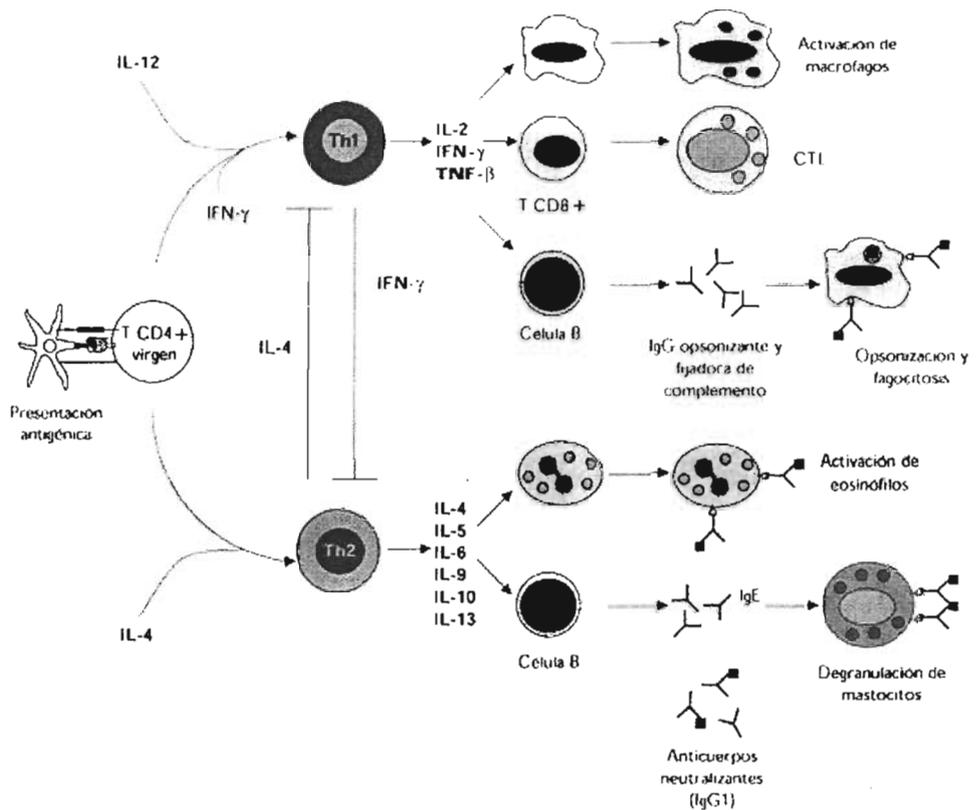


Fig. 5 Funciones efectoras de las subpoblaciones T CD4+ (Th₁/ Th₂). Modificado de Abbas et al, 1996.

La respuesta celular a nivel de la mucosa está conformada por las células maduras del epitelio intestinal: enterocitos, células caliciformes, células de Paneth, células enteroendocrinas y las células M (células de los micropliegues)^{41,42} (Fig. 6). Los enterocitos son células cilíndricas altas, especializadas para el transporte de sustancias desde la luz del intestino hasta la circulación. Las células caliciformes son glándulas unicelulares secretoras de mucina, que se

encuentran entremezcladas con las demás células de epitelio intestinal, siendo más numerosas en el íleon terminal. Las células enteroendocrinas se concentran en la porción inferior de las criptas intestinales, pero migran lentamente y pueden encontrarse en todos los niveles de las vellosidades. Estas células secretan casi todas las hormonas, los reguladores más activos son la colecistocinina (CCK), la secretina y el péptido inhibidor gástrico (GIP); estas tres hormonas aumentan la actividad pancreática y vesicular e inhiben la función secretora y la motilidad gástrica.⁴¹ Las células M, son células epiteliales que recubren las placas de Peyer, capaces de endocitar y transportar los antígenos a las placas de Peyer, donde son capturados, procesados y presentados por las células presentadoras de antígenos (APCs) a las células linfoides subepiteliales.^{40, 43}

La lámina propia contiene abundantes células del sistema inmune, los linfocitos de la lámina propia son predominantemente células T activadas, aunque también pueden detectarse numerosas células B activas y células plasmáticas. La lámina propia también contiene abundantes nódulos de tejido linfoide, diseminados a lo largo del intestino delgado y que representa uno de los principales componentes del tejido linfoide asociado a intestino (GALT: Gut Associated Lymphoid Tissue), los nódulos son particularmente grandes y numerosos en el íleon, donde se localizan sobre la cara del intestino, opuesta a la fijación al mesenterio, llamados nódulos agregados o placas de Peyer, donde se encuentran primordialmente linfocitos B, linfocitos T, células dendríticas y macrófagos.^{39, 44}

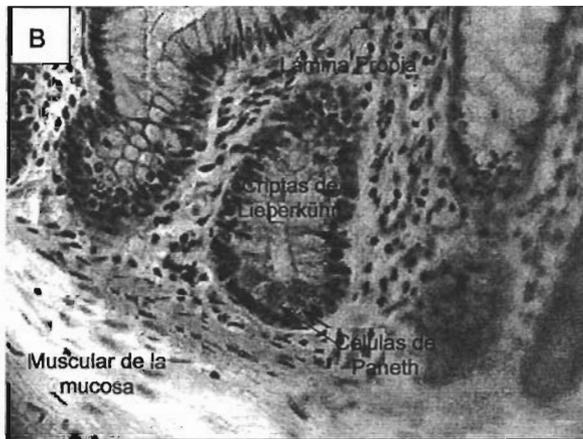
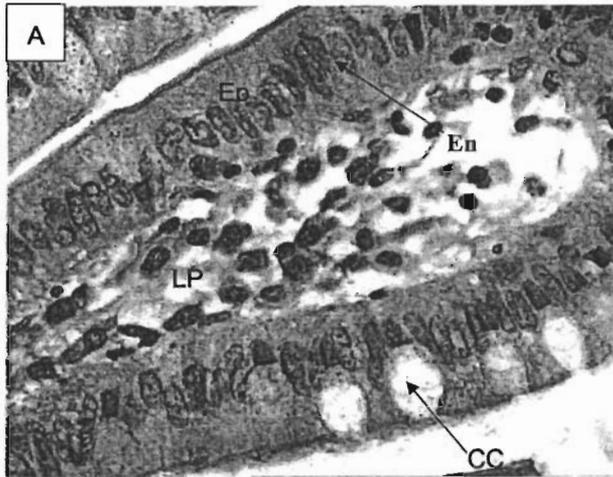


Fig. 6. Microscopía de luz de un corte longitudinal de intestino delgado humano. A) Ep: Epitelio; LP: Lámina Propia; CC: células caliciformes; En: enterocitos. Fotografías tomadas y adaptadas del sitio: <http://asb.aecom.yu.edu>

La respuesta inmune humoral a nivel de la mucosa es principalmente del isotipo IgA₂, anticuerpo que es secretado por las células plasmáticas de la lámina propia, transportado por las células epiteliales y liberado en el interior de la luz intestinal. También se encuentran

anticuerpos IgM en menor concentración en comparación con los IgA, pero que llevan a cabo funciones similares de protección que los anticuerpos IgA.^{43,44}

Inmunidad contra Parásitos

Según Mosmann y colaboradores, se considera que los patógenos, para ser eliminados, requieren diferentes respuestas inmunes mediadas por TCD4+: protozoarios intracelulares son controlados mediante una respuesta Th₁, mientras que los organismos extracelulares, tales como helmintos son controlados a través de una respuesta tipo Th₂.⁴⁵ Sin embargo, se estableció la importancia de no hacer afirmaciones tan categóricas dentro del tipo de respuesta Th₁ o Th₂ y, en lugar de esto, considerar la existencia de mecanismos superpuestos implicados en la defensa inmunitaria mediante citocinas individuales y las rutas efectoras que son inducidas.⁴⁶

Se ha demostrado ampliamente la participación de las células TCD4+ en la regulación de la respuesta inmune por la secreción de citocinas. Como ya se ha mencionado, las células Th se han definido por los grupos de citocinas que secretan (Fig. 5), demostrándose que la expulsión de gusanos parásitos puede estar controlada por citocinas del grupo Th₂ que inducen una mastocitosis en la mucosa, eosinofilia intestinal y concentraciones elevadas de IgE en suero.^{39,43,47} El incremento de la población de mastocitos, células cebadas y eosinófilos, así como las altas concentraciones de IgE e IgG₄ son característicos de los individuos infectados por helmintos.^{39,43,48} Además de la respuesta de anticuerpos IgE, la respuesta inmune humoral, en la mucosa se producen, anticuerpos IgA, IgG e IgM, aunque los últimos en menor concentración.⁴⁹

Se debe de tomar con atención la alta concentración de IgE, ya que la IgG₄ puede bloquear los mecanismos mediados por IgE,⁵⁰ aunque ambos isotipos están promovidos por el mismo tipo de citocinas Th₂. La ausencia de síntomas alérgicos en la infección por helmintos adquirida naturalmente, a pesar de la elevada concentración de IgE en suero y la aparición de eosinofilia, puede deberse a las concentraciones extremadamente altas de IgG₄ bloqueante, que está también presente en estos individuos. La resistencia a la infección con *Schistosoma mansoni* y *S. haematobium* en humanos se ha asociado con la producción de IgE, mientras que la susceptibilidad está asociada con la presencia de isotipos no IgE, particularmente IgG₄.^{51, 52} Así, la susceptibilidad o resistencia a la infección puede depender de un balance entre las respuestas protectoras IgE y los anticuerpos bloqueantes de antígenos de las etapas infectivas.

La mucosa intestinal contribuye a la prevención inmune al impedir el establecimiento de parásitos⁵³, demostrado mediante ensayos *in vitro*, que el secuestro de larvas de *Trichinella spiralis* en el moco intestinal sólo ocurre en presencia de anticuerpos específicos, sugiriendo que dichos anticuerpos inducen la captura del parásito por dos vías: por formación de una red cargada de anticuerpos que atrapa a la larva y por bloqueo de alguna función requerida para su progreso a través de la mucosa.⁵⁴

Los macrófagos, plaquetas y eosinófilos tienen receptores para IgE (FcεR CD23), así, estas células se pueden unir a parásitos cubiertos por IgE para después activarse. Los macrófagos que se unen a las larvas de helmintos a través de la IgE muestran niveles aumentados de enzimas lisosómicas y un aumento en la liberación de metabolitos reactivos del oxígeno, Interleucina 1, leucotrienos, factor activador plaquetario y prostaglandinas.⁵⁵ De igual

forma, los eosinófilos liberan tanto mediadores preformados como derivados lipídicos y citocinas. Los gránulos específicos de los eosinófilos contienen hidrolasas lisosomales y péptidos catiónicos como la proteína básica principal, la proteína catiónica, la neurotoxina derivada del eosinófilo, la mieloperoxidasa y la peroxidasa eosinofílica. Esta última es la principal responsable de la liberación de metabolitos tóxicos del oxígeno. Entre los principales derivados lipídicos se encuentran el factor activador de plaquetas y los leucotrienos C4, D4, y E4; compuestos que intervienen en los procesos de quimiotaxis, aumentan la permeabilidad vascular, producen contracciones en la musculatura intestinal, incrementan la permeabilidad de los capilares y edema en los tejidos.⁴³ La eosinofilia es dependiente de la presencia de IL-5⁵⁶, la cual junto con la IL-3 y el factor estimulante de crecimiento de granulocitos y monocitos (GM-CSF) (citocinas producidas también por eosinófilos), promueven la maduración y liberación de los eosinófilos en la médula ósea.⁴³

La IL-5 juega un papel importante en la regulación de la respuesta inmune en las infecciones parasitarias, suceso demostrado en estudios con ratones infectados con *T. spiralis*, donde se evaluó la expresión *in vitro* de citocinas por parte de las células mesentéricas de los nódulos linfáticos (CMNL), observándose que a los 2 DPI se liberaban pocas cantidades de IL-5 y grandes cantidades de IFN- γ , actividad que decayó rápidamente, ya que para el 8DPI se incrementó la secreción de IL-5, pero no la de INF- γ . Cuando las células CMNL fueron estimuladas posteriormente con antígenos parasitarios no hubo secreción de IL-5 a los 2 DPI pero si a los 8 DPI, demostrando que cuando la infección progresa hay un cambio a fenotipo Th₂, impidiendo que el parásito se establezca en el intestino.⁵⁷ Por otro lado, estudios con *Strongyloides stercoralis*, demostraron que la expresión de IL-5 es requerida en el

establecimiento de una respuesta inmune protectora, ya que se necesita de ésta citocina para la producción de eosinófilos involucrados en la eliminación de la larva durante la inmunidad innata y la inducción de una respuesta humoral protectora en la inmunidad adaptativa.⁵⁸

La detección de citocinas puede efectuarse en sobrenadantes de cultivos o en suero por medio de ensayos inmunoenzimáticos. También se pueden detectar por métodos de biología molecular donde se identifica el DNA o el RNA con una sonda específica. Al respecto, mediante la prueba de HIS se pueden identificar tanto al mRNA para IL-5 como a las células que lo sintetizan.

Hibridación *in situ* (HIS)

La hibridación *in situ* (HIS) fue descrita por primera vez en 1969 por Gall y Pardue. Este método tenía como finalidad la localización de secuencias de DNA en cromosomas de *Drosophila polytene*.⁵⁹ En general, la hibridación puede hacerse sobre soportes sólidos (filtros de nylon o nitrocelulosa), en solución (*in vitro*) o en cortes de tejido o preparaciones celulares (*in situ*). Se puede hacer la detección de transcritos de RNA de células individuales, detectando RNA poliadenilado usando sondas poli (U)⁶⁰ o usar transcritos complementarios de RNA o DNA como sondas, ya sea para secuencias virales^{61,62,63} o para mRNA de una sola célula.^{62,64}

Las sondas se pueden marcar a través de métodos radiactivos (³H, ³²P, ³³P, ³⁵S) y los no radiactivos (biotina, digoxigenina, fluorescencia). Las sondas marcadas con ³⁵S representan el método más sensible para la detección de mRNA en secciones de tejido.^{65,66,67,68} Sin embargo, los radioisótopos tienen una vida media corta y la exposición es peligrosa, además de que el

desarrollo de una señal positiva puede durar hasta varias semanas y el costo puede ser elevado. Por todas estas limitaciones, se han desarrollado métodos no radiactivos que no son peligrosos de manejar, que pueden ser almacenados por períodos prolongados y ser detectados por una reacción antígeno-anticuerpo, utilizando para ello un anticuerpo acoplado a una enzima o a un fluorocromo (inmunohistoquímica) en cuyo caso la técnica se denomina hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) y alcanzan una sensibilidad equivalente a la de los isótopos.⁶⁹

La técnica de HIS tiene una alta sensibilidad que permite la detección en una región de 200 copias de mRNA por célula. Se debe considerar también el híbrido formado y la estabilidad del mismo, ya que un híbrido RNA-RNA es más estable que un híbrido DNA-RNA y este a su vez más estable que el híbrido DNA-DNA.⁷⁰ Sin embargo, la técnica de HIS presenta el inconveniente de que las secuencias pueden no detectarse si están enmascaradas cuando están asociadas a proteínas o protegidas en alguna estructura celular, por ello es de interés incrementar la permeabilidad del tejido y la disponibilidad de la secuencia de nucleótidos en la célula o en el tejido, sin destruir la integridad de los mismos.

La sensibilidad de la técnica depende del efecto de la preparación del tejido sobre la retención y accesibilidad de DNA celular blanco o RNA, los tipos de sondas, eficiencia de la marcación de la sonda, sensibilidad del método utilizado para la detección de la señal y el efecto de las condiciones de hibridación *in situ* sobre la eficiencia de la hibridación (fuerza iónica, temperatura, astringencia, etc.).

JUSTIFICACION

Debido a que no se conocen los mecanismos por los cuales *T. solium* es expulsado del intestino delgado en el ser humano ni en el modelo experimental del hámster dorado, se puede proponer algunos mecanismos inmunológicos estudiando la participación de las citocinas en dicho proceso.

En los modelos experimentales de *Taenia solium* de jerbos y hámsteres se ha observado un incremento en la reacción inflamatoria en la mucosa intestinal, presentándose en los hámsteres, eosinofilia constante en el área que rodea a los escólices del parásito. Por los conocimientos generados anteriormente en otras parasitosis y debido a que la IL-5, junto con otras citocinas, promueven la maduración y liberación de los eosinófilos en la médula ósea, es importante el estudio *in situ* de ésta citocina, así como también identificar las células que la producen, suceso que puede estar estrechamente relacionado con el proceso de expulsión del parásito adulto *T. solium* en el hámster dorado.

HIPÓTESIS

Taenia solium provoca una reacción inflamatoria en la mucosa intestinal de hámsteres dorados infectados experimentalmente, que induce el incremento en la expresión del mRNA que codifica para la citocina IL-5 y que puede ser determinado usando sondas específicas mediante la técnica de hibridación *in situ*.

OBJETIVOS

Objetivo General

Caracterizar el perfil de citocinas sintetizadas en la mucosa intestinal de hámsteres y gerbos infectados con el adulto de *T. solium* mediante hibridación *in situ*.

Objetivo Particulares

- Estandarizar la técnica de hibridación *in situ* con una sonda complementaria a una parte de la secuencia de α -Tubulina (como control positivo) y con una sonda complementaria a una parte de la secuencia de VPH (como control negativo) en cortes de tejido de intestino delgado de hámster dorado.
- Detectar mRNA para IL-5 por la técnica de hibridación *in situ* en la mucosa intestinal del modelo experimental del hámster dorado infectado con *Taenia solium* en diferentes días post-infección.
- Realizar un análisis cualitativo del mRNA para IL-5 detectado por HIS en los hámsteres infectados con *T. solium*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Diagrama de flujo de las actividades que se llevaron a cabo para la realización del presente estudio

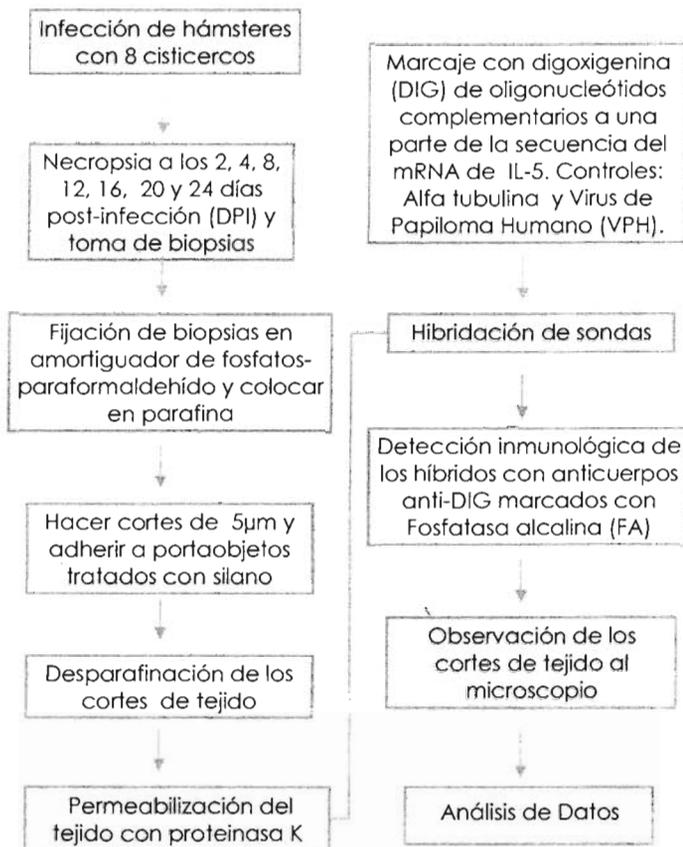


Fig. 7. Estrategia experimental para la detección de IL-5 en la mucosa intestinal del modelo experimental de tenosis en hámster.

Animales experimentales

Se emplearon hámsteres dorados (*Mesocricetus auratus*) hembras de 8-9 meses de edad, de aproximadamente 150-170 g de peso corporal, que fueron obtenidos del Bioterio de la Unidad de Investigación del Hospital General "Dr. Manuel Gea González. Los animales se trasladaron a la facultad de Medicina, se mantuvieron en cajas de acrílico con un colchón de aserrín con tapas de alambre. La dieta consistió en alimento comercial balanceado para roedores (Laboratory autoclavable rodent diet 5010 Harlan) y agua estéril *ad libitum*. La limpieza de las jaulas se realizó dos veces por semana. Los animales fueron desparasitados por vía oral con una cánula una semana antes de la infección con 20 mg de metronidazol (Rhone Poulenc) por cada kg de peso durante cinco días, 50 mg de mebendazol (Sanfer) por cada kg de peso durante tres días y una dosis única de 30 mg de praziquantel (Merck) por cada kilogramo de peso del animal.

Cisticercos

Los cisticercos de *T.solium* se extrajeron por medio de disección del músculo esquelético de cerdos infectados de manera natural. A los cisticercos se les retiró el fluido y posteriormente se depositaron en una caja petri con PBST[†]

Para verificar la viabilidad de los cisticercos se utilizó la prueba de evaginación *in vitro*. Los cisticercos se colocaron en medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco) adicionado con bilis de cerdo en una proporción 1:4, por cada cisticerco se colocaron 4 ml de la mezcla al 25%.

[†] La elaboración de las soluciones está descrita en el Apéndice.

Posteriormente se dejaron en incubación a 37°C durante 3 a 12 horas y se contó el número de cisticercos que evaginaron y presentaron movimiento.

Grupos experimentales y protocolo de infección

Los animales se dividieron en dos grupos al azar, uno fue el grupo experimental y otro el grupo testigo no infectado. Los animales fueron infectados por vía oral con ocho cisticercos de *T. solium* en el primer día de experimentación, se hicieron necropsias a diferentes días post infección (DPI) y se sacrificaron tres animales del grupo experimental y dos hámsteres del grupo testigo.

Obtención del adulto de *T. solium*

Se realizaron necropsias de los hámsteres a los 2, 4, 8, 12, 16, 20 y 24 DPI. Los animales se sacrificaron por dislocación cervical siguiendo la Ley de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (Salud y Bienestar Animal). Posteriormente se extrajo el intestino delgado, se colocó en una caja petri con solución PBS y se hizo un corte longitudinal del mismo. Se localizó el área de implantación de las tenias a simple vista o con ayuda de un estereoscopio, se midió la distancia a partir del píloro a la cual se encontraban los sitios de anclaje de las tenias y se contó el número de parásitos. Se verificó la especie parasitaria observando el escólex provisto de cuatro ventosas y un rostelo armado con una doble corona de ganchos. Se tomaron muestras de un centímetro de longitud de la mucosa intestinal correspondiente al sitio de anclaje de las tenias en el duodeno-yeyuno.

Procesamiento de las muestras de tejido para cortes histológicos

Las muestras se fijaron en paraformaldehído al 10% amortiguado con fosfatos (29 mM NaH_2PO_4 , 46 mM Na_2HPO_4) y se deshidrataron paulatinamente con etanol a diferentes concentraciones (70%, 80%, 90% y 100%) para posteriormente ser embebidas en parafina durante 12 horas. Se hicieron cortes de 4 a 6 μm que fueron montados en portaobjetos tratados con silano. Las laminillas se mantuvieron a 4°C hasta su uso.

Tratamiento de portaobjetos con silano

Los portaobjetos se introdujeron en una solución con 3-aminopropil-trietoxisilano al 2% en acetona durante 30 minutos. Posteriormente se hicieron tres lavados con agua MiliQ y se dejaron secar a 37°C durante 30 minutos.

Marcaje de oligonucleótidos con digoxigenina (DIG)

Los oligonucleótidos se disolvieron en agua MiliQ tratada con dietilpirocarbonato (DEPC) y en un tubo de 1.5 ml se realizó la siguiente mezcla: 4 μL de amortiguador 1 (concentrado 5X), 4 μL de CoCl_2 25mM, 100 pmol de oligonucleótido, 1 μL de DIG-dUTP (Digoxigenina-11-dUTP 1mM), 1 μL de ATP, 1 μL de solución 1, agua MiliQ tratada con DEPC cbp 20 μL . Se homogenizó la mezcla, se incubó a 37°C durante 15 minutos, e inmediatamente después se colocó en hielo. Se agregaron 2 μL de la solución 2 a la mezcla de reacción, la cual se incubó durante diez minutos a 4°C. Posteriormente se adicionaron 2.5 μL de LiCl 4M, 75 μL de etanol al 100% pre-enfriado a -20°C, se mezcló bien y se dejó en reposo hasta la formación de un precipitado (aproximadamente 24 h a -70°C). Se centrifugó el tubo de reacción a 13000 x g a

4°C durante 15 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el botón en 50 μ L de etanol al 70% pre-enfriado a -20°C. Se centrifugó nuevamente a 13000 x g durante 15 minutos a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y el precipitado se secó al vacío (Fig. 8).

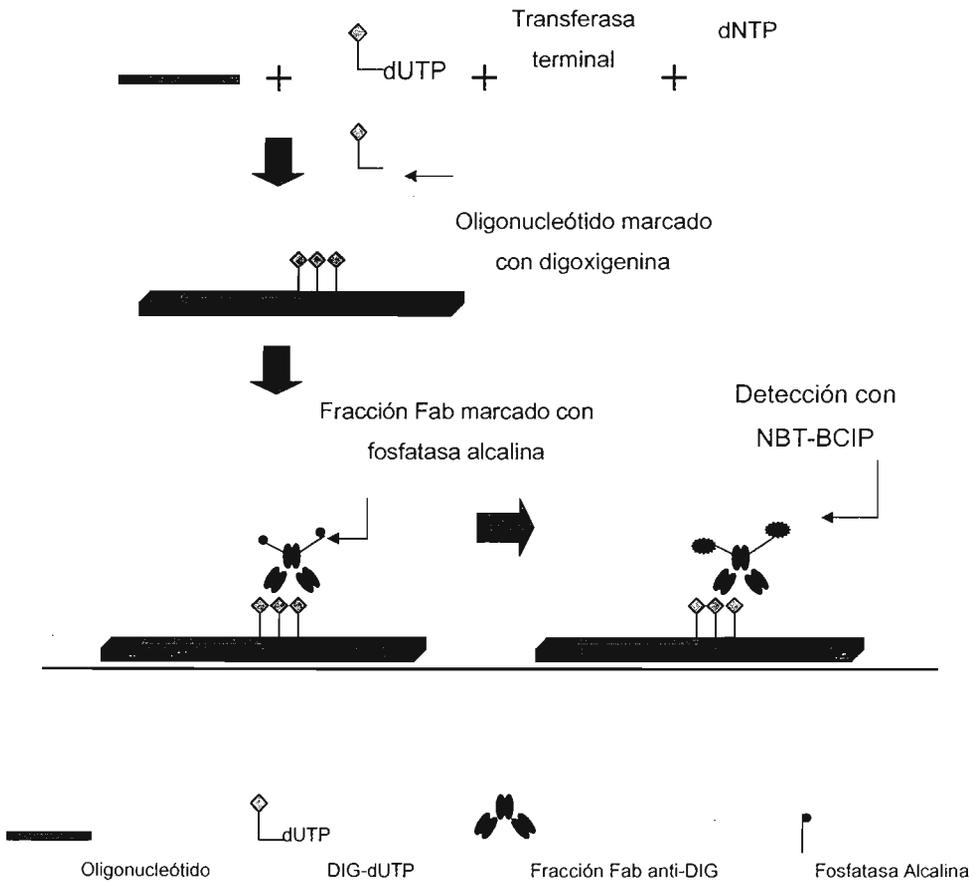


Fig. 8. Esquema de marcaje de oligonucleótidos y detección de los mismos.

Cuantificación del marcaje de los Oligonucleótidos

Para verificar que los oligonucleótidos estuvieron bien marcados, se hicieron diluciones seriadas según las instrucciones del fabricante (Roche) de los oligonucleótidos marcados y del control del Kit (DNA marcado con DIG) (Cuadros 1 y 2). Se colocó 1 μ L de cada dilución en una membrana nylon para el control y en otra membrana se hizo lo mismo para el oligonucleótido problema (Fig. 9).

Cuadro 1. Diluciones del Control del Kit (DNA marcado con DIG)

| Tubo | Concentración inicial del control marcado | Dilución | Concentración final | Factor de dilución |
|------|-------------------------------------------|-----------------------------------------|---------------------|--------------------|
| A | 2.5 pmol | 0.5 μ L /20 μ L de amortiguador | 50 fmol/ μ L | 1:50 |
| B | 50 fmol/ μ L | 2.5 μ L /10 μ L de amortiguador | 10 fmol/ μ L | 1:250 |
| C | 10 fmol/ μ L | 2.5 μ L /10 μ L de amortiguador | 2 fmol/ μ L | 1:1250 |
| D | 2 fmol/ μ L | 2.5 μ L /10 μ L de amortiguador | 0.4 fmol/ μ L | 1:6260 |
| E | 0.4 fmol/ μ L | 2.5 μ L /10 μ L de amortiguador | 0.08 fmol/ μ L | 1:31250 |

Cuadro 2. Diluciones del Oligonucleótido Problema

| Tubo | Dilución del oligonucleótido problema marcado | Factor de dilución |
|------|-----------------------------------------------|--------------------|
| A | 0.5 μ L/20 μ L agua MiliQ DEPC | 1:50 |
| B | 2.5 μ L/10 μ L agua MiliQ DEPC | 1:250 |
| C | 2.5 μ L/10 μ L agua MiliQ DEPC | 1:1250 |
| D | 2.5 μ L/10 μ L agua MiliQ DEPC | 1:6260 |
| E | 2.5 μ L/10 μ L agua MiliQ DEPC | 1:31250 |

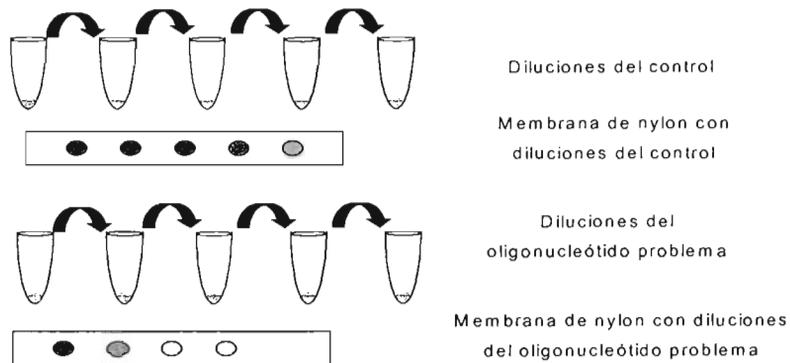


Fig. 9. Esquema de verificación y cuantificación del marcaje de los oligonucleótidos.

Los ácidos nucleicos se fijaron a la membrana de nylon por entrecruzamiento con rayos UV o mediante calor en horno a 120°C durante 30 minutos. Posteriormente, la membrana se sumergió y agitó en amortiguador de lavado durante 10 minutos, se desechó la solución y después se embebió en solución de bloqueo durante 30 minutos a temperatura ambiente. La membrana se sumergió en una solución con anti-DIG (fracción Fab de anticuerpos de cabra) marcado con fosfatasa alcalina (FA) diluida 1:5000 en solución de bloqueo y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Pasado el tiempo de incubación, se lavó la membrana con amortiguador de lavado durante 15 minutos a temperatura ambiente, el lavado se repitió en dos ocasiones más. La membrana se incubó en amortiguador 3 durante 5 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se eliminó el amortiguador. Se agregó el amortiguador de detección, se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente y pasado el tiempo se eliminó. Se permitió el desarrollo del color incubando el tubo de reacción en la oscuridad. La reacción se detuvo lavando la membrana con amortiguador TE. Se secó la membrana a temperatura ambiente y se compararon las intensidades del control con las diluciones de los oligonucleótidos problemas.

Hibridación *in situ*

Prehibridación

Las laminillas se desparafinaron en horno a 60°C durante 2 horas. Se sumergieron en xilol inmediatamente después, haciendo dos cambios de 10 minutos cada uno. Posteriormente se pasaron las laminillas por diferentes concentraciones de alcoholes etílicos para hidratar el tejido (etanol 100%, etanol 100%, etanol 90%, etanol 80%, etanol 70%) agitando en cada cambio durante 10 minutos en plancha de agitación.

Una vez hidratados los tejidos, se hicieron dos lavados con PBS en plancha de agitación a temperatura ambiente. Se hizo un tratamiento a los cortes de tejido de antes del proceso de hibridación:

- a. Se permeabilizaron los cortes de tejido con proteinasa K a una concentración de 10µg/ml en amortiguador Tris 100 mM pH 7.5, se incubó durante 30 min a 37°C.
- b. Se lavaron con PBS durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- c. Posteriormente, las laminillas se embebieron en glicina 0.2% durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- d. Se lavaron con PBS durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- e. Los tejidos se trataron con solución TA y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- f. Se lavaron con PBS durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- g. Posteriormente se pasaron las laminillas por una serie de alcoholes etílicos graduales para deshidratar el tejido (etanol 70%, etanol 80%, etanol 90%, etanol

100%, etanol 100%) agitando en cada cambio durante 10 minutos a temperatura ambiente en plancha de agitación.

Hibridación

A continuación se delimitaron los cortes de tejido con lápiz punta diamante y se colocó la solución de prehibridación (solución de hibridación sin sonda) sobre el tejido. Posteriormente se alineó el RNA blanco a 93°C durante 3 minutos en plancha de hibridación e inmediatamente después se enfriaron los cortes durante 10 min en plancha de hielo (colocar arriba de hielo un papel aluminio). Posteriormente los cortes de tejido se colocaron en una cámara húmeda y ésta se puso en baño maría durante una hora a 65°C. Enseguida se quitó el exceso de amortiguador de hibridación y se colocó el amortiguador de hibridación con el oligonucleótido marcado con DIG (concentración de la sonda marcada con DIG = 100 ng por corte), se alineó el RNA blanco a 93°C durante 3 minutos en plancha de hibridación e inmediatamente después se enfriaron los cortes durante 10 min en plancha de hielo. Las laminillas se colocaron en una cámara húmeda y se dejaron en incubación en Baño María a 65°C durante toda la noche.

Posthibridación

- a. Se hicieron dos lavados con SSC 2X agitando durante 10 minutos a temperatura ambiente en plancha de agitación.
- b. Las laminillas se trataron con RNAasa a una concentración de 100 µg/ml en amortiguador de RNAasa durante 30 min a 37°C.
- c. Se hizo un lavado con SSC 2X durante 30 min a 37°C.

- d. Los cortes de tejido se trataron con fórmamida al 60% en SSC 0.2X durante 10 min a 65°C (dos cambios).
- e. Se hicieron dos lavados con SSC 2X agitando durante 10 minutos a temperatura ambiente en plancha de agitación.

Detección inmunológica

Posterior a la hibridación se hizo la detección inmunológica de las sondas siguiendo la secuencia:

1. Las laminillas se sumergieron en amortiguador 3 durante 10 minutos.
2. Posteriormente se sacaron las laminillas del amortiguador, se les eliminó el exceso y se colocó sobre los tejidos levamisol 2.5 mM en amortiguador 3.
3. Los cortes de tejido se colocaron en una cámara húmeda y se hizo una incubación a 60°C durante una hora.
4. Se lavaron las laminillas con amortiguador TN durante 10 minutos a temperatura ambiente en plancha de agitación (dos cambios).
5. Se agregó a las laminillas mezcla bloqueadora al 5% en amortiguador TN, posteriormente se colocaron en cámara húmeda y ésta se incubó a temperatura ambiente durante una hora.
6. Se eliminó el exceso de mezcla bloqueadora y se agregó el anticuerpo anti Dígoxigenina (α -DIG) (concentración α -DIG = 1:500 disuelto en la solución bloqueadora al 5%). Se incubó a 4°C en cámara húmeda durante toda la noche.
7. Se realizaron dos lavados con amortiguador de lavado, agitando durante 10 minutos en plancha de agitación.

8. Los cortes de tejido se incubaron en amortiguador 3 durante 10 minutos a temperatura ambiente.
9. Se reveló con amortiguador de detección, hasta el desarrollo de color, en cámara húmeda en oscuridad.
10. Las laminillas se incubaron en amortiguador TE durante 10 minutos a temperatura ambiente.
11. Se hicieron dos lavados con PBS agitando durante 10 minutos a temperatura ambiente en plancha de agitación.
12. Los cortes de tejido se contratiñeron con Rojo Rápido Nuclear (RRN) durante 5 minutos a temperatura ambiente.
13. Se hicieron 2 lavados con PBS agitando durante 6 minutos a temperatura ambiente en plancha de agitación.
14. Posteriormente se pasaron las laminillas por una serie de alcoholes etílicos graduales para deshidratar el tejido (etanol 70%, etanol 80%, etanol 90%, etanol 100%, etanol 100%) agitando en cada cambio durante 10 minutos en plancha de agitación.
15. Las laminillas se sumergieron en xilol durante una hora.
16. Finalmente se montaron las laminillas en resina base xileno y se dejaron secar durante 24 horas.

RESULTADOS

Obtención del adulto de *T. solium*

Se infectaron hámsteres por vía oral con ocho cisticercos de *T. solium*, se hicieron necropsias a los 2, 4, 8, 12, 16 20 y 24 DPI. Posteriormente se extrajo el intestino delgado, se localizó el sitio de implantación de las tenias, se tomaron muestras de un centímetro de longitud de la mucosa intestinal correspondiente al sitio de anclaje de las tenias en el duodeno-yeyuno y se contó el número de parásitos. Se verificó la especie parasitaria observando el escólex provisto de cuatro ventosas y un rostelo armado con una doble corona de ganchos. En el cuadro 3 se muestra el número de tenias obtenidas y el porcentaje de recuperación de parásitos adultos por cada animal, así como la longitud de los parásitos recuperados. Se observó que a mayor tiempo de infección las tenias recuperadas fueron de mayor longitud, haciéndose notar la gran diferencia en los primeros días post infección y a los 24 DPI. El porcentaje de recuperación del parásito adulto fue del 62.5%, es decir que de ningún hámster se pudieron recuperar las ocho tenias, y sólo en tres animales no se obtuvieron tenias. El número de tenias recuperadas fue variable y no se pudo ver una correlación entre el tiempo de infección y el porcentaje de infección.

| DPI | Hámster | Núm. de tenias | % de Infección | Longitud tenias (mm) |
|-----|---------|----------------|----------------|------------------------|
| 2 | 35 | 3 | 37.5 | 1, 1, 1 |
| 2 | 13 | 2 | 25 | 1, 1 |
| 2 | 11 | 1 | 12.5 | 1 |
| 4 | 37 | 0 | 0 | - |
| 4 | 16 | 0 | 0 | - |
| 4 | 4 | 4 | 50 | 4, 3, 3, 3 |
| 6 | 12 | 0 | 0 | - |
| 6 | 10 | 2 | 25 | 7, 8 |
| 6 | 33 | 2 | 25 | 5, 5 |
| 8 | 17 | 3 | 37.5 | 3, 10, 10 |
| 8 | 26 | 5 | 62.5 | 10, 10, 10, 10, 5 |
| 8 | 6 | 4 | 50 | 10, 10, 10, 7 |
| 12 | 36 | 2 | 25 | 30, 20 |
| 12 | 21 | 3 | 37.5 | 20, 15, 8 |
| 12 | 15 | 5 | 62.5 | 20, 20, 10, 10, 8 |
| 16 | 34 | 4 | 50 | 50, 45, 25, 20 |
| 16 | 8 | 4 | 50 | 50, 40, 30, 15 |
| 16 | 38 | 6 | 75 | 50, 50, 40, 30, 30, 15 |
| 20 | 25 | 5 | 62.5 | 100, 70, 50, 50, 30 |
| 20 | 23 | 2 | 25 | 130, 110 |
| 20 | 28 | 3 | 37.5 | 130, 110, 80 |
| 24 | 32 | 1 | 12.5 | 90 |
| 24 | 24 | 2 | 25 | 50, 30 |
| 24 | 19 | 1 | 12.5 | 140 |

Cuadro 3. Recuperación de tenias del intestino delgado de hámsteres infectados con cisticercos de *T. solium*.

Estandarización de la Técnica de HIS

1. Marcaje de las sondas

Las sondas para α -Tub, HPV e IL-5 se marcaron con dUTP-DIG, posteriormente se verificó el marcaje en membranas de nylon por medio de la técnica de inmunopunto de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Fig. 10).

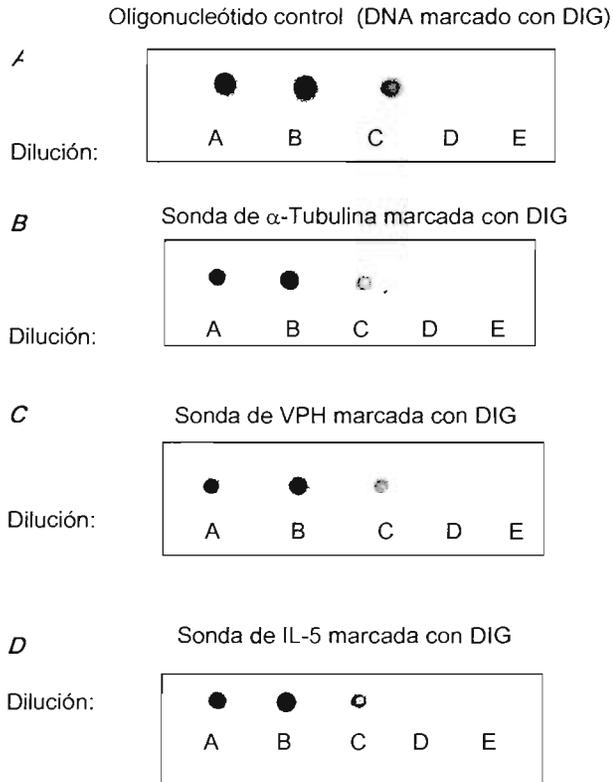


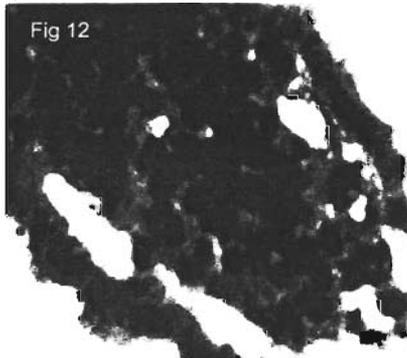
Fig 10. Inmunopunto de oligonucleótidos marcados con digoxigenina. *A*: oligonucleótido de DNA control, *B*: sonda de α -Tubulina, *C*: sonda de VPH, *D*: sonda de IL5.

Se compararon visualmente las marcas de las sondas problema con un oligonucleótido de referencia (DNA marcado con DIG) cuya concentración era conocida y se hicieron los cálculos correspondientes para conocer la concentración de las sondas marcadas. Como puede observarse en la figura 10, las sondas para α -Tub, HPV e IL-5 si se marcaron con DIG y las concentraciones fueron de 92.35 ng/ μ L, 86.12 ng/ μ L y 86.12 ng/ μ L respectivamente.

La estandarización de la técnica de HIS se llevó a cabo utilizando una sonda complementaria (5'- GATGGAAGACACAATCTGGC- 3') a la secuencia de α -Tub como control positivo y como control negativo se utilizó una sonda complementaria (5'- GTTGCAGCTCTGTGCATA- 3') a una secuencia de VPH. Al hacer las primeras hibridaciones, se observó que los cortes de tejido estaban teñidos en su totalidad de color morado, presentando una respuesta altamente positiva tanto para el control positivo como para el negativo, poniéndose de manifiesto la actividad la fosfatasa alcalina (FA) endógena que emplea como sustrato al NBT-BCIP (Figs. 11 y 12).

2. Inactivación de la actividad de la Fosfatasa Alcalina endógena

Para evitar la generación de resultados falsos positivos por el efecto de la FA endógena, se realizaron experimentos con cortes de tejido utilizando diferentes concentraciones de levamisol e incubando las preparaciones a diferentes temperaturas y tiempos. En estos experimentos no se agregó la sonda control de α -Tub ni el anticuerpo de detección marcado con FA, realizándose únicamente la detección enzimática con el sustrato NBT-BCIP.



Figs 11 y 12. Micrografías de cortes de intestino delgado de hámster donde se pone de manifiesto la actividad de la fosfatasa alcalina endógena al agregar el sustrato (nitroazul de tetrazolio/5-bromo, 4-cloro, 3-indolil fosfato).

En los ensayos con levamisol a diferentes concentraciones se observó una disminución considerable, de muy alta a mediana en la actividad de la FA del tejido a partir de la concentración 2.5 mM. Al aumentar la concentración del inhibidor (levamisol), la actividad de la enzima no disminuyó más (Cuadro 4).

| Laminilla | Levamisol (mM) | Positividad de la reacción |
|-----------|----------------|----------------------------|
| A | 0 | +++++ |
| B | 1 | +++++ |
| C | 2.5 | +++ |
| D | 5 | +++ |
| E | 10 | +++ |

Cuadro 4. Inhibición de la actividad de la fosfatasa alcalina endógena con levamisol. Los cortes de intestino delgado de hámsteres infectados con *T. solium* se incubaron con diferentes concentraciones de levamisol durante una hora a temperatura ambiente. Respuesta: +++++ muy alta, ++++ alta, +++ mediana, ++ baja, +muy baja, - nula.

Cuando se usaron diferentes temperaturas para inactivar la FA endógena, se observó que la actividad de la enzima disminuyó a 60°C, pasando de muy alta a mediana, pero no se logró inactivar por completo (Cuadro 5). Al combinar el empleo de levamisol y temperatura como factores inhibidores, se observó que utilizando una concentración de 2.5 mM de levamisol e incubando a 60°C durante una hora se abolió la actividad de la fosfatasa alcalina endógena (Cuadro 6).

| Laminilla | Tiempo incubación (min) | Positividad de la reacción |
|-----------|-------------------------|----------------------------|
| A | 0 | +++++ |
| B | 30 | +++++ |
| C | 45 | +++++ |
| D | 60 | +++ |

Cuadro 5. Inhibición de la actividad de la fosfatasa alcalina endógena. Los cortes de tejido se incubaron a 60°C durante diferentes tiempos. Respuesta: +++++: muy alta, ++++: alta, +++: mediana, ++: baja, +: muy baja, -: nula.

| Laminilla | Tiempo incubación (min) | Positividad de la reacción |
|-----------|-------------------------|----------------------------|
| A | 1 | +++++ |
| B | 15 | +++++ |
| C | 30 | ++ |
| D | 45 | ++ |
| E | 60 | - |

Cuadro 6. Inhibición de la actividad de la fosfatasa alcalina endógena. Los cortes de tejido se incubaron con 2.5 mM de levamisol a 60°C durante diferentes tiempos. Respuesta: +++++: muy alta, ++++: alta, +++: mediana, ++: baja, +: muy baja, -: nula.

3. Prehibridación

Para evitar la generación de falsos negativos, se hizo un tratamiento de acetilación de los cortes de tejido con trietanolamina 0.1N y anhídrido acético al 25% y de carboxilación con DEPC al 0.1%, lo que permitió que entrara la sonda con la acetilación y no se degradara el RNA presente en los tejidos con la carboxilación, evitándose que se generaran falsos negativos.

4. Permeabilización

Se utilizó proteinasa K para permeabilizar el tejido y permitir la entrada de la sonda de α -Tub a las células. Con este fin, se realizó una curva de valoración de entrada de la sonda y daño en el tejido a causa de la permeabilización con 10 $\mu\text{g/mL}$ de dicha enzima a diferentes tiempos y temperaturas. Como se observa en el cuadro 7, el incremento en la concentración de proteinasa K a temperatura ambiente y a 37°C aumenta la entrada de la sonda y el daño en el tejido. En ambas condiciones de temperatura se encontró que el tejido requiere como mínimo 5 minutos de tratamiento con la proteinasa K para permitir la entrada de la sonda a las células (laminillas C y J). Sin embargo, se observó mucho daño en el tejido cuando los cortes se incubaron a temperatura ambiente por tiempos \geq a 20 minutos ó cuando fueron incubados a 37°C durante 15 minutos o más; razón por la cual se descartaron dichas condiciones de trabajo (Cuadro 6, laminillas F, G, L, M y N). Cuando se incubó a 37°C durante 10 minutos, la entrada de la sonda fue alta y el daño en el tejido menor, por lo que se escogieron esas condiciones para la permeabilización del tejido con la proteinasa K (Cuadro 7, laminilla K).

| Laminilla | Proteinasa K (10 µg/ml) | Tiempo (min) | Entrada de la sonda | Daño del tejido |
|-----------|----------------------------|-----------------|------------------------|-----------------|
| A | Temp Amb | 0 | - | - |
| B | | 1 | - | - |
| C | | 5 | + | + |
| D | | 10 | ++ | +++ |
| E | | 15 | +++ | +++ |
| F | | 20 | ++++ | +++++ |
| G | | 25 | +++++ | +++++ |
| H | 37°C | 0 | - | - |
| I | | 1 | - | - |
| J | | 5 | ++ | ++ |
| K | | 10 | ++++ | +++ |
| L | | 15 | +++++ | +++++ |
| M | | 20 | +++++ | +++++ |
| N | | 25 | +++++ | +++++ |

Cuadro 7. Permeabilización de cortes de intestino delgado de hámster con proteinasa K (10 µg/mL) a diferentes tiempos y temperaturas. Respuesta: +++++: muy alta, ++++: alta, +++: mediana, ++: baja, +: muy baja, -: nula.

Una vez determinadas las condiciones de levamisol y proteinasa K, se hicieron ensayos para conocer la concentración de sonda necesaria en la hibridación. A concentraciones de 30 y 50 ng de sonda, no se detectaba claramente la marca, sin embargo se observó que con 100 ng de sonda fue posible detectar de manera clara y abundante la reacción positiva en los tejidos hibridados con α -Tub, ya que se pudo ver un puntilleo de color morado característico. En estos ensayos no se detectó señal con la sonda de VPH (control negativo), confirmando la inexistencia de hibridaciones inespecíficas (Cuadro 8).

| Laminilla | Oligonucleótido | Concentración de la sonda (ng) | Señal de la sonda |
|-----------|-----------------|--------------------------------|-------------------|
| A | α -Tub | 30 | ++ |
| B | α -Tub | 50 | +++ |
| C | α -Tub | 100 | +++++ |
| D | HPV | 30 | - |
| E | HPV | 50 | - |
| F | HPV | 100 | - |

Cuadro 8. Hibridación de las sondas control a diferentes concentraciones en cortes de tejido de intestino delgado de hámsteres. Respuesta: +++++: muy alta, ++++: alta, +++: mediana, ++: baja, +: muy baja, -: nula.

Empleando las condiciones previamente determinadas (levamisol 2.5 mM durante 1 h a 60°C, proteinasa K 10 μ g/mL durante 10 minutos a 37°C y 100 ng de sonda) se realizó la HIS en cortes de intestino delgado de hámsteres que fueron contra-teñidos con rojo rápido nuclear. En la figura 13 se observa la hibridación de la sonda de α -Tub en una vellosidad de la mucosa (Fig. 13A) y a nivel de las criptas de Lieberkühn, en la submucosa y en la muscular de la mucosa (Fig. 13B). La sonda de VPH no produjo señal, por lo que el tejido se observa teñido de rojo únicamente (Figs. 13C y 13D).

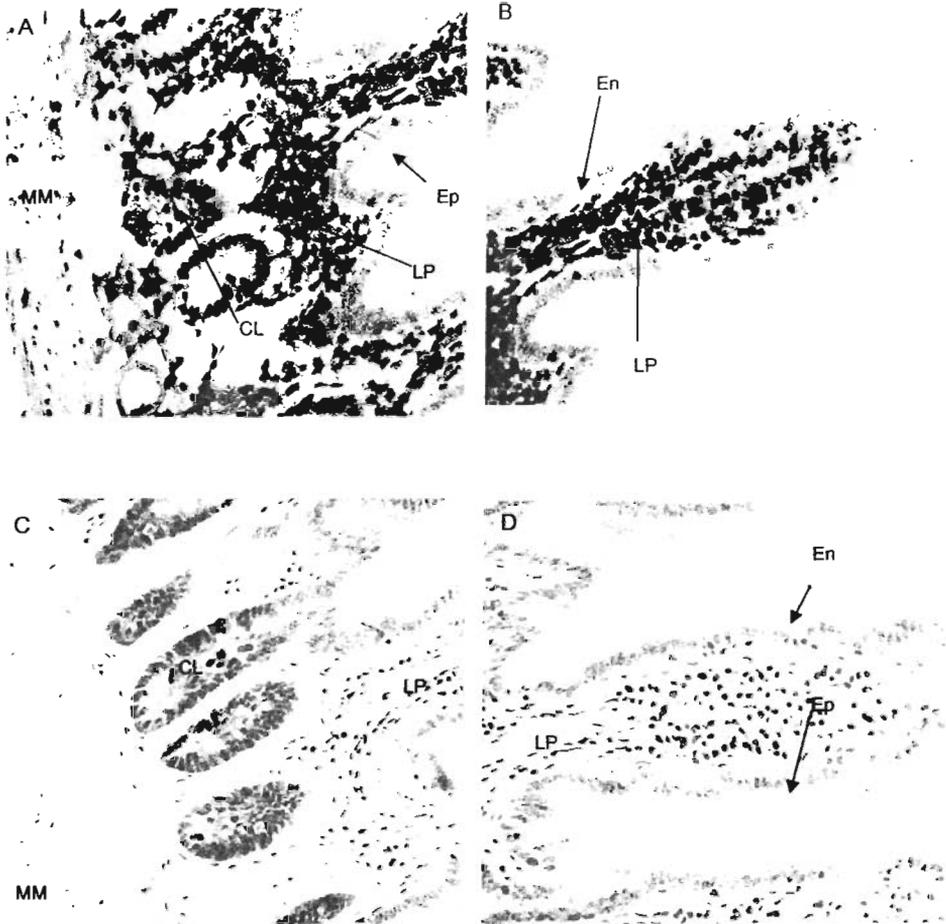


Fig 13. HIS de la sonda de α -Tubulina (A yB) y HPV en (C y D) en cortes de mucosa intestinal de hámsteres contra-teñidos con rojo rápido nuclear. Figs. A y B: Marca positiva en el área de la mucosa [criptas de Lieberkühn (CL), la lámina propia (LP) y a lo largo del epitelio (Ep) en los enterocitos (En)] y en la muscular de la mucosa (MM). Figs. C y D: El color rojo es característico de la tinción de los núcleos celulares con el reactivo rojo rápido nuclear; no hay detección de marca positiva.

HIS del la sonda de IL-5 en la mucosa intestinal de hámsteres infectados con *T. solium*

Los ensayos de HIS empleando la sonda complementaria para el mRNA de IL-5, mostraron que en los cortes de hámsteres infectados la positividad de la reacción se incrementó gradualmente conforme aumentaron los días de la infección, de manera que a los 2 y 4 DPI la reacción fue mínima, igual a la que presentaron los animales no infectados (Figs.14 y 15). La localización de una reacción positiva de HIS en los hámsteres del grupo control* (Fig. 14 A y B) y de los infectados y sacrificados a los 2 y 4 DPI, se observó principalmente en las células de la capa muscular y en la submucosa (Fig. 14 C y D; Fig. 15 A y B).

En las biopsias tomadas a los 8 DPI la reacción positiva se observó además en las vellosidades, tanto en la zona del epitelio como en la lámina propia, aunque se encontraron pocas células positivas (Fig. 15 C y D). A los 12, 16, 20 y 24 DPI hubo un incremento en el número de células positivas por HIS en las diferentes regiones de la mucosa intestinal de los hámsteres infectados con *T. solium* (Fig. 16 y 17), pero la mayor cantidad de células positivas se observaron en la lámina propia y en la región de las criptas de Lieberkühn (Fig. 17 A-D). En el cuadro nueve se resumen estos resultados.

* Debido a que en todos los controles se observó la misma positividad de la reacción, sólo se presentan dos micrografías: 14 A y B.

| DPI | Hámster control | Hámster infectado |
|-----|-----------------|-------------------|
| 2 | + | + |
| 4 | + | + |
| 8 | + | +++ |
| 12 | + | +++ |
| 16 | + | +++ |
| 20 | + | +++++ |
| 24 | + | +++++ |

Cuadro 9. Detección de mRNA para IL-5 mediante hibridación *in situ* en cortes de intestino delgado de hámsteres infectados con *T. solium* y no infectados (controles) a diferentes DPI. Positividad de la reacción: +++++: muy alta, ++++: alta, +++: mediana, ++: baja, +: muy baja, -: nula.

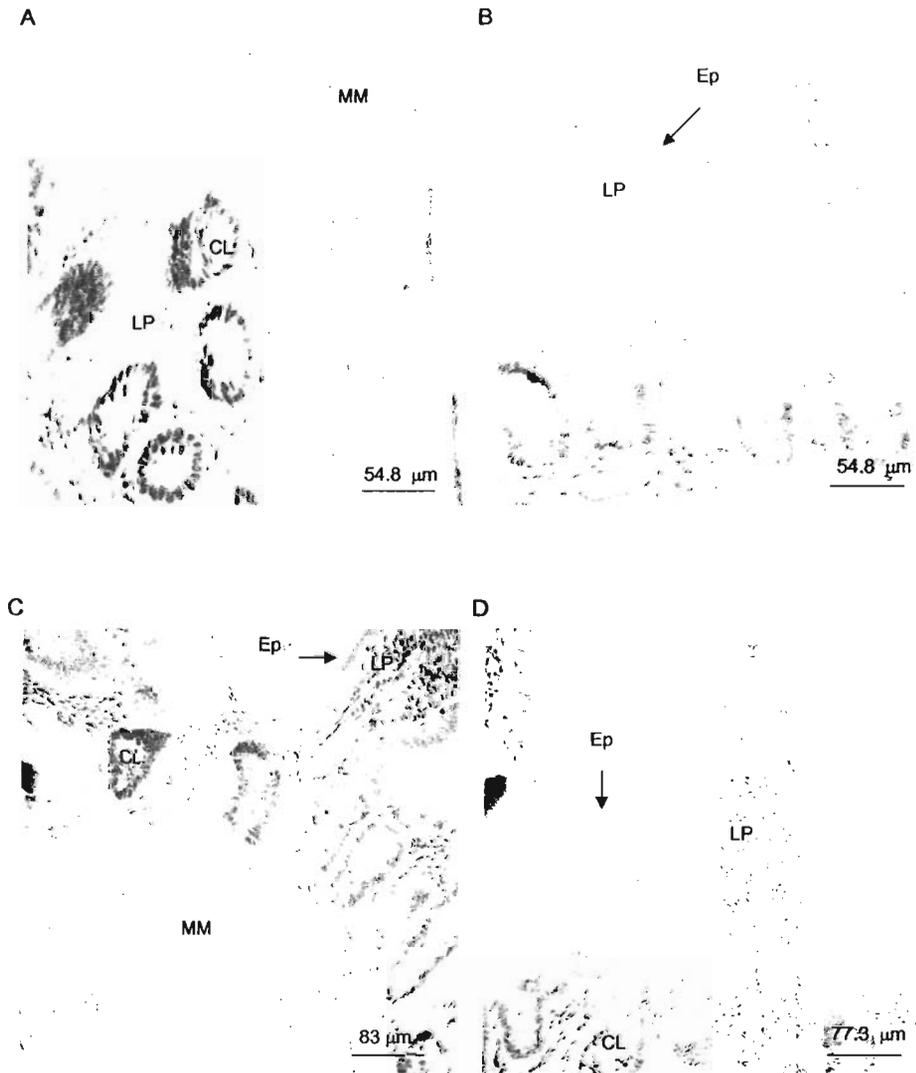


Fig 14. HIS con la sonda para IL-5 en cortes de intestino delgado de hámsteres infectados con *T. solium*. A y B: control no infectado. C y D: biopsias de animales infectados tomadas a los 2 DPI. CL: criptas de Lieberkühn. LP: lámina propia, Ep: epitelio, En: enterocitos, MM: muscular de la mucosa.

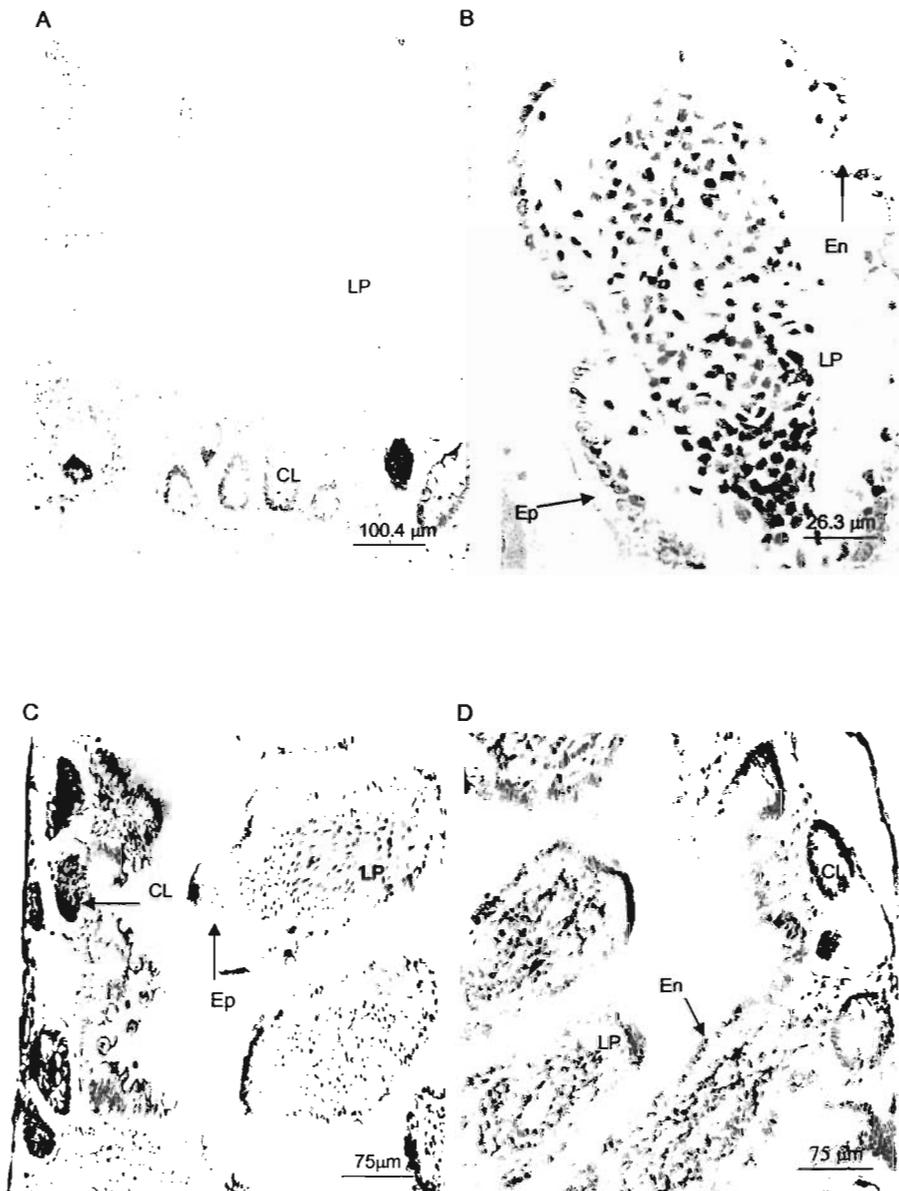


Fig 15. HIS con la sonda para IL-5 en cortes de intestino delgado de hámsteres infectados con *T. solium*. A y B: biopsias tomadas a los 4 DPI. C y D: biopsias tomadas a los 8 DPI. CL: criptas de Lieberkühn, LP: lámina propia, Ep: epitelio, En: enterocitos, MM: muscular de la mucosa.

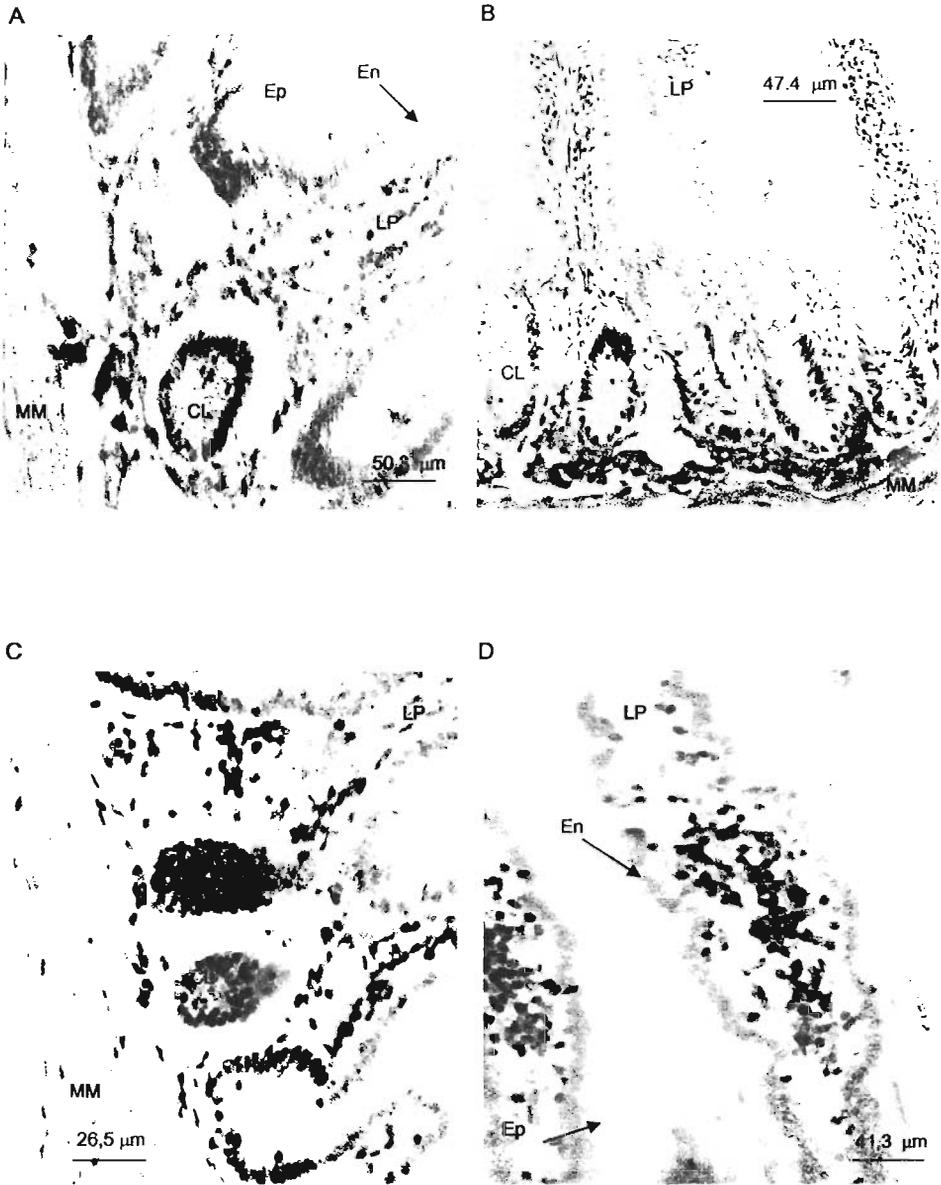


Fig 16. HIS con la sonda para IL-5 en cortes de intestino delgado de hámsteres infectados con *T. solium*. A y B: biopsias tomadas a los 12 DPI. C y D: biopsias tomadas a los 16 DPI. CL: criptas de Lieberkühn, LP: lámina propia, Ep: epitelio, En: enterocitos, MM: muscular de la mucosa.



Fig 17. HIS con la sonda para IL-5 en cortes de intestino delgado de hámsteres infectados con *T. solium*. A y B: biopsias tomadas a los 20 DPI. C y D: biopsias tomadas a los 24 DPI. CL: criptas de Lieberkühn, LP: lámina propia, Ep: epitelio, En: entericitos, MM: muscular de la mucosa.

DISCUSIÓN

El modelo experimental de teniosis que se ha utilizado con mayor frecuencia para determinar parámetros parasitológicos del adulto de *T. solium* ha sido el del hámster dorado, en donde se observó que la tenia puede implantarse y desarrollar hasta la formación de proglótidos maduros, sin la formación de proglótidos grávidos y huevos maduros e infectivos.^{32,33,35} En el presente trabajo se corroboró la susceptibilidad del hámster dorado para la infección por *T. solium*, ya que los animales se infectaron y se obtuvieron tenias con diferentes grados de desarrollo.

En el modelo del hámster dorado se han realizado diferentes estudios tendientes a conocer la relación hospedero parásito en teniosis. Al respecto, se demostró que *T. solium* sensibiliza al sistema inmunitario e induce una respuesta que puede medirse mediante la detección de anticuerpos específicos dirigidos contra el parásito.³¹ En cuanto a la respuesta celular, se estudió la respuesta inflamatoria en la mucosa intestinal de hámsteres infectados con *T. solium* y no inmunodeprimidos con esteroides, se observó una reacción inflamatoria localizada en la mucosa intestinal que rodea a los escólices del parásito, la cual esta conformada por macrófagos, células plasmáticas, eosinófilos, células caliciformes y muy pocos mastocitos; en segmentos de intestino delgado cercanos al ciego, en donde no se adhieren las tenias, no hay desarrollo de respuesta inflamatoria.^{32,37}

T. solium también puede crecer en jerbos infectados experimentalmente y alcanza un desarrollo igual al que presenta en hámsteres; en este otro roedor también se estudió la

respuesta inflamatoria que se desarrolla contra la tenia y se observó que los jerbos montan una reacción inflamatoria muy intensa en contra de *T. solium*, donde se observa un gran incremento en el número de células caliciformes y cebadas.³²

Por otro lado, Sato y colaboradores (1994), estudiaron la respuesta inmune humoral e inflamatoria en hámsteres infectados con diferentes números de cisticercos de *T. crassiceps*; observaron aumento en el número de células cebadas de lámina propia en la porción del intestino donde estaban ancladas las tenias y también en la actividad de las enzimas eosinófil-peroxidasa y mieloperoxidasa en homogenizados de intestino delgado de esa región, el incremento de las enzimas y de células cebadas estaba relacionado directamente con el número de tenias encontradas. Durante el tiempo en que se observó la mayor expulsión de tenias, la actividad de las enzimas también fue mayor, por lo que estos autores proponen que los eosinófilos y las enzimas que liberan pueden tener un papel importante en la expulsión de *T. crassiceps* en el modelo del hámster dorado⁷¹

En ratas Sprague Dawley infectadas con el céstodo *Hymenolepis diminuta*, también se observó incremento en el número de células cebadas y eosinófilos presentes en la lámina propia y en submucosa, mientras que en la muscular de la mucosa sólo hubo aumento de eosinófilos.⁷² Sin embargo, estos autores no relacionan la expulsión del parásito con el aumento de estas dos poblaciones celulares debido a que la cepa de ratas utilizadas mantiene la infección por largos periodos, por lo que proponen la existencia de otros mecanismos de tipo fisiológico que estén involucrados.

La respuesta inmune que se genera durante las infecciones por helmintos se caracteriza por la presencia de mastocitosis, aumento en el número de eosinófilos e incremento en los niveles de anticuerpos IgE,⁴³ y dependiendo del parásito y del hospedero, estas poblaciones celulares pueden o no estar relacionadas con la expulsión de los parásitos.⁷³ El hámster dorado infectado con *T. solium* presenta aumento de eosinófilos en la mucosa intestinal que rodea al escólex del parásito, el incremento puede observarse desde los 6 DPI y continua en ascenso hasta los 18 DPI donde se observa el mayor número de células por vellosidad, posteriormente se mantienen elevados hasta la eliminación de las tenias.⁷⁴ Aunque no se sabe el papel que puedan llevar a cabo los eosinófilos en la expulsión de las tenias, es probable que ejerzan una función similar como la observada en hámsteres infectados por *T. crassiceps*.

Se ha demostrado que la IL-5 es responsable de la activación y proliferación de eosinófilos *in vivo*,^{75,76} siendo una de las primeras citocinas que se expresa en el intestino durante las infecciones causadas por helmintos.⁷⁷ Debido a que los hámsteres infectados con *T. solium* desarrollan un incremento continuo de eosinófilos en la mucosa intestinal, es importante determinar si en estos roedores al igual que en los ratones, se sintetiza IL-5, si tiene las mismas funciones, así como el tiempo en el cual comienza su síntesis durante la infección experimental.

Debido a que no se tienen reactivos comerciales para poder detectar inmunológicamente a la IL-5 a nivel sistémico o local en el hámster, en el presente estudio se decidió determinar esta citocina por métodos de biología molecular. Para ello se optó por utilizar técnicas que detectan mRNA, ya que la expresión del mRNA es un indicativo de la activación celular, porque al existir un estímulo, se induce la transcripción de mRNA y su posterior traducción para la

síntesis de proteínas. Entre las técnicas de detección de mRNA, la hibridación *in situ* es un método muy sensible y exitoso para la localización de ácidos nucleicos específicos en células individuales con la preservación de la morfología celular,⁷⁸ de manera que el presente estudio tuvo como finalidad la estandarización de la técnica de hibridación *in situ* de sondas complementarias a un fragmento de la secuencia del mRNA que codifica para IL-5, así como realizar una cinética de su expresión en hámsteres infectados con *T. solium*.

Para poder determinar por hibridación *in situ* el mRNA para IL-5, primero fue necesario estandarizar la técnica con dos sondas controles no relacionadas, en la bibliografía se recomienda utilizar mRNA mensajero cuya expresión no sea inducida, sino que se mantenga constante,⁶⁹ por lo que en el presente estudio se escogió como control positivo una sonda complementaria a la secuencia de α -Tub por ser un gen constitutivo o de mantenimiento. Para el control negativo se necesita una sonda cuyo blanco no esté presente en las células a estudiar, por lo cual se seleccionó una sonda complementaria al mRNA de una proteína del virus del papiloma humano que no afecta a hámsteres.

Si bien, la técnica de HIS proporciona bastante información sobre la activación celular y el tipo de célula implicada, esta técnica es bastante laboriosa y se debe de estandarizar de forma rigurosa cada uno de los reactivos empleados.⁷⁹ Por otra parte, no se tenían reportes en la literatura sobre la estandarización de esta técnica para detectar mRNA en la mucosa intestinal de hámsteres. Por lo cual, la primera parte de este estudio consistió en estandarizar la técnica de HIS en cortes de intestino delgado de hámsteres. Con esta finalidad, se tomaron en cuenta todas las indicaciones reportadas en la bibliografía⁸⁰ para que no hubiera degradación

del mRNA en las muestras de los tejidos, para lo cual, los cortes de tejido intestinal fueron tratados para acetilar y carboxilar el mRNA blanco y de esta manera se evitar la generación de resultados falsos negativos.

Para la detección inmunológica de HIS se utilizó un kit marcado con fosfatasa alcalina, sin embargo, en un principio se obtuvieron resultados falsos positivos debido a la presencia de la fosfatasa alcalina endógena, por lo que fue necesario realizar varios ensayos para inactivar esta enzima en los tejidos. En este estudio, demostramos que la fosfatasa alcalina del intestino delgado puede inactivarse mediante el uso de levamisol a una concentración de 2.5 mM e incubando las muestras durante una hora a 60°C, con lo cual se abate la actividad de la enzima, no hay daño en el tejido y no se presentan resultados falsos positivos. En estudios donde se hizo HIS para detectar mRNA de IL-5 en la mucosa intestinal de pacientes con enfermedad celíaca, se utilizó una sonda marcada radiactivamente y el tiempo que tardó el desarrollo de una reacción positiva fue de 11 días.⁸⁰ En el presente estudio se demostró que pueden utilizarse sistemas diferentes para evidenciar una HIS positiva, reduciendo considerablemente el tiempo de reacción, evitando el uso de material radiactivo y que el empleo de kits comerciales con fosfatasa alcalina pueden utilizarse satisfactoriamente en biopsias de intestino donde esta presente la fosfatasa alcalina.

Otro punto importante en la estandarización de la técnica de HIS, fue la permeabilización del tejido con proteinasa K para permitir la entrada de la sonda a las células y la cantidad de sonda a utilizar. Debido a que una baja permeabilización del tejido no permite entrar cantidades suficientes de sonda y como consecuencia se generan falsos negativos. En el sentido opuesto,

una sobredigestión con proteinasa K genera daño en el tejido, perdiéndose la morfología y estructura del tejido. En este trabajo observamos que cuando los tejidos se incuban con 10 $\mu\text{g/mL}$ de proteinasa K durante 10 minutos a 37°C, son suficientes para permeabilizar el tejido. En cuanto a la cantidad de sonda empleada, en nuestro caso recomendamos utilizar 100 ng de sonda en los tejidos para obtener una buena señal. Estos valores están acorde con lo reportado en la literatura.^{69,80}

En cuanto a la detección de mRNA para IL-5, en el presente trabajo se determinó que es posible detectar el mensajero para esta citocina en hámsteres infectados con *T. solium*. La expresión del mRNA comenzó a detectarse a partir de los ocho DPI y conforme aumentaron los días de infección, la cantidad de células positivas fue en aumento, hasta llegar a un máximo a los 20 y 24 DPI; estos datos están de acuerdo con lo reportado por Aguilar (2001), quien observó incremento en el número de eosinófilos en la mucosa intestinal de hámsteres correspondiente al sitio de anclaje de las tenias a partir de los 6 DPI, con un incremento paulatino a lo largo de la infección.⁷⁴

Por su parte, Vallansek y colaboradores 1999, encontraron que en ratones infectados con el nemátodo *T. spiralis* hay un incremento en la expresión del gen de IL-5 en el día 6 DPI comparado con animales no infectados.⁸¹ Es posible que la expresión más temprana del mRNA para IL-5 observado en los ratones infectados con *T. spiralis* se deba a que éste parásito coloniza rápidamente el intestino, mientras que para que se generen los adultos de *T. solium*, primero se necesita que los cisticercos evaginen y se adhieran a la mucosa intestinal, proceso que puede durar de 24 a 48 horas.³²

Svethic y colaboradores (1993), describieron una expresión incrementada de la IL-5 en las placas de Peyer de ratones durante la infección con *Heligmosomoides polygyrus*.⁷⁷ En el presente estudio se observó la presencia de células positivas para mRNA de IL-5 en la capa muscular y en la submucosa durante los primeros 4 DPI, aunque el número de células positivas fue muy bajo. Mientras que la expresión del mensajero para IL-5 en diferentes células de la mucosa intestinal se observó hasta los ocho DPI, las células positivas se encontraron predominantemente en las criptas de Lieberkühn, en algunas estirpes celulares de la lámina propia y del endotelio de la vellosidad. A los 20 y 24 DPI la expresión de IL-5 fue igual, pero la mayor cantidad de células positivas se encontraron localizadas en la lámina propia, en segundo lugar en las criptas de Lieberkühn y hubo pocas células positivas en el epitelio. Estos patrones de distribución celular van de acuerdo a la forma de migración y pavimentación que llevan a cabo las células en la mucosa intestinal.^{41,42} Por otra parte, se ha sabe que la IL-5 es secretada por los linfocitos T, las células cebadas y aún por los mismos eosinófilos y que estas células se encuentran en mayor número en la lámina propia.^{41,42,81}

CONCLUSIONES

- Se estandarizó la técnica de hibridación *in situ* para la detección de citocinas en el intestino delgado del modelo del hámster dorado utilizando oligonucleótidos marcados no radiactivamente.
- Se demostró que mediante HIS es posible determinar la presencia de mRNA para IL-5 y otras proteínas en forma eficiente.
- En la mucosa intestinal de hámsteres infectados con *T. solium* existen diferentes poblaciones celulares localizadas en toda la mucosa intestinal que tienen la capacidad de sintetizar mRNA para IL-5.
- La cantidad de células positivas aumentan conforme avanzan los días de infección hasta llegar a un nivel máximo, cuando se presenta gran cantidad de células positivas en lámina propia y en criptas de Lieberkühn.

APÉNDICE

Agua MiliQ DEPC

Dietilpírocarbonato al 0.1%

Agua MiliQ

Mezclar en plancha de agitación durante 3 horas en campana de extracción

Meter a la autoclave por 20 minutos para hidrolizar el DEPC

Amortiguador 1 (concentrado 5X)

Cacodilato de potasio 1M

Tris-HCl 125 mM

Albúmina sérica bovina 1.25 mg/mL

Disolver con agua MiliQ-DEPC en plancha de agitación y ajustar el pH a 6.6

Agregar 50 unidades de transferasa terminal.

Amortiguador 3

Tris-HCl 100 mM pH 9.5

NaCl 100 mM

MgCl₂ 50 mM

Disolver con agua MiliQ-DEPC en plancha de agitación y filtrar

Amortiguador de detección

Preparar la solución justo antes de usarse

980 µl de amortiguador 3

20 µl de solución de NBT-BCIP

Proteger de la luz

Amortiguador de Lavado

Tris-HCl 0.1M pH 7.5 (25°C)

NaCl 0.15M

Tween 20 al 0.3%

Disolver con agua MiliQ-DEPC en plancha de agitación y filtrar

Amortiguador de hibridación

Formamida al 40%

Dextran sulfato al 10%

Solución Denhardt 1X

SSC 4X

DTT 10 mM

tRNA levadura 1mg/mL

Esperma de salmón 1 μ g/mL

Disolver con agua MiliQ-DEPC en plancha de agitación

Amortiguador de RNAsa

Tris-HCl 10 mM pH 7.5

NaCl 15mM

Disolver con agua MiliQ-DEPC en plancha de agitación y ajustar el pH a 7.5

Amortiguador TE

Tris-HCl 2M pH

EDTA 0.5 M pH

Disolver con agua MiliQ-DEPC en plancha de agitación y ajustar el pH a 8.0 y filtrar

Amortiguador TN

Tris-HCl 0.1M pH 7.5

NaCl 0.15M

Disolver con agua MiliQ-DEPC en plancha de agitación y esterilizar por autoclave

PBS 10X (Amortiguador salino de fosfatos)

Disolver en 400 ml de agua MiliQ-DEPC los siguientes reactivos:

NaCl 40g

KCl 1g

Na₂HPO₄ 7.2g

KH₂PO₄ 1.2g

Ajustar el pH a 7.4 con HCl concentrado

Llevar con agua MiliQ-DEPC cbp 500 mL y filtrar

Solución 1

Cacodilato de potasio 200 mM

EDTA 1 mM

KCl 200 mM

Albúmina Sérica Bovina 0.2 mg/ml

Glicerol 50%

Disolver con agua MiliQ-DEPC en plancha de agitación y ajustar el pH a 6.5

Solución 2

Mezclar:

200 μ L de EDTA 200 mM pH 8.0 (25°C)

1 μ L de glucógeno 20 mg/mL

Solución denhardt 1X

Ficoll 0.02%

Polivinilpirrolidona 0.02%

Albúmina sérica bovina libre de RNAsa 10 μ g/mL

Disolver con agua MiliQ-DEPC en plancha de agitación

Solución TA

La solución se prepara justo antes de ser utilizada en campana de extracción

Trietanolamina al 0.1N

Anhídrido acético al 0.25%

Disolver en agua MiliQ-DEPC

Solución NBT-BCIP

18.75 mg/mL de nitro azul de tetrazolio

9.4 mg/mL de de 5-bromo-4cloro-3-indolilfosfato

Sal de Toluidina al 67% (v/v) en DMSO

Mezclar y guardar en la oscuridad

SSC 20X (Solución de citrato de sodio)

Cloruro de Sodio 3 M

Citrato de Sodio 0.3 M

Disolver con agua MiliQ-DEPC en plancha de agitación y ajustar el pH a 7.0 (25°C).

Solución de transferasa terminal

50 unidades de transferasa Terminal

Cacodilato de potasio 200 mM

EDTA 200 mM

KCl 200 mM

Albúmina Sérica Bovina 0.2 mg/mL

Glicerol 50% (v/v)

Disolver con agua MiliQ-DEPC en plancha de agitación y ajustar el pH a 6.6 (25°C)

REFERENCIAS

- 1 Flisser A, Sarti E, Schantz P, Lara R, Gómez H. 1988. *Taenia solium* taeniasis and cysticercosis in a Mexican village. *Am J Trop Med Hyg*, 39:194-198.
- 2 Schantz PM, Moore AC, Munoz JL, Hartman BJ, Schaefer JA, Aron AM. 1992. Neurocysticercosis in an orthodox Jewish community in New York City. *N Engl J Med*, 327:692-695.
- 3 Scuitto E, Fragoso G, Laclette JP, Sotelo J, Ayala A, Vargas L, Larralde C. 2000. *Taenia solium* disease in humans and pigs: an ancient parasitosis disease rooted in the developing countries and emerging as a mayor health problem of global dimension. *Microbes Infect*, 2:1875.
- 4 Secretaría de Salud. 1996. Boletín Semanal de Epidemiología, 1994-1996. México D.F. Dirección General de Epidemiología.
- 5 Sarti E. 1997. La teniosis y cisticercosis por *Taenia solium*. *Salud Pública de México*, 39: 225-232.
- 6 Correa MD, Flisser-Steinbruch A, Sarti-Gutiérrez E. Teniasis y Cisticercosis. 1994. En: Valdespino-Gómez JL, Del Rio-Zolezzi A, Velasco-Castrejón D, Escobar A, Ibáñez-Bernal S, Magos-López E, Ed. *Enfermedades Tropicales en México*. México D.F.; Secretaría de Salud, 8: 335-345.
- 7 Flisser A, Madrazo I, Delgado H. 1997. Cisticercosis Humana. Ed. *Manual Moderno México*.
- 8 Smyth JD, McManus, DP. 1989. The physiology and biochemistry of cestodes. Ed. *Cambridge*. Univ Press UK.
- 9 Laclette JP, Omelas Y, Merchant MT, Willms K. 1982. Ultrastructure of the surrounding envelopes of *Taenia solium* eggs. En: cysticercosis: present state of knowledge and perspectives. Flisser A, Willms K, Laclette JP, Larralde C, Riadura C, *Beltran* (eds). Academic Press, New York, USA. 375-387.
- 10 Willms K. 1998. Cestodes (Tapeworms). En: Infectious Diseases. Ed. *W.B. Saunders Co*. Philadelphia, USA, 2481-2499.
- 11 Flisser A. 1994. Teniosis and cysticercosis due to *T. solium*. *Progress in clinical parasitology*. Boca Ratón (FL): *CRC Press Inc.*; 4:77-116
- 12 Schantz P, Sarti E. 1989. Diagnostic methods and epidemiologic surveillance of *Taenia solium* infection. *Acta Leiden*, 57:153-163.
- 13 Faust EC, PF Russell, and RC Jung. 1970. Craig and Faust's clinical parasitology, *Lea and Febiger*, Philadelphia, 502-507, 785-790.
- 14 Richards F, Schantz P. 1991. Laboratory diagnosis of cysticercosis. *Clin Lab Med*, 11:1011-1027.

-
- 15 Allan JC, Avila G, García-Noval J, Flisser A. 1990. Immunodiagnosis of teniosis by coproantigen detection. *Parasitology*, 01:473- 477.
- 16 Chapman A, Vallejo V, Mossie KG, Ortiz D, Agabian N, Flisser A. 1995. Isolation and characterization of species-specific DNA probes from *Taenia solium* and *Taenia saginata* and their use in an egg detection assay. *J Clin Microbiol*, 33:1283-8.
- 17 Ramos-Kuri M, Montoya RM, Padilla A, Govenzecky T, Días ML, Sciutto E et al. 1992. Immunodiagnosis of neurocysticercosis: Dissapointing performance of serology (ELISA) in an unbiased sample of neurological patients. *Arch Neurol*, 49:633-636.
- 18 Sotelo J. Neurocysticercosis. 1998. Una nueva clasificación basada en formas activas e inactivas. Estudio de 753 casos. En: Flisser A, Malagón F, ed. Cisticercosis humana y porcina, su conocimiento e investigación en México. México, D.F.: *Limusa Noriega*, 233-242.
- 19 Flisser A, Woodhouse E, Larralde C, 1980. Human cysticercosis: antigens, antibodies and non-responders. *Clin Exp Immunol.*, 39:27-37.
- 20 Corona T, Pascoe D, Gonzalez-Barranco D, Abad P, Landa L, Estanol B. 1986. *Anticysticercous antibodies in serum and cerebrospinal fluid in patients with cerebral cisticercosis*. *Neurol Neurosurg Psychiatry*, 49:1044-1049.
- 21 Espinoza B, Ruiz-Palacios G, Tovar A, Sandoval MA, Plancarte A, Flisser A. 1986. Characterization by enzyme-linked immunosorbent assay of the humoral immune response in patients with neurocysticercosis and its application in immunodiagnosis. *J Clin Microbiol*, 24:536-41.
- 22 Olivo A, Plancarte A, Flisser A. 1988. Presence of antigen B from *Taenia solium* cysticercus in other platyhelminthes. *Int J Parasitol*, 18:543-545.
- 23 Gottstein B, Tsang VC, Schantz PM. 1986. Demonstration of species-specific and cross-reactive components of *Taenia solium* metacestode antigens. *Am J Trop Med Hyg.*, 35:308-313.
- 24 Tsang VC, Brand JA, Boyer AE. 1989. An enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay and glycoprotein antigens for diagnosing human cysticercosis (*Taenia solium*). *J Infect Dis.*, 159:50-59.
- 25 Allen JE, Maizels RM. 1996. Immunology of human helminth infection. *Int Arch Allergy Immunol.*, 109:3-10.
- 26 Finkelman FD, Pearce EJ, Urban JF Jr, Sher A. 1991. Regulation and biological function of helminth-induced cytokine responses. *Immunol Today.*, 12:A62-A66.
- 27 Ottesen EA. 1985. Immediate hypersensitivity responses in the immunopathogenesis of human onchocerciasis. *Rev Infect Dis*. Nov-Dec;7(6):796-801.

-
- 28 Ito A, Smyth JD. 1987. Immunology of the lumen dwelling cestode infections. En: immuno responses in parasites infections, immunology, immunoprophylaxis. Vol 11, Trematodes and Cestodes. Soulsby E.J.L. Ed. CRC Press Inc., Boca Raton, I.L. 115-163.
- 29 Merchant MT, Aguilar L, Avila G, Robert L, Flisser A, Willms K. 1998. *Taenia solium*: description of the intestinal implantation sites in experimental hamster infections. *J Parasitol*, 84:681-685.
- 30 Jenkins DJ, Rickard MD. 1986. Specific antibody responses in dogs experimentally infected with *Echinococcus granulosus*. *Am J Trop Med Hyg.*, 35:345-349.
- 31 Avila G, Benitez M, Aguilar-Vega L, Flisser A. 2003. Kinetics of *Taenia solium* antibodies and antigens in experimental taeniosis. *Parasitol Res*, 89: 284-289.
- 32 Avila G, Aguilar L, Benitez S, Yopez-Mulia L, Lavenat I, Flisser A. 2002. Inflammatory responses in the intestinal mucosa of gerbils and hamsters experimentally infected with the adult stage of *Taenia solium*. *Int J Parasitol.*, 2:1301-1308.
- 33 Verster A. 1971. Preliminary report on the golden hamster as a definitive host of *Taenia solium* Linnaeus, 1758 and *Taenia saginata* Goeze, 1782. *Onderstepoort J Vet Res*, 38:63-64.
- 34 Gnezdilov VG. 1957. The golden hamster (*Mesocricetus auratus* Waterhouse) as a potential definitive host of tapeworm *Taenia solium*. *Zoologichesski Zhurnal* 36:1770-1773.
- 35 Maravilla P, Avila G, Cabrera V, Aguilar L, Flisser A. 1998. Comparative development of *Taenia solium* in experimental models. *J Parasitol.*, 84:882-6.
- 36 Cadigan F, Santon JS, Tanticharoenyus P, Chicumpa V. 1967. The Lar Gibbon as definitive and intermediate host of *Taenia solum*. *Med. Res.* 53:844.
- 37 Monroy-Ostria A, Monroy-Ostria TJ, Gomez GJ, Hernandez MO. 1993 Some studies on the experimental infection of golden hamsters with *Taenia solium*. *Rev Latinoam Microbiol.* 35:91-98.
- 38 Murphy KM, Reiner SL. 2002. The lineage decisions of helper T cells. *Nat Rev Immunol.*, 2:933-944.
- 39 Mosmann TR, Moore KW. 1991. The role of IL-10 in crossregulation of T(H)1 and T(H)2 responses. *Parasitol Today.*,7: 49-53.
- 40 Iwasaki A, Kelsall BL. 1999. Freshly isolated Peyer's patch, but not spleen, dendritic cells produce interleukin 10 and induce the differentiation of T helper type 2 cells. *J Exp Med.*,190:229-39.
- 41 Ross MH, Romrell LJ, Kaye GI 1997. *Histología*. 3a. Edición. Editorial Panamericana. México, 450-463.
- 42 Ham, A.W. y Cormack, D.H. 1984. Tratado de histología. 1ª Ed. Interamericana, México.

-
- 43 Roitt I, Brostoff J, Male D. 1998. *Immunology*. 5ª Ed. London, Mosby.
- 44 Gartner L. 2002. Texto y Atlas de Histología. 2ª Ed. *Interamericana*, España.
- 45 Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. 1986. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol*, 136:2348-2357.
- 46 Allen JE, Maizels RM. 1997. Th1-Th2: reliable paradigm or dangerous dogma?. *Immunol Today*, 18: 387-92.
- 47 Else KJ, Grecis RK. 1991. Cellular immune responses to the nematode *Trichuris muris*. I. Differential cytokine production during acute or chronic infection. *Immunology*, 72: 508-513.
- 48 Ottesen EA, Skvaril F, Tripathy SR, Poindexter RW, Hussain R. 1985. Prominence of IgG4 in the IgG antibody response to human filariasis. *J Immunol*, 134: 2707-12.
- 49 Genta, RM. 1996. The immune regulation of intestinal helminthiases. En: Enteric Infections and Immunity. Ed. *Pleun Press*, NY, USA., 239-256.
- 50 Hagan P. 1992. Reinfection, exposure and immunity in human schistosomiasis. *Parasitol Today*, 8:12-16.
- 51 Dunne DW, Butterworth AE, Fulford AJC. 1992. Immunity after treatment of human schistosomiasis: association between IgE antibodies to adult worm antigens and resistance to reinfection. *Eur J Immunol*. 22: 1483-1494.
- 52 Hagan P. 1993. IgE and protective immunity to helminth infections. *Parasite Immunol*. 15: 1-4.
- 53 Miller HRP, Huntley JF. 1981. Wallace GR. Immune exclusion and mucus trapping during the rapid expulsion of *Nippostrongylus brasiliensis* from primed rats. *Immunology*, 44: 419.
- 54 Carlisle MS, McGregor DD, Appleton JA. 1991. Intestinal mucus entrapment of *Trichinella spiralis* larvae induced by specific antibodies. *Immunology*, 74: 546-551.
- 55 Tizard, I. 1998. Inmunología veterinaria. 5ta ed. Ed *Interamericana*. México.
- 56 Coffman RL, Seymour BWP, Hudak S, Jackson J, Rennick D. 1989. Antibody to interleukin-5 inhibits helminth induced eosinophilia in mice. *Science* 245, 308-310.
- 57 Iskikawa N, Goyal PK, Mahida YR, Li KF, Wakelin D. 1998. Early cytokine responses during intestinal parasitic infections. *Immunology*, 93: 257-263.
- 58 De'Broski RH, Lee JJ, Lee NA, Nolan TJ, Schad GA, Abraham D. 2000. Role of IL-5 in innate and adaptive immunity to larval *Strongyloides stercoralis* in mice. *Journal of Immunol*, 165: 4544-4551.
- 59 Gall JG & Pardue ML. 1971 *Methods Enzymol.*, 38:470-480.

-
- 60 Angerer LM. & Angerer RC. 1981. Detection of poly A+ RNA in sea urchin eggs and embryos by quantitative *in situ* hybridization. *Nucleic Acids Res.*, 9: 2819-2840.
- 61 Brahic M & Haase, AT. 1978. Detection of viral sequences of low reiteration frequency by *in situ* hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*,75: 6125-6129.
- 62 Haase AT, Ventura P, Gibbs CJ Jr, & Tourtellotte WW. 1981. Measles virus nucleotide sequences: detection by hybridization *in situ*. *Science*, 212: 672-675.
- 63 Neer A, Baran N & Manor H. 1977. *In situ* hybridization analysis of polyoma DNA replication in an inducible line of polyoma-transformed cells. *Cell*, 11: 65-71.
- 64 Venezky DL, Angerer LM. & Angerer RC. 1981. Accumulation of histone repeat transcripts in the sea urchin egg pronucleus. *Cell*, 24: 385-391.
- 65 Cheung SW, Tishler PV, Atkins L, Sengupta SK, Modest EJ. & Forget BG. 1977. Gene mapping by fluorescent *in situ* hybridization. *Cell Biol Int. Rep.*, 1: 255-262.
- 66 Rudkin GT, & Stollar BD. 1977. High resolution detection of DNA-RNA hybrids *in situ* by indirect immunofluorescence. *Nature* (London) 265: 472-473.
- 67 Langer PR, Waldrop AA & Ward DC. 1981. Enzymatic synthesis of biotin-labeled polynucleotides: novel nucleic acid affinity probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78: 6633-6637.
- 68 Komminoth P. 1992. Digoxigenin as an alternative probe labeling for *in situ* hybridization. *Diagn Mol Pathol.*,1:142-150.
- 69 Karr LJ, Panoskaltis-Mortari A, Li J, Devore-Carter D, Weaver CT, Bucy RP. 1995. *In situ* hybridization for cytokine mRNA with digoxigenin-labeled riboprobes. Sensitivity of detection and double label applications. *J Immunol Methods.*, 82:93-106.
- 70 Robert H. Singer and David C. Ward. 1982. Actin gene expression visualized in chicken muscle tissue culture by using *in Situ* Hybridization with a biotinated nucleotide analog. *Cell Biology Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 79:7331-7335.
- 71 Sato H, Kamiya H, Oku Y, Kamiya M.1994. Infection course of the strobilar stage of *Taenia crassiceps* in golden hamsters, with reference to host responses. *Parasitol Res.* 80:99-103.
- 72 Starke WA, Oaks JA. 2001. Ileal mucosal mast cell, eosinophil, and goblet cell populations during *Hymenolepis diminuta* infection of the rat. *J Parasitol.* 2001,87:1222-1225.
- 73 Horii Y, Khan AI, Nawa Y. 1993. Persistent infection of *Strongyloides venezuelensis* and normal expulsion of *Nippostrongylus brasiliensis* in Mongolian gerbils, *Meriones unguiculatus*, with reference to the cellular responses in the intestinal mucosa. *Parasite Immunol.*15:175-179.

74 Aguiar, L. 2001. células caliciformes y eosinófilos en la mucosa intestinal de hámsteres y jerbos infectados con *Taenia solium*. Tesis de Maestría, Biología celular, Facultad de Ciencias, UNAM.

75 Takamoto, M., K. S. Ovington, C. A. Behm, K. Sugane, I. G. Young, and K. I. Matthaei. 1997. Eosinophilia, parasite burden and lung damage in *Toxocara canis* infection in C57BL/6 mice genetically deficient in IL-5. *Immunology* 90: 511–517.

76 Weller, P. F. 1994. Eosinophils: structure and functions. *Curr. Opin. Immunol.* 6:85–90. (Sanderson, C. J. 1988. Interleukin-5: an eosinophil growth and activation factor. *Dev. Biol. Stand.* 69: 23–29.)

77 Svetic A, Madden KB, X di Zhou, Lu P, Katona M, Finkelman FD, Urban JF, and Gause WC. 1993. A primary intestinal helminthic infection rapidly induces a gut-associated elevation of Th2-associated cytokines and IL-3. *J. Immunol.* 150: 3434–3441.

78 Musiani M, Pasini P, Zerbini M, Gentilomi G, Roda A, Gallinella G, Manaresi E, Venturoli S. 1999. Prenatal diagnosis of parvovirus B19-induced hydrops fetalis by chemiluminescence *in situ hybridization*. *J Clin Microbiol*, 37:2326-2329.

79 Nonradioactive *In Situ* Hybridization Application Manual. 2002. Roche Applied Science.

80 Desreumaux P, Janin A, Colombel JF, Prin L, Plumas J, Emilie D, Torpier G, Capron A, Capron M. 1992. Interleukin 5 messenger RNA expression by eosinophils in the intestinal mucosa of patients with coeliac disease. *J Exp Med.* 175:293-296.

81 Vallance BA, Blennerhassett PA, Deng Y, Matthaei KI, Young IG, Collins SM. 1999. IL-5 contributes to worm expulsion and muscle hypercontractility in a primary *T. spiralis* infection. *Am J Physiol*, 277 G400-G408.