



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

Relevancia de la suplementación
con zinc sobre la
inmunogenicidad y capacidad
protectora de la vacuna sintética
contra la cisticercosis
experimental murina por *Taenia
crassiceps*

T E S I S

QUE PARA OBTENER ÉL TITULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA

P R E S E N T A :

HERNANDEZ MARTINEZ CAROLINA



MÉXICO, D.F.

2006



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.

H JURADO ASIGNADO:

Presidente: Profa. María Dolores Lastra Azpilicueta

Vocal: Prof. Abel Gutiérrez Ramos

Secretario: Prof. Jorge Fernando Paniagua Solís

1er. Suplente: Profa. Sonia Mayra Pérez Tapia

2do. Suplente: Prof. José Cordero Hernández

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

Laboratorio de Investigación en Inmunología, Departamento de Biología, Facultad de Química, UNAM

Vo.Bo Asesor del tema:

Profa. Maria Dolores Lastra Azpilicueta

Vo.Bo Supervisor Técnico:

Profa. Ana Esther Aguilar Cárdenas

Sustentante:

Carolina Hernández Martínez

Agradecemos la colaboración del grupo de investigación de la Dra. Edda Sciutto Conde y de la Dra. Gladis Fragoso González por la asesoría brindada durante la utilización de su modelo experimental de infección con Taenia crassiceps, la donación del péptido GK1 y todas las facilidades para la realización de esta tesis.

CONTENIDO

Abreviaturas.....	i
Relación de tablas y figuras.....	ii
Resumen.....	iii
1. Introducción.....	1
2. Antecedentes.....	3
2.1. El zinc.....	3
2.1.2 El zinc en etapas perinatales.....	8
2.1.3 El zinc y el sistema Inmune.....	9
2.1.4 Deficiencia de zinc.....	10
2.1.5 Suplementación con zinc.....	13
2.2 Cisticercosis.....	15
2.2.2 Ciclo de vida de <i>T. solium</i>	18
2.2.3 La cisticercosis experimental murina por <i>T. crassiceps</i>	21
2.2.4 Inmunología de la cisticercosis.....	21
2.2.4.1 Inmunidad Humoral.....	21
2.2.4.2 Inmunidad Celular.....	23
2.2.4.3 Mecanismos de evasión.....	24
2.2.5 Vacuna.....	25
2.2.5.1 El péptido Gk1.....	25
2.2.6 Respuesta Th.....	26
3. Justificación.....	28

4. Hipótesis de estudio.....	28
5. Objetivos.....	29
6. Materiales y Métodos.....	30
6.1 Modelo Biológico.....	30
6.2 Grupos experimentales.....	30
6.3 Vacuna.....	30
6.4 Inmunización.....	31
6.5 Obtención de muestras.....	33
6.6 Infección experimental.....	33
6.7 Carga Parasitaria.....	33
6.8 Proliferación Celular.....	34
6.9 ELISA.....	35
6.10 Análisis Estadístico.....	35
7. Resultados.....	36
8. Discusión.....	41
9. Conclusiones.....	46
10. Bibliografía.....	47

RELACION DE TABLAS Y FIGURAS

		Página
Figura 1a	Micrografía electrónica de barrido de un huevo de <i>Taenia solium</i> .	20
Figura 1b	Ilustración esquemática de la larva o cisticerco de <i>Taenia solium</i> .	20
Figura 1c	Ciclo de vida de <i>Taenia solium</i> .	20
Figura 2	Respuesta inmune Th	27
Figura 3	Diagrama del modelo experimental y tiempo de suplementación	32
Tabla 1	Grupos Experimentales	31
Gráfica 1	Efecto del zinc sobre la carga parasitaria	36
Gráfica 2	Efecto del zinc sobre la proliferación linfocitaria de células estimuladas <i>in vitro</i> con ConA	37
Gráfica 3	Efecto del zinc sobre la proliferación linfocitaria de células estimuladas <i>in vitro</i> con AgTs y GK1	38
Gráfica 4	Efecto del zinc sobre la proliferación linfocitaria de células control	39
Gráfica 5	Efecto del zinc sobre la respuesta humoral	40

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AgTs	Antígeno total de <i>Taenia solium</i>
ARN	Ácido ribonucleico
BSA	Albúmina sérica bovina
ConA	Concanavalina A
ELISA	Análisis inmunoabsorbente ligado a enzimas
GK1	Péptido sintético GK1
IET	Inmunoelctrotransferencia
IFN-γ	Interferón gamma
IL-1α, IL-β, 2, 3, 4, 6, 10,12	Interleucina IL-1 α , IL- β , 2, 3, 4, 6, 10,12
IgA, IgG	Inmunoglobulina A, inmunoglobulina G
KETc1	Péptido sintético KETc1
KETc12	Péptido sintético KETc12
NCC	Neurocisticercosis
NK	Células natural killer
RMN	Resonancia magnético nuclear
SIDA	Síndrome de la inmunodeficiencia humana
SNC	Sistema Nervioso Central
Sp3Vac	Vacuna sintética compuesta por GK1, KETc1 y KETc12
Células T CD4+	Linfocito T cooperador
Células TCD8+	Linfocito T citotóxico
Th1	Linfocito T cooperador, subpoblación tipo 1
Th2	Linfocito T cooperador, subpoblación tipo 2
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana

Resumen

La desnutrición y la infección son dos grandes problemas para la salud mundial. La manipulación del sistema inmune usando la nutrición nos da una importante posibilidad para mejorar la respuesta ante infecciones. Los micronutrientes, en especial el zinc, tienen un papel muy importante al respecto ⁽¹¹⁾. Los estudios realizados por más de cuarenta años han demostrado que el zinc es de gran importancia para el sistema inmune, es esencial para la inmunidad inespecífica (neutrófilos y células NK); para el desarrollo de los linfocitos B (afecta la respuesta humoral primaria y secundaria) y afecta la fagocitosis y la producción de citocinas de los macrófagos ^(7,38). Se ha reportado que durante estados deficientes de zinc (relacionados a desordenes genéticos o metabólicos, y a los ocasionados por los hábitos nutricionales) se deteriora la inmunidad celular, hay infecciones frecuentes y graves, atrofia tímica, anergia, reducción en la proliferación linfocitaria, entre otras. La suplementación con zinc en estos individuos estudiados revierten todas estas manifestaciones ⁽⁶⁾.

La cisticercosis es una enfermedad con grandes implicaciones socioeconómicas y de salud. Entre las distintas estrategias propuestas para el control de esta parasitosis se desarrolla y evalúa en condiciones naturales de transmisión una vacuna sintética (SP3vac), la cual genera una respuesta que se acompaña por un perfil inmunológico del tipo Th1 ⁽⁴⁸⁾.

Como una alternativa experimental para el estudio de la cisticercosis se ha adoptado el modelo murino utilizando el parásito *Taenia crassiceps* ^(16, 67,68).

La suplementación con zinc en ratones permite el desarrollo de una respuesta inmunológica Th1 más eficiente durante los primeros días de la infección que al mantenerse parece controlar el crecimiento del parásito ^(16, 67,68).

Con el propósito de conocer el efecto del zinc sobre el efecto protector del péptido GK1 se realizó el conteo de los parásitos viables en el peritoneo de los ratones de cada grupo. La suplementación con zinc por sí misma disminuye la carga parasitaria en un 50%. Al inmunizar a los ratones con el péptido GK1 y suplementarlos con zinc, la carga parasitaria disminuye 66%.

Con el fin de conocer el efecto inmunológico del zinc sobre el péptido sintético GK1, se evaluó la proliferación celular de los animales en experimentación. Se encontró que la suplementación con zinc disminuye la proliferación linfocitaria en los diferentes grupos. Esta inhibición puede deberse a que la prolongación de la suplementación con 500mg/L de zinc a 9 semanas o un aumento en la dosis (1000 mg/L), puede llegar a ser tóxico y alterar reacciones bioquímicas y lo que podría manifestarse como una inhibición de la respuesta inmune en general ⁽³⁷⁾, en este caso, la disminución de la proliferación celular.

Para evaluar el efecto del zinc sobre la producción de anticuerpos anti-GK1 se realizó un ELISA. Como resultado se obtuvo que la producción de anticuerpos anti-GK1, en los animales que fueron suplementados con zinc e inmunizados con GK1, disminuye significativamente en comparación a su control.

La resistencia a la cisticercosis murina esta dada por la respuesta Th1 inducida, en este caso, por la suplementación con zinc.

1. INTRODUCCIÓN

El sistema inmunológico es el encargado de reconocer lo propio y lo extraño; protege y mantiene libre de enfermedades al organismo activando una serie de mecanismos de defensa en contra de los agentes infecciosos, en muchos de estos procesos se requiere de una gran cantidad de nutrientes esenciales ⁽¹⁻⁵⁾.

El zinc es un elemento muy importante en el desarrollo de los individuos, tiene un papel muy importante en diversas funciones fisiológicas, como el crecimiento, el desarrollo y la maduración sexual. Participa en la activación de más de 300 enzimas, algunas de ellas involucradas en la síntesis de DNA, la división celular y la síntesis de proteínas y estabiliza la estructura tridimensional de más de 1 000 factores de transcripción involucrados en la expresión de algunos receptores para esteroides ^(6,7).

La deficiencia de zinc ha dado como resultado daño en varias funciones celulares, por ejemplo disfunción en la inmunidad innata, mayor susceptibilidad a infecciones por bacterias, hongos y bacterias, atrofia tímica, anergia, reducción en suero de la respuesta linfoproliferativa a mitógenos y un decremento efectivo en las células Th ^(8,9).

Las deficiencias nutricionales pueden ser la causa más común de inmunodeficiencias secundarias en humanos ⁽¹⁰⁻¹²⁾.

En países en vías de desarrollo, una gran parte de la población infantil presenta retardo en el crecimiento, así como una alta incidencia de enfermedades infecciosas, una causa puede ser la baja ingesta de zinc y de otros micronutrientes ^(8,13).

Los primeros estudios en humanos dan las evidencias de que el nivel nutricional y el sistema inmune están ligados ⁽¹⁴⁾, lo que nos lleva a pensar que mejorando la nutrición del individuo podemos mejorar la respuesta inmune ante ciertas infecciones ⁽¹⁵⁻¹⁸⁾.

La cisticercosis es una enfermedad infecciosa causada por la larva o cisticerco del parásito *Taenia solium* se considera un problema de salud pública que afecta principalmente a países de Latinoamérica, Asia y África ⁽¹⁹⁻²⁰⁾. Estos países se caracterizan por tener condiciones nutricionales y sanitarias deplorables además de ser una enfermedad emergente en países desarrollados debido a la gran movilización de inmigrantes ⁽²¹⁾. Su importancia radica en la alta frecuencia de pacientes con neurocisticercosis, que es la forma más grave y frecuente de la enfermedad, en esta se puede producir crisis convulsivas, meningitis, deterioro mental, etc. ⁽¹⁹⁻²²⁾.

El Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica informó de 198 casos de cisticercosis hasta la semana 41 del año 2004. Por otro lado, la frecuencia de la cisticercosis porcina en rastros de México varía de 0.004% hasta 12%; sin embargo, estas cifras pueden aumentar si se considera que 35% de la producción porcina es sacrificada sin inspección; en estos cerdos las frecuencias son de 1.4 a 7 por cada 100 cerdos diagnosticados por inspección visual, palpación en lengua y técnicas inmunológicas.

2. ANTECEDENTES

2.1 El Zinc

2.1.1 Generalidades

El zinc juega un amplio papel en las funciones corporales, es un componente esencial de un gran número de enzimas, incluyendo la anhidrasa carbónica, la carboxipeptidasa, la fosfatasa alcalina, la ADN polimerasa, la transcriptasa inversa y el factor de prolongación de la cadena proteica. Regula la maquinaria de expresión de genes, esto afecta la estructura de la cromatina, la actividad de numerosos factores de transcripción y de las ARN polimerasas; algunos receptores hormonales contienen asas digitiformes de zinc en los dominios que se unen al ADN ^(23, 24,26).

El zinc es importante en las funciones inmunitarias celulares y desempeña un papel en la resistencia celular al daño de los radicales libres mediante la estabilización de las membranas celulares, reduciendo así, el daño de la peroxidasa ^(6,25).

Se estima que un adulto contiene aproximadamente 1.6 g de zinc, donde las concentraciones más altas están en los huesos, la próstata y la membrana coroides del ojo. El 60% del zinc corporal está en el músculo esquelético. Entre el músculo esquelético y el hueso juntos contienen casi el 90% del zinc corporal ^(6,7).

Absorción

Una vez que el zinc pasa al interior de los enterocitos, por un proceso de transporte pasivo, parte de éste atraviesa la membrana basolateral mediante un

mecanismo que precisa del gasto de energía, ordinariamente ocurre un flujo bidireccional de este mineral, tanto en el sentido mucosa-serosa como en la dirección serosa-mucosa ^(6,7).

Una parte del zinc se une a una pequeña proteína ligadora de metales pesados (metalotioneína) rica en cisteína. A mayor cantidad de zinc en la dieta, se induce el gen del enterocito a producir más metalotioneína, de esta manera esta proteína regula la absorción del zinc y el cobre.

La absorción de zinc se ve afectada por drogas tales como los diuréticos del tipo de las tiazidas, antibióticos como la tetraciclina y las fluoroquinolonas, quelantes metales como la penicilamina, anticonvulsivos como el valproato de sodio. El alcohol también interfiere con la absorción del zinc e incrementa su excreción. El uso a largo plazo de ciertos antihipertensivos como el enalapril y el captopril también conducen a un déficit de zinc ^(6,7).

Transporte

El zinc que sale de las células epiteliales por la membrana basal, pasa a los capilares de la lámina propia de las vellosidades y se incorpora a la circulación. En el plasma, la albúmina constituye el mayor transportador del zinc intercambiable (60%), alrededor del 30% se une a una alfa-2-microglobulina y cerca del 10% se encuentra ligado a aminoácidos como la histidina y cistina, el 70% restante se encuentra débilmente unido a la albúmina la cual constituye el mayor transportador de zinc intercambiable ^(6,7). El total de zinc que está en circulación es del 0.1% del total de zinc en el cuerpo, es decir solo pasa por ahí para llegar a las células y almacenarse. El zinc modifica la estructura de la alfa2-

microglobulina y aumenta su interacción con citocinas y proteasas, influenciando de manera indirecta al sistema inmune ^(6,7).

Almacenamiento y excreción

El zinc no se almacena y se pierde fácilmente en el organismo, solo una pequeña parte se encuentra en los enterocitos. En neonatos, el hígado puede contener cierta cantidad de reserva ⁽⁶⁾.

La mayor excreción del zinc endógeno acontece por la vía digestiva, ya sea en las enzimas proteolíticas, de origen pancreático, en la bilis o por la pérdida de células epiteliales, al renovarse el epitelio intestinal ^(6,7).

En orina se eliminan entre 0.4 y 0.6 mg; en los tegumentos y el sudor se pierde cerca de 1 mg; en cada eyaculación se pierde entre 0.6 y 1 mg. La leche humana contiene entre 1 y 2 $\mu\text{g/mL}$ ^(6,7).

Biodisponibilidad

El zinc que se encuentra en carne, hígado, huevos y mariscos es más fácilmente absorbido y retenido que el que está contenido en los cereales ⁽⁶⁾.

Los fitatos, oxalatos, taninos (polifenoles), la fibra dietética de los alimentos vegetales y el calcio contenidos en algunos alimentos, interfieren con la absorción completa de este mineral. El exceso de hierro, cobre y calcio en la dieta o administrados en suplementos como los que se prescriben durante el embarazo, interactúan con el zinc y dificultan su absorción ⁽⁷⁾.

Una vez que los procesos de digestión de los alimentos liberan el zinc, éste puede unirse a algunos compuestos para formar complejos que favorecen su transporte a través de las membranas de los enterocitos; aminoácidos como la histidina y, probablemente la metionina, actúan en este sentido; un compuesto de metionina-zinc (monometionina de zinc) registra índices de absorción mayores que los obtenidos con sales de sulfato o de poliascorbato ^(6,7).

Toxicidad

El zinc posee una toxicidad relativamente escasa ⁽⁷⁾. Se sabe que dosis de 50 a 150 mg/día, producen molestias leves de tipo gastrointestinal, dosis de 225 a 450 mg inducen el vómito y dolores más agudos.

El principal problema del consumo vía oral de zinc a largo plazo en dosis altas, es la deficiencia de cobre. La ingesta de 60 mg/día de zinc, si no se asocia a la suplementación también con cobre, conduce a una deficiencia de este último.

Funciones Bioquímicas.

El zinc es un elemento esencial de diversas moléculas, enzimas, proteínas y biomembranas. Es requerido para mantener la estructura normal y/o la función de múltiples enzimas, incluyendo las involucradas en la transcripción y translación de material genético y la división celular ⁽¹³⁾. Es necesario para las metaloenzimas que se encuentran involucradas en el metabolismo energético, en la degradación y síntesis de las proteínas ⁽²⁸⁾, en la síntesis de los ácidos nucleicos, en la biosíntesis del grupo hemo, en el transporte del dióxido de carbono y otras reacciones bioquímicas ^(6,7).

En su forma iónica, el zinc participa en la conformación de los polisomas durante la síntesis de las proteínas. Contribuye a la estabilización de las membranas celulares de eritrocitos, leucocitos y plaquetas, protegiéndolos de la peroxidación inducida por metales pesados o por el oxígeno ^(25,29).

Funciones Fisiológicas.

El zinc puede contribuir a la estabilidad de la membrana, actuando a nivel del citoesqueleto ⁽²⁴⁾. El zinc es fundamental en el metabolismo celular, con profundos efectos en el sistema inmune y la mucosa gastrointestinal ^(13, 26, 34,35).

Participa en la producción de testosterona y otras hormonas sexuales, involucradas tanto en la formación de tejido como en la producción de espermatozoides ⁽⁶⁾. La próstata es uno de los tejidos con mayor concentración de zinc en el cuerpo. Concentraciones adecuadas de zinc protegen, a través de mecanismos enzimáticos, contra la malignización de las células y estimulan la apoptosis ⁽⁶⁾.

El zinc es necesario para la producción de neurotransmisores como la dopamina.

Las neuronas llamadas glutamatérgicas, cuyo principal neurotransmisor es el glutamato, son ricas en zinc y están distribuidas en la corteza cerebral, teniendo relación con las funciones cognitiva y de memoria ⁽⁶⁾.

Se considera que los llamados “dedos de zinc” juegan un papel muy importante en la síntesis de proteínas específicas del sistema nervioso, y se asocia con los procesos de aprendizaje y memoria ⁽⁶⁾.

El zinc interacciona con la vitamina A, preservando las funciones de este nutrimento; sea porque el zinc forma parte de las deshidrogenasas involucradas

en el metabolismo de los pigmentos de la retina, dependientes de la vitamina A, o bien porque el zinc es necesario para que el hígado sintetice la proteína transportadora del retinol ^(6,7).

Fuentes naturales de zinc

Se recomienda que los adultos deban ingerir 15 mg de zinc en su dieta. Se estima que el pescado, las frutas, cereales refinados y los tubérculos, contienen entre 1 y 5 mg/1000kcal: las carnes de cerdo y aves, la leche, el yogur y el queso (bajo en grasa), los huevos, las nueces y los alimentos que contiene granos íntegros, proporcionan entre 4 y 12 mg/1000 kcal: los crustáceos, los moluscos, las vísceras (riñón, corazón, hígado), las carnes de cordero y res, los vegetales de hojas verdes y las raíces son los alimentos más ricos en este mineral.

2.1.2 El zinc en etapas perinatales

Los diversos estudios realizados tanto en animales de experimentación y en humanos han mostrado la importancia del zinc durante la gestación; en humanos se requiere del 5 al 7 % del zinc total (100 mg) de una mujer no gestante. El 57% se deposita en el feto y mientras que el 24% en el músculo uterino. Casi todas las hormonas y enzimas involucradas en el embarazo son afectadas por la deficiencia de zinc ⁽³⁰⁾, pudiéndose presentar una labor de parto prolongada, ruptura prematura de membrana, efectos teratogénicos ⁽¹⁾, retardo en el crecimiento intrauterino, en algunos casos muerte del embrión o feto ^(30,43).

El zinc participa en el desarrollo y función de varios órganos, hígado, corazón, pulmones, riñones y cerebro ⁽¹⁾, donde puede actuar como un neurotransmisor e influenciar la división celular, la maduración y el crecimiento en etapas tempranas de la vida fetal y así determinar el desarrollo neurológico e intelectual ^(1, 30,31).

La deficiencia de este micronutriente tiene consecuencias inmunológicas para el feto, las cuales pueden persistir en la infancia y se caracterizan por lesiones en la piel, diarrea, baja talla y peso ⁽³¹⁾.

Durante los primeros dos o tres meses de vida los lactantes humanos satisfacen sus necesidades de zinc a partir de la leche materna, después del sexto mes, la concentración disminuye de manera gradual por lo que se requiere de una dieta adicional que permita satisfacer las necesidades del infante ^(6,7).

2.1.3 El zinc y el sistema inmune

En numerosos estudios se ha demostrado que el zinc es de gran importancia para el sistema inmune, regula funciones de los linfocitos tales como la mitogénesis, y la síntesis de anticuerpos; participa en la activación de células T y NK ^(24, 29,32-34).

La actividad de las células NK, la fagocitosis de macrófagos y neutrófilos y ciertas funciones como la quimiotaxis y la generación de especies oxidativas son afectadas por la disminución de la concentración de zinc *in vivo* ^(3,36). También se ve disminuida la producción de citocinas en macrófagos ^(7, 36, 37,38).

Este micronutriente es el principal regulador *in vivo* e *in vitro* de la apoptosis en linfocitos ⁽³³⁾. Recientemente se ha incrementado el reconocimiento del papel del

zinc en la modulación inmune y su influencia en el curso y término de infecciones (2, 8, 13, 17,18)

2.1.4 Deficiencia de zinc

Los resultados de más de tres décadas de trabajos indican que la deficiencia de zinc rápidamente disminuye la respuesta inmune mediada por células y anticuerpos ⁽⁹⁾.

La deficiencia de zinc puede ser causada por síndromes severos relacionados al mal funcionamiento de metabolismo y/o a defectos genéticos como la acrodermatitis enteropática (causada por la mal absorción de zinc), el alcoholismo, etc., y a causas nutricionales, las cuales son más comunes e importantes ^(12,7).

La deficiencia de zinc que prevalece en los países en vías de desarrollo se debe a dietas pobres en alimentos de origen animal y altas en fitatos ^(2,8).

La deficiencia severa de zinc esta asociada a una severa malnutrición proteico-calórica grave ⁽²⁾, la cual está asociada con un desajuste significativo de la inmunidad mediada por células, de la función fagocítica, del complemento, de las concentraciones de IgA secretora y de la producción de citocinas ⁽³²⁾.

Una gran variedad de anormalidades inmunológicas están asociadas con la deficiencia de zinc, como cofactor, el zinc influencia la secreción de la timulina, en estados deficientes de zinc hay una disminución en los niveles de esta ⁽²⁾, se presenta también atrofia tímica, linfopenia, una reducción de la respuesta linfoproliferativa a mitógenos, la disminución de las células CD4+ y NK y anergia,

lo cual trasladado a un individuo puede provocar infecciones por hongos, parásitos y virus ⁽³⁹⁻⁴¹⁾.

Los diferentes grupos de investigadores han relacionado los niveles bajos de zinc en plasma con el alto riesgo a padecer enfermedades infecciosas ^(2, 8, 12, 13, 39).

Dado que la síntesis de proteínas depende de numerosas enzimas que contiene zinc, y que el sistema inmunitario, la piel y el tracto gastrointestinal son tejidos con un elevado ritmo de síntesis proteica son los más afectados ⁽³⁵⁾.

La deficiencia de zinc se asociada a anorexia, a crecimiento retardado, acrodermatitis, alopecia, alteraciones en la piel, diarrea, función inmunitaria disminuida y retraso de la maduración sexual ^(13,27).

El zinc se necesita especialmente en el sistema inmunológico y en la médula ósea, lo que explica en términos generales él porque una deficiencia en zinc es importante en los mecanismos de defensa ^(12, 39,40).

Los efectos de la deficiencia de zinc en células específicas del sistema inmune son linfopenia en tejidos linfoides (central y periférico) y una disminución en la función de los linfocitos B y T. La deficiencia de zinc reduce la actividad tímica y además hay disminución en la producción de la actividad biológica de múltiples citocinas como: IL-1,IL-2;IL-3;IL-4,IL-6,IFN- γ ,IFN- α , y TNF- α ^(24,33,35,36).

Una deficiencia mediana en zinc también muestra un desequilibrio en la función de las células Th-1 y Th-2 ^(10, 24, 29, 33,36).

La células más susceptible a la modulación de zinc es el macrófago, que produce IL-1 α y β ,IL-12, IFN- α , IFN- β . ^(37,38).

Hay diversos estudios que han demostrado que la deficiencia de zinc incrementa la susceptibilidad a una gran variedad de patógenos, se presenta una pobre respuesta celular y humoral disminuyendo la capacidad del hospedero para controlar infecciones ^(8,13). Evidencia clínica demuestra involución tímica, la cual puede estar mediada por glucocorticoides ya que su concentración en sangre se incrementa en deficiencia de zinc ⁽³³⁾.

Niveles adecuados de zinc contribuyen a la preservación de la relación CD4:CD8, el cual es crucial en la infección por VIH durante su transición a SIDA ^(4, 6,7).

Se ha propuesto que los niveles de zinc se empleen como marcadores de progresión de enfermedades, complementando con la cantidad de linfocitos CD4 y los niveles de alfa-2-microglobulina ^(6,7).

En México, el consumo de alimentos de origen animal en la dieta es limitado, la dieta de la población rural y la urbana marginal se basa principalmente en maíz fríjol y ciertas verduras. Según la encuesta Nacional de Nutrición realizada en México en 1999, la prevalencia de la deficiencia de zinc en niños menores de 2 años de edad alcanza un 33.9% y disminuye progresivamente hasta alcanzar una meseta de 21.4 a 24.4% entre los 5 y 11 años; la prevalencia de deficiencia de zinc es significativamente mayor en los niños de localidades rurales en todos dos grupos de edad. La región sur del país presenta los porcentajes más altos (20.9% a 51.7%), seguido de la región centro (19% a 30.6%), mientras que la región norte es la que presenta los porcentajes más bajas (5.5% a 14.2%).

2.1.5 Suplementación con zinc

Se han llevado a cabo diversos estudios de suplementación con zinc en mujeres embarazadas, en uno de ellos fueron suplementadas con 25 mg de zinc al día, se encontró una disminución en la incidencia de complicaciones durante el parto ⁽⁴¹⁾.

En niños que presentaron de bajo peso al nacer y lesiones en la piel, se suplementaron con zinc y se logró corregir las lesiones de la piel y favorecer el crecimiento y desarrollo de las funciones inmunes, además de disminuir la mortalidad infantil ^(8,13, 23,31).

La suplementación con zinc durante los primeros meses de vida de niños de baja talla muestra beneficios significativos en el tratamiento y prevención de diarrea, enfermedades agudas crónicas y neumonía ⁽⁴²⁾.

Otros estudios indican que la suplementación con zinc ha logrado disminuir los periodos febriles ocasionados por *Plasmodium falciparum* ⁽²³⁾.

En pacientes con hepatitis C presentan una alteración en el metabolismo de metales tales como el zinc, provocando una deficiencia del mismo, ocasionando una alteración en el balance Th1/Th2, se ha utilizado 34 mg de zinc por día e interferón como tratamiento, lo que cual se cree corrige esta alteración ⁽¹⁰⁾.

En otro estudio Prasad, et al, 2004 reporta que la suplementación con 45 mg de zinc y 2 mg de cobre por día protege al individuo del estrés oxidativo.

La suplementación oral con 500mg/L de zinc realizada en diversos estudios en el Laboratorio de Investigación en Inmunología de la Facultad de Química de la UNAM, empleando un modelo murino en etapas perinatales, arrojan como resultado el aumento significativo en la proliferación de linfocitos T, un aumento en la capacidad fagocítica de macrófagos ⁽³⁷⁾ y un incremento en la expresión de las citocinas proinflamatorias IL-1 y TNF- α , e IL-12 ^(11,38). La evaluación de las concentraciones de zinc en diversos tejidos como el útero, la placenta y el bazo indica altos niveles del elemento debida a la suplementación ⁽⁴³⁾.

La suplementación oral con zinc de ratones durante la gestación y la lactancia incrementa la resistencia en contra de la cisticercosis por *Taenia crassiceps* ⁽¹⁶⁾. Estudios más recientes señalan que el zinc favorece la respuesta Th1, ya que la producción de IL-2 e IFN-gamma se incrementa con la suplementación ⁽¹¹⁾.

2.2 Cisticercosis

2.2.1 Generalidades

La cisticercosis, es una enfermedad parasitaria causada por el metacéstodo de *Taenia solium* que se desarrolla en el intestino del humano, su único huésped natural definitivo ^(19, 21, 44,45). El principal huésped intermediario es el cerdo, en el que los meta cestodos suelen localizarse tanto en los tejidos muscular, esquelético y cardíaco, como en el encéfalo, en hígado y rara vez en otros sitios ^(19,29). La cisticercosis humana y la porcina tienen grandes implicaciones socioeconómicas y de salud ^(19,46-48).

En el humano la forma más severa de la enfermedad es cuando el parásito se instala en el Sistema Nervioso Central (SNC) causando la Neurocisticercosis (NCC), la cual se caracteriza por una gran heterogeneidad de síntomas como cefaleas desde leves a intensas, convulsiones, crisis epilépticas, trastornos en la conducta e hipertensión craneal, la gravedad de la NCC esta asociada a características propias del parásito y de su hospedero ^(49,50).

La NCC es una de las causas más frecuentes de enfermedad neurológica en humanos, en México y en otros países de América Latina, Asia y África ^(21,46).

El desarrollo de la enfermedad persiste a causa de la deficiencia de factores relacionados con la higiene, educación e inspección sanitaria de carnes ⁽⁴⁸⁾.

En la mayoría de las zonas rurales el fecalismo al ras del suelo es común y los cerdos deambulan por los pueblos y tienen acceso a la materia fecal humana, que contiene segmentos o huevos de *Taenia solium*. La escasez de agua es la causa principal de falta de higiene personal y en la preparación de alimentos ^(21,22).

La población desconoce el riesgo que conlleva el consumo de carne potencial y la importancia que tienen los cerdos en la transmisión de la enfermedad. El problema de la inspección sanitaria de carne no ha sido solucionado por las autoridades de salud, con excepción de las plantas TIF y algunos rastros de las grandes ciudades, o bien no se lleva a cabo o se efectúa de forma superficial y en ocasiones de manera corrupta ^(19,22).

El parásito *Taenia solium* permanece durante muchos años en el intestino del ser humano. Los metacéstodos en el músculo del cerdo desencadenan una reacción inflamatoria a su alrededor entre el primer y tercer mes postinfección. En cerdos infectados experimentalmente se ha observado que a partir de los dos primeros meses después de la infección las células inflamatorias invaden al parásito y lo transforman de vesicular a coloidal o caseoso. La reacción inflamatoria es mucho más tardía en el tejido nervioso. Se ha observado que cuando los metacéstodos en músculos ya están caseosos y cuando ya sólo se encuentran cicatrices, los del encéfalo están todavía vesiculares, con una reacción inflamatoria muy leve. Este hecho explica la longevidad de las larvas en forma vesicular en el sistema nervioso central en los seres humanos ⁽²¹⁾.

La rapidez de la destrucción depende probablemente de factores como el estado nutricional del animal y su capacidad para producir la respuesta inmunológica efectiva ^(19,20).

En México se ha observado, sin embargo, que los parásitos son eliminados con mayor rapidez, esto último podría deberse a la ingestión de sustancias vermífugas, por ejemplo, la semilla de calabaza y diferentes infusiones de hierbas ^(19, 20,22).

En encuesta serológicas realizadas en México se ha establecido que la seropositividad en la población humana abierta es de 12%. De acuerdo a datos del Instituto Nacional de Neurología, 11% de todos los casos que ingresan con trastornos neurológicos a este nosocomio, se deben a neurocisticercosis ^(19,50).

Los datos más precisos recabados con base en registros de autopsias realizadas en diferentes instituciones hospitalarias indican en la población adulta de un 0.8% hasta 3.5% de NCC. Además del impacto en la salud humana también presenta implicaciones socioeconómicas consecuencia de la discapacidad del paciente así como de los costos que implican su diagnóstico y el tratamiento ⁽⁵⁰⁾.

El diagnóstico de la neurocisticercosis en seres humanos se lleva a cabo por métodos serológicos: ELISA o inmunoelectrotransferencia (IET, Western Blot) y por imagenología-tomografía computarizada o RMN ^(19,20,49).

Debe tenerse claro que una campaña para controlar la teniosis-cisticercosis en un país debe comprender: educación de la población (higiene personal, higiene para preparar alimentos e instalación obligatoria de letrinas en todos los hogares); inspección sanitaria de toda carne destinada para el consumo humano; combatir la corrupción en la compra y venta de animales y sus derivados ^(19,21).

La irradiación de la carne con 0.3 kGy, es una tecnología ya bien establecida y permitida en muchos países es otro método recomendable que tiene la ventaja de inactivar varios agentes patógenos al mismo tiempo, lo que beneficiaría en forma importante a la salud de la población en general ⁽⁵¹⁾.

2.2.2 Ciclo de vida de *Taenia solium*

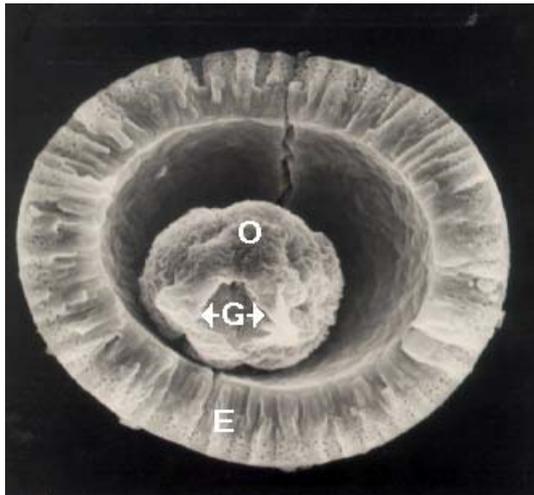
El ciclo de vida de *T. solium* se puede dividir en dos etapas; la primera ocurre en el hospedero intermediario y la segunda en el definitivo (Figura 1c). El ser humano es el único hospedero definitivo del gusano adulto y es el responsable de la infección de los hospederos intermediarios humano y porcino ⁽²¹⁾.

La primera etapa se inicia con la ingestión de los huevos de *T. solium* (Figura 1a) por el hospedero intermediario. Las enzimas proteolíticas del estómago e intestino destruyen al embrióforo (una de las envolturas protectoras que protegen al embrión para sobrevivir en el medio ambiente) liberando al embrión. Se cree que el embrión hexacanto activado (también conocido como oncosfera) atraviesa la mucosa intestinal 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.

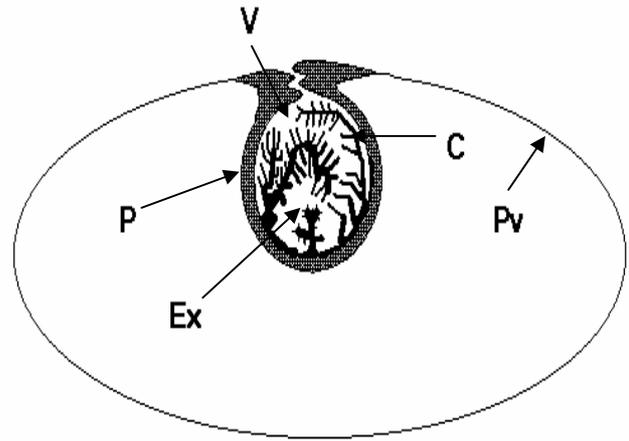
El cisticerco (figura 1b) es una vesícula translúcida, ovoide o circular de 5 a 10 mm de diámetro con un pequeño gusano o escólex metido hacia dentro (invaginado), que puede permanecer en los tejidos del hospedero intermediario durante varios años, rodeado por una cápsula de tejido conectivo. La vesícula está llena de un fluido transparente que contiene proteínas del parásito y del huésped. Cabe hacer notar que 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 ⁽²¹⁾.

El ciclo de vida continúa cuando el ser humano consume carne de cerdo infectada 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 pared del yeyuno por medio de sus ventosas y ganchos rostelares. A partir de entonces el escólex comienza a crecer y diferenciarse hasta convertirse en gusano adulto ⁽²¹⁾.

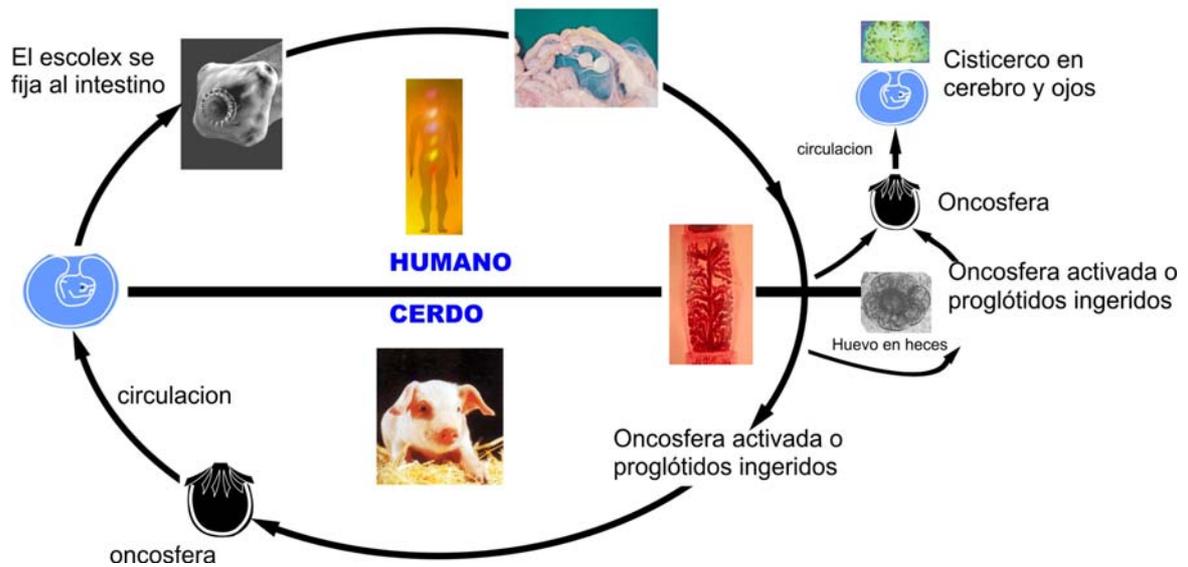
La tenia adulta mide entre 1.5 m y 5 m de longitud y su cuerpo está formado por el escólex, el cuello y el estróbilo. El estróbilo es una cadena de segmentos o proglótidos que se desarrollan a partir del cuello. Los proglótidos poseen cientos de testículos y un ovario trilobulado, por lo que se piensa que se autofecunda para producir hasta 50,000 huevos ⁽²¹⁾. La contaminación de aguas y alimentos con los huevos es favorecida por el fecalismo al aire libre, el hacinamiento y la falta de higiene personal ^(19,20). Se ha demostrado que el principal factor de riesgo es la presencia de un portador de tenia en el ambiente cercano. Un ciclo de vida se cierra cuando el hospedero intermediario ingiere los huevos que contaminan alimentos y agua ⁽¹⁹⁻²¹⁾.



a)



b)



c)

Figura 1a) Micrografía electrónica de barrido de un huevo de *Taenia solium*. E: embrio, G: ganchos oncosferales, O: oncosfera. Figura 1b) Ilustración esquemática de la larva o cisticerco de *Taenia solium*. C: canal espiral, Ex: escólex, P: pared vestibular, Pv: pared vesicular y V: espacio vestibular. Figura 1c) Ciclo de vida de *Taenia solium*.

2.2.3 La cisticercosis experimental murina por *T. crassiceps*

Taenia crassiceps es un cestodo que en su forma adulta puede encontrarse en los intestinos de caninos (zorros) de Europa y Norte América. El cisticerco se reproduce de manera asexual por gemación ^(52,53). Esto ha facilitado enormemente su estudio, ya que puede mantenerse en el laboratorio inoculando los cisticercos en la cavidad peritoneal de un ratón ^(53,54).

Este modelo experimental es una fuente de antígenos que se utilizan en inmunodiagnóstico de la enfermedad en humanos y para probar vacunas contra la cisticercosis porcina por *T solium* ⁽⁵⁴⁾.

Además, la cisticercosis experimental murina por *T. crassiceps* es un sistema experimental que nos ayuda a estudiar los factores biológicos y genéticos involucrados en la susceptibilidad o resistencia del hospedero hacia la infección, la modulación de los mecanismos de la respuesta inmune celular y humoral, así como la naturaleza de las células inflamatorias e inmunocompetentes involucradas y los cambios endocrinológicos ocurridos en el hospedero durante la infección ⁽⁵⁴⁻⁵⁶⁾.

2.2.4 Inmunología de la cisticercosis

2.2.4.1 Inmunidad humoral.

La presencia de los cisticercos en los tejidos del hospedero humano o porcino induce la formación de una respuesta inmune.

Se ha encontrado que la respuesta humoral no participa con la destrucción del metacéstodo. En la cisticercosis experimental los anticuerpos anti-GK1, inducidos por la vacunación afectan la capacidad de los cisticercos en transformarse en gusanos adultos ⁽⁵⁷⁾.

Algunos estudios han mostrado que el tiempo promedio para la aparición de los síntomas después de la infección en los pacientes es de 7 años y puede llegar hasta los 20 años. En la cisticercosis humana se presenta altos niveles de IgG, sin embargo, estas moléculas no se relacionan con el daño a los cisticercos.

En la cisticercosis porcina, la superficie del cisticerco, así como la cápsula inflamatoria formada por el hospedero, están cubiertas por inmunoglobulinas del cerdo, se ha descrito una molécula de 55 kDa que se une a la región Fc ^(19,20).

Los estudios sobre el mecanismo inmune de protección se han realizado principalmente en modelos experimentales de rata y ratón. En estos modelos se ha encontrado que el mecanismo de protección dependerá de la etapa de desarrollo del parásito. En rata y ratón se ha visto que la resistencia natural a la infección por oncosferas de *T. taeniaeformis* tiene componentes humorales. Esta resistencia se detecta en suero a partir de la segunda semana de infección. Existe evidencia de que el mecanismo de resistencia depende del complemento. Sin embargo, después de la primera semana se pierde parte de la susceptibilidad del parásito a este mecanismo humoral de ataque. No obstante, después de esta etapa es posible inducir resistencia con extractos de cisticercos; la resistencia, si bien es humoral, depende de un perfil de isótipos diferente al producido después de la infección oral. Por otra parte, la IgA se ha involucrado en la resistencia natural transferida de ratas madres a sus crías durante la lactancia ^(19,20).

2.2.4.2 Inmunidad celular

El hospedero es capaz de producir un infiltrado inflamatorio, cuyo perfil molecular es complejo y puede eventualmente eliminar al parásito. Por ejemplo, en el humano, en la cisticercosis meníngea, una de las formas relativamente benignas de la enfermedad, la reacción inflamatoria es, en general, escasa y el infiltrado está compuesto por linfocitos, células plasmáticas y epiteliales, pocas veces células gigantes y rara vez se observan eosinófilos. En contraste, en el caso de la neurocisticercosis, la reacción inflamatoria está constituida por numerosas células inflamatorias entre las que se identifican linfocitos, células plasmáticas, algunos cuerpos de Russell, células epitelioides, numerosas células gigantes, pocos son polimorfonucleares y eosinófilos. El caso de la respuesta del cerdo es diferente, en la cisticercosis porcina en músculo esquelético, los eventos celulares durante la destrucción del parásito sugieren un proceso secuencial comenzado por los eosinófilos. Una vez iniciada la destrucción, se incrementan los macrófagos, células epitelioides, así como células gigantes que invaden la cavidad para fagocitar el exudado y los restos de la larva. Los linfocitos forman agregados similares a folículos, simultáneamente los eosinófilos parecen retirarse de la región más interna del proceso inflamatorio y se observan dispersos entre los demás elementos de la reacción granulomatosa ^(19, 20,66).

Las personas infectadas pudieran tener mayor susceptibilidad a otras enfermedades, lo cuál puede sugerir cierta inmunodeficiencia. Se ha descrito que la proliferación celular a mitógenos se encuentra disminuida en pacientes con

cisticercosis . En algunos estudios se ha reportado un factor de ARN que inhibe la activación de linfocitos por fitohemaglutinina. Sin embargo, se ha encontrado que los extractos del metacésto de la *T. solium* pueden ser mitogénicos para linfocitos de ratón.

La cisticercosis causada por *Taenia crassiceps* induce un inmunosupresión temprana hacia la respuesta linfoproliferativa a ConA ⁽⁵⁷⁾. Se ha reportado también que algunos antígenos de excreción/secreción del cisticerco de *T. crassiceps* pueden inducir la apoptosis de linfocitos T CD4+ ⁽⁵⁷⁻⁵⁹⁾.

2.2.4.3 Mecanismos de evasión

Se ha propuesto que el cisticerco emplea varios mecanismos para evadir la respuesta inmune del hospedero y sobrevivir por largos periodos. Entre los mecanismos propuestos se pueden mencionar ^(19, 20, 52, 58,59).

- 1) secreción de antígenos inmunodominantes para desviar a los anticuerpos lejos de la superficie ("cortina de humo")
- 2) enmascaramiento de la superficie con moléculas del hospedero
- 3) modulación o supresión de la respuesta inmune del hospedero
- 4) establecimiento del parásito en hospederos inmunosuprimidos y
- 5) alojamiento en lugares inmunológicamente privilegiados, como el sistema nervioso.

2.2.5 Vacuna

Entre las distintas estrategias propuestas para el control de la cisticercosis por *T. solium*, se ha desarrollado y evaluado en condiciones naturales de transmisión la vacuna sintética SP3vac, la cual está constituida por 3 péptidos sintéticos GK1, KETc1Y KETc12, provenientes de la superficie del parásito ^(48,63). En el modelo murino estos péptidos provienen de una biblioteca de cDNA de *Taenia crassiceps* ^(46,62). Estudios previos demostraron que el péptido GK1 presenta una mayor inmunogenicidad que los otros dos péptidos ^(48,63).

2.2.5.1 El péptido GK1

El péptido GK1, es una secuencia de 18 aminoácidos (GYYYPSDPNTFYAPPYS(A) que se expresa en diferentes etapas del ciclo de vida de *T. solium* contiene al menos 1 epítipo reconocido por células B ⁽⁴⁴⁾.

GK1 ha demostrado su capacidad para inducir una respuesta humoral contra los antígenos y péptidos de *T. crassiceps* sin necesidad de una proteína transportadora ⁽²¹⁾.

Estudios hechos empleando inmunofluorescencia revelan que los anticuerpos anti-GK1 reaccionan contra la proteína nativa del tegumento de *T. crassiceps* y también contra las estructuras anatómicas de *T. solium* (huevos, cisticercos, tenia, etc.) ⁽⁶³⁾. GK1 también contiene, al menos, un epítipo para células T, el cual es capaz de estimular la proliferación de células T CD8+ y pocas T CD4+. El sobrenadante de las células estimuladas con mitógenos contiene altos niveles de IFN- γ y bajos niveles de IL-4 ⁽⁴⁷⁾.

Resultados similares fueron obtenidos en la producción intracelular de citocinas, lo cual nos indica que GK1 tiene la capacidad de inducir una respuesta inmune inflamatoria.

La protección inducida después de la inmunización, sus propiedades fisicoquímicas y su presencia en todas las etapas del desarrollo de *T. solium*, dan a GK1 la oportunidad de ser un candidato para formar parte de la vacuna contra la cisticercosis ^(48,63).

La vacuna se desarrolló y se probó inicialmente en un modelo experimental de cisticercosis murina donde se obtuvieron resultados promisorios de protección para su posterior evaluación en cisticercosis porcina ⁽⁶³⁾.

En el cerdo indujo una elevada capacidad protectora tanto en términos de animales totalmente protegidos como en el número y viabilidad de los parásitos instalados en el animal vacunado, respuesta que se acompañó por un perfil inmunológico del tipo Th1 ⁽⁴⁴⁾.

2.2.6 La respuesta Th

En 1986 Mosma y colaboradores comenzaron una revolución conceptual al dividir las células T cooperadoras (Th) en dos poblaciones: Th1 o respuesta de tipo celular caracterizada por la producción de IFN- γ e IL-2, comúnmente relacionada con la eliminación de parásitos intracelulares y la respuesta de tipo Th2 o respuesta de tipo humoral caracterizada por la producción de IL-4 e IL-10, relacionada con la eliminación de parásitos extracelulares ⁽⁷¹⁾ (Figura 2).

Se ha comprobado que la respuesta Th2 juega un papel crítico en la defensa del hospedero contra infecciones causadas por helmintos, principalmente las causadas por nemátodos intestinales. Sin embargo, varios estudios han demostrado que algunas infecciones ocasionadas por helmintos no son controlados por este tipo de respuesta, por ejemplo, se ha reportado que la IL-12 controla la infección por *Schistosoma Mansoni* ⁽⁶⁷⁾. En la cisticercosis experimental murina causada por *Taenia crassiceps*, la respuesta Th2 se ve favorecida, postulándose como una respuesta Th1 en la fase temprana de la infección y hace un cambio a Th2 conforme se incrementa la carga parasitaria y el tiempo de infección ^(58, 65,70). Estos resultados sugieren que la respuesta Th1 es importante para evitar el establecimiento del parásito ⁽⁶⁷⁻⁷⁰⁾.

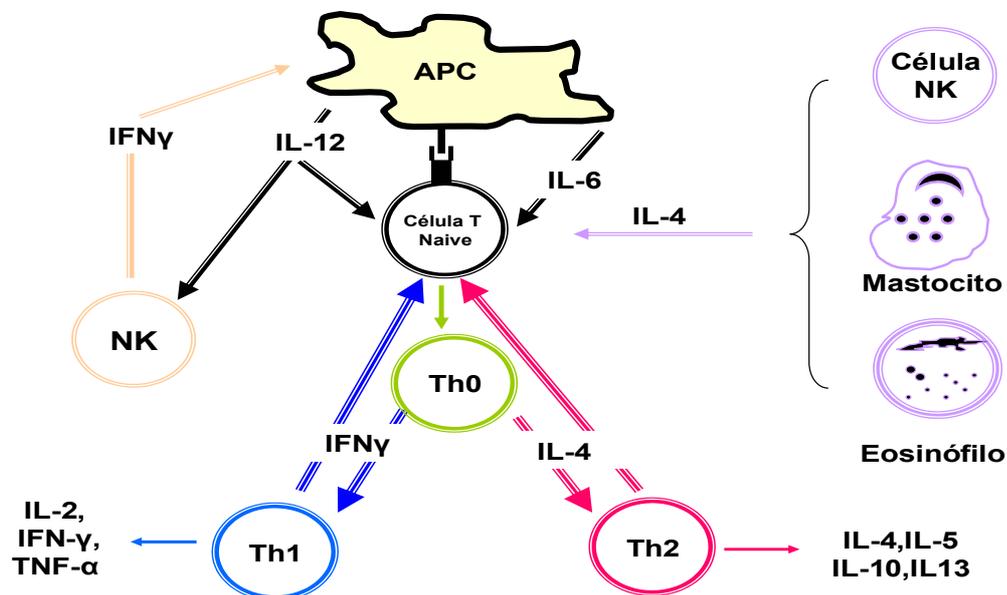


Figura 2. Respuesta inmune Th. Las células T cooperadoras (Th) se dividen en dos poblaciones: Th1 o respuesta de tipo celular caracterizada por la producción de IFN- γ e IL-2 y la respuesta de tipo Th2 o respuesta de tipo humoral caracterizada por la producción de IL-4 e IL-10.

3. Justificación

Los estudios previos realizados en el laboratorio de Investigación en Inmunología han demostrado que la suplementación oral de ratones con zinc durante la gestación y la lactancia es capaz de incrementar la resistencia en contra la cisticercosis causada por el cisticerco de *Taenia crassiceps*. Esta infección en condiciones naturales de ingesta de zinc, se acompaña por una respuesta Th1 en tiempos tempranos que hace un cambio a Th2 conforme avanza el periodo de infección (3 semanas). En animales suplementados con zinc, se induce una clara respuesta Th1 la cual se mantiene 30 días después de la infección. Así, la suplementación con zinc permite el desarrollo de una respuesta inmunológica Th1 más eficiente durante los primeros días de la infección que al sostenerse parece controlar el crecimiento del parásito. Considerando que la resistencia a la cisticercosis pueda inducirse por suplementación oral con zinc y por vacunación, y que en ambos el común denominador es la generación de una respuesta inmunológica del tipo Th1, es posible que se pudiera inducir una respuesta protectora más eficiente por inmunización de animales tratados con zinc.

4. Hipótesis

La vacuna sintética presentará mejores niveles de protección cuando se administre en ratones, que por la suplementación en etapas embrionarias y perinatales con zinc, permita que predomine un perfil Th1.

5. OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar la capacidad protectora de la vacuna sintética contra la cisticercosis murina en ratones con un perfil inmunológico Th1 predeterminado por la ingestión de zinc.

Objetivos Particulares

Evaluar el efecto de la vacuna contra la cisticercosis murina en animales suplementados con zinc midiendo la carga parasitaria.

Evaluar el efecto de la vacuna contra la cisticercosis murina en animales suplementados midiendo la respuesta celular.

Evaluar el efecto de la vacuna contra la cisticercosis murina en animales suplementados midiendo la respuesta humoral.

6. Material y Métodos

6.1 Modelo Biológico

Para realizar este estudio se utilizaron ratones hembra de la cepa BALB/c AnN de entre 4 y 6 semanas de edad (Fragoso G, et al 1996). Los animales se mantuvieron en condiciones de bioterio. Se alimentaron *ad libitum* con alimento comercial (Lab Diet 5015 PMI Foods Inc St Louis MO, USA), con una concentración de 74 µg de Zn/g de alimento.

6.2 Grupos Experimentales

Se utilizaron 6 grupos de 10 hembras. Tres de los grupos provienen de hembras que fueron suplementadas durante la gestación y lactancia con acetato de zinc (Mallinckrodt, Kentucky, USA) en el agua de beber en una concentración de 500 mg/L (estudios realizados reportan que el consumo de agua en este modelo experimental es aproximadamente de 5 mL de agua por día, por lo tanto los animales suplementados con zinc reciben 2.5 mg de zinc, los otros tres grupos provienen de hembras no suplementadas.

6.3 Vacuna Sintética

La vacuna fue el péptido sintético GK1 diluido en saponina. GK1 es uno de los tres componente de SP3Vac, esta compuesto por 18 aminoácidos (GYYYPSDPNTFYAPPYS(A) y se expresa en las diferentes etapas del ciclo de vida de *T. solium* ^(44, 48,63).

Grupo	Tratamiento	Inmunizado con:
I	Zn-	GK1
II	Zn+	GK1
III	Zn-	Adyuvante
IV	Zn+	Adyuvante
V	Zn-	-
VI	Zn+	-

Tabla 1. Grupos experimentales

6.4 Inmunización

Los grupos I y II se inmunizaron, vía subcutánea (aguja para insulina de 27G x 13 mm BD PLASTIPAK), con el péptido GK1 a una dosis de 10 µg/ mL, utilizando como adyuvante saponina (Sigma, St Louis, MI, USA) a una dosis de 10µg/mL.

Los grupos III y IV se inyectaron, vía subcutánea, con saponina a una dosis de 10µg/mL. Los grupos V y VI no fueron inmunizados.

Diez días después de la primera inmunización los animales recibieron una segunda dosis.

SUPLEMENTACION CON 500 mg/L de ZINC				
GESTACION (3 SEMANAS)	LACTANCIA (3 SEMANAS)	POST-DESTETE (1 SEMANA)	VACUNACIÓN (20 DIAS)	INFECCION (30 DIAS)

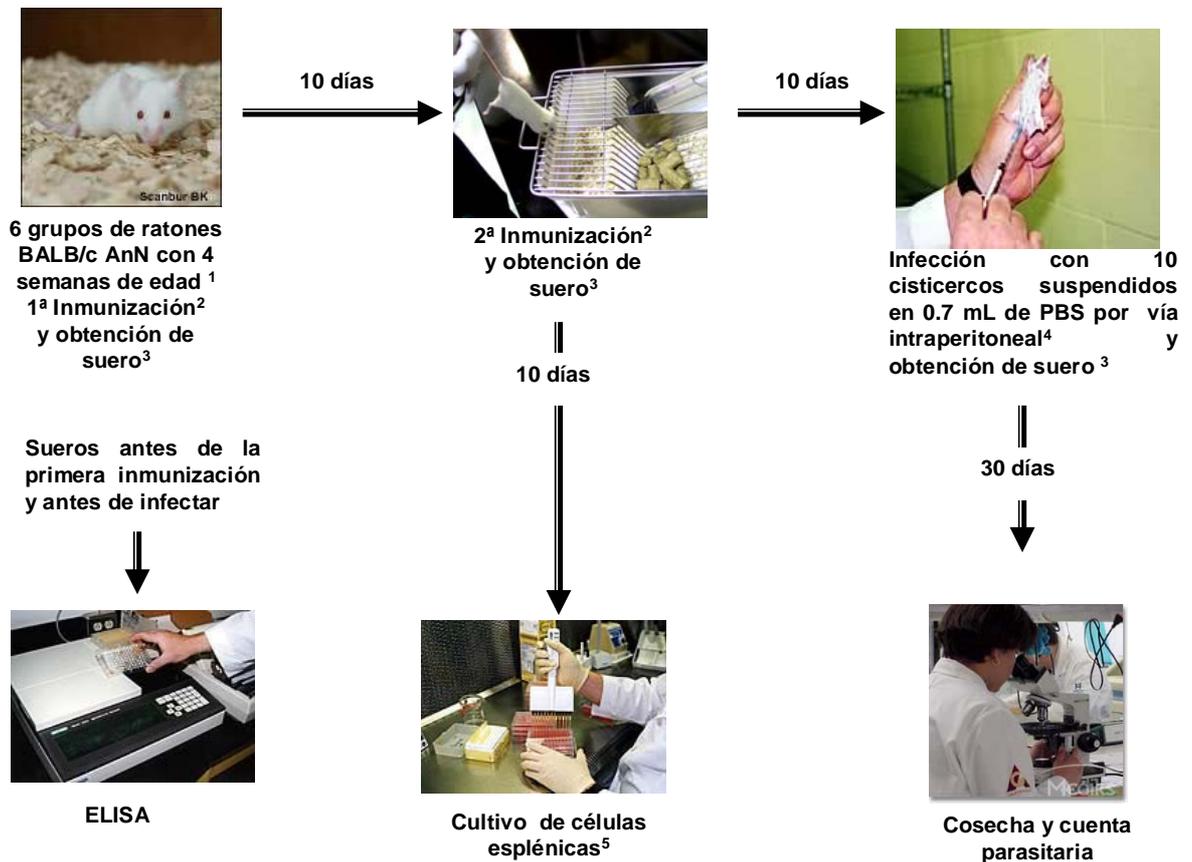


Figura 2. Tiempo de suplementación y diagrama del modelo experimental.

¹ Los grupos II, IV y VI provienen de hembras que fueron suplementadas durante la gestación y lactancia con 500 mg/L acetato de zinc, los otros tres grupos provienen de hembras sin suplementar. ² Los grupos I y II se inmunizaron, vía subcutánea con el péptido GK1 (10 µg/mL), utilizando como adyuvante saponina (10µg/mL). Los grupos III y IV se inyectaron, vía subcutánea, con saponina (10µg/mL). Los grupos V y VI no fueron inmunizados. Diez días después de la primera inmunización los animales recibieron una segunda dosis de la vacuna o adyuvante. ³ Se sé sangre vía retroorbital, se separó el suero y se congeló a -20°C. Con estas muestras se realizó un ELISA, para medir la cantidad de anticuerpos producidos por el hospedero. ⁴ Después de un periodo de infección se colectaron los cisticercos de la cavidad peritoneal, se realizó el conteo de los cisticercos utilizando un microscopio y así se establece la carga parasitaria. ⁵ Se evaluó la inmunidad celular de los diferentes grupos de tratamiento sin infectar. Se obtuvieron macrófagos peritoneales y células esplénicas para estimularlas con antígenos específicos y no específicos, y así, medir la capacidad de los linfocitos para proliferar.

6.5 Obtención de muestras biológicas

Todos los ratones de los grupos experimentales se sangraron antes de la primera inmunización, antes de la segunda inmunización y antes de la infección. Se separó el suero y se congeló a -20°C .

6.6 Infección Experimental

Los cisticercos para la infección y la preparación del antígeno fueron obtenidos de la cavidad de un ratón hembra infectada de 3 a 6 meses con la cepa ORF (de rápido crecimiento) de *Taenia crassiceps* aislada por Freeman en 1962.

En condiciones estériles se obtuvieron los parásitos y se lavaron tres veces con PBS (Buffer de Fosfatos pH 7.2). Los ratones fueron infectados con 10 cisticercos (de 2 mm de diámetro, sin gemas) suspendidos en 0.7 mL de PBS por vía intraperitoneal, se utilizó una aguja de 25G x 16 mm (BD YALE No Cat 302572 Méx).

6.7 Carga Parasitaria

Después de un periodo de infección de 4 semanas se colectaron los cisticercos localizados en la cavidad peritoneal de cada uno de los ratones de los diferentes grupos experimentales, se realizó el conteo de los cisticercos utilizando un microscopio y así establecer la carga parasitaria ^(44, 48,63).

6.8 Proliferación linfocitaria

Se evaluó la inmunidad celular de los diferentes grupos de tratamiento sin infectar de acuerdo al siguiente protocolo. En condiciones de esterilidad se obtuvieron macrófagos peritoneales y células esplénicas y fueron resuspendidas en medio RPMI 1640 (Hyclone, No. Cat. B-0304-Ax,UTA) suplementado con L-glutamina (0.2mM), aminoácidos no esenciales (0.01mM), penicilina (100 U/mL), estreptomina (100 µg/ml) y suero fetal bovino al 10% (Hyclone, No. Cat SV30014-01). Se determina el número de células por medio de una cámara de Neubauer. En todos los casos se observó una viabilidad celular mayor al 95% utilizando la exclusión del colorante vital azul tripano (Flor Laboratorios, USA). La suspensión de linfocitos se ajustó a una concentración de 4×10^6 /mL y la suspensión de macrófagos se ajustó a una concentración de 2×10^5 células/mL. De cada suspensión se tomó 50 µL y se colocaron en una placa de 96 pozos (Costar No Cat 3596, USA). Por cada ratón se utilizaron 12 pozos, 3 pozos se estimularon con medio RPMI, los siguientes 3 con Concanavalina A a una concentración de 5 µg/ml (No. Cat 2490, Méx), los 3 siguientes con AgTs a una concentración de 10 µg/ml (Instituto de Investigaciones Biomédicas) y los últimos 3 pozos con el péptido GK1 a una concentración de 10 µg/ml (Instituto de Investigaciones Biomédicas). Las células fueron incubadas a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂ de. Después de 48 horas de incubación las células son pulsadas con 1 µCi por pozo de Timidina tritiada (Amersham Life Science, Little Chalfont, U.K.) durante 18 horas. Se midió la incorporación de la marca radioactiva utilizando un contador de centelleo 1205 β-plate (Wallac Oy,20101 Turku 10, Finland). Los resultados obtenidos se dan en cuentas por minuto.

6.9 Detección de anticuerpos por ELISA

Para evaluar la formación de anticuerpos en los diferentes grupos de tratamiento se realizó el siguiente protocolo ⁽⁴⁴⁾. Se sensibilizó una placa de 96 pozos (Nunc, Roskilde, Denmark) con 100 μ L por pozo de antígeno (fluido vesicular del cisticerco de *T. crassiceps*) diluido 1:100 en amortiguador de carbonatos pH=9.6 durante una hora a 37°C o toda la noche a 4°C. Los pozos son lavados 3 veces con una solución de PBS/Tween 0.3% e incubados con 100 μ L PBS/BSA 1% durante una hora a 37°C. Se lavó la placa y se incubó con 100 μ L de suero problema diluido 1:100 en PBS/BSA 1% durante una hora a 37°C. Se lavó la placa y los anticuerpos específicos fueron detectados con 100 μ L del conjugado α -IgG unido a peroxidasa alcalina (Sigma, St Louis, MI, USA) en dilución 1:6000 en PBS-BSA1%, se dejó incubar durante una hora a 37°C. Se lavó la placa y se adicionó 100 μ L del sustrato paranitrofenilfosfato diluido en amortiguador de dietanolamida a una concentración de 1mg/mL por pozo, se incubó a 37°C aproximadamente 20 minutos. Se detuvo la reacción con 50 μ L por pozo de H₂SO₄ 0.2 M. Los valores de absorbancia se miden a 405 nm en un lector de ELISA (Opsys MR).

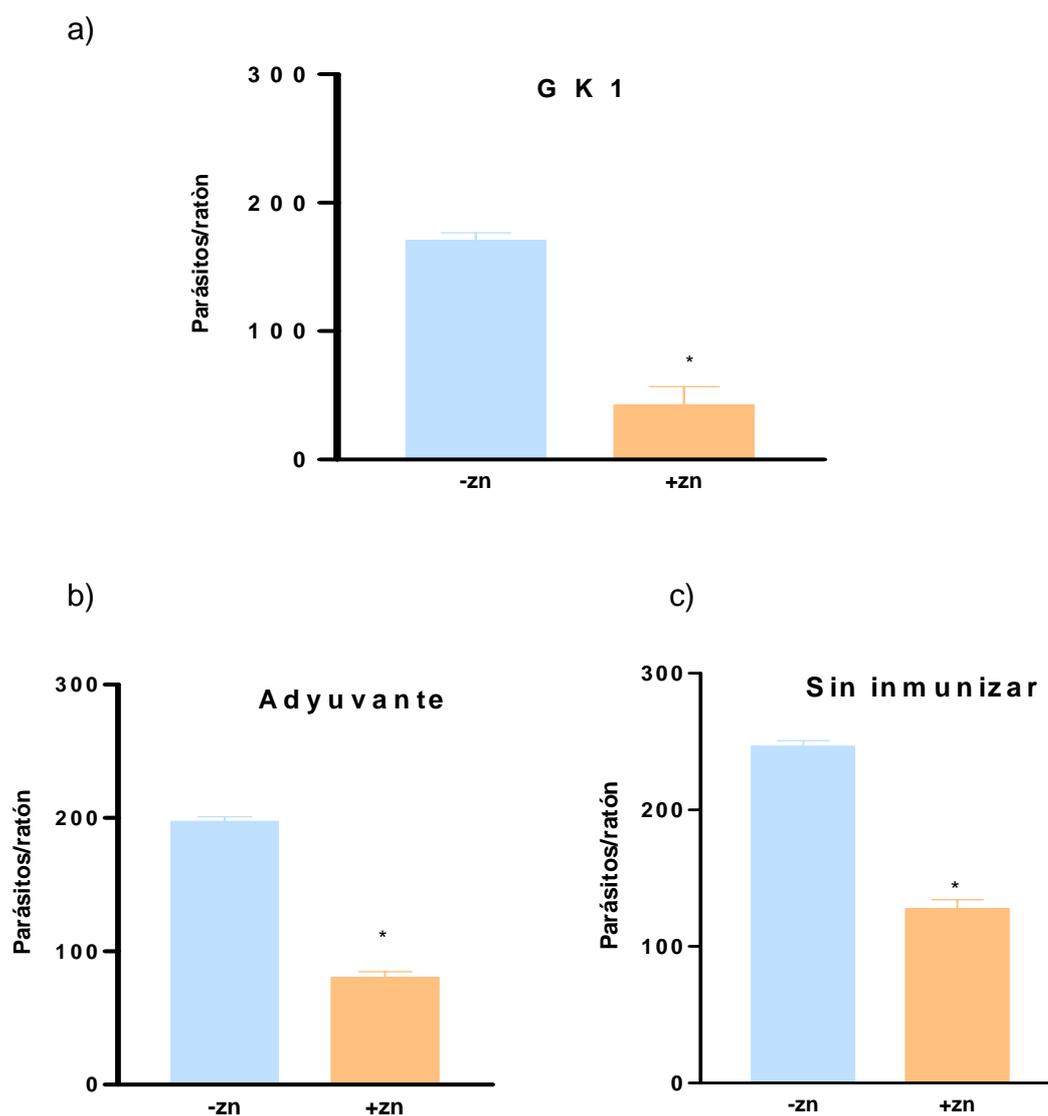
6.10 Análisis estadístico

Se utilizó la prueba ANOVA para diferencias entre la población y la prueba t de student para las diferencias entre grupos, con un nivel de significancia ($P < 0.05$). Se utilizó el software GraphPad Prism 3.0.

7. RESULTADOS

A. Efecto del zinc sobre la capacidad protectora del péptido sintético GK1 medido como carga parasitaria.

Con el propósito de conocer el efecto inmunológico del zinc sobre el efecto protector del péptido GK1 contra la cisticercosis murina experimental se realizó el conteo de los parásitos viables en el peritoneo de los ratones suplementados con zinc.

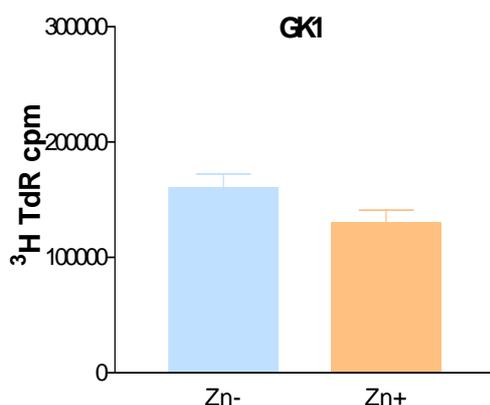


Gráfica 1. Efecto de la suplementación con zinc sobre la carga parasitaria en a) ratones inmunizados con GK1 (10 µg/ratón), b) inmunizados solo con el adyuvante (10 µg/ratón), c) ratones control (sin vacunar). * $p < 0.0001$

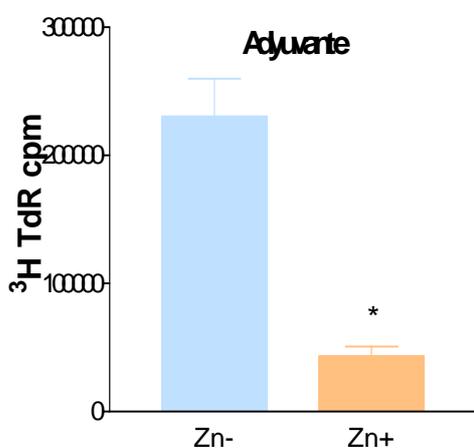
B. Proliferación Celular

Con el propósito de conocer el efecto inmunológico del zinc sobre el efecto protector del péptido GK1 contra la cisticercosis murina experimental se evaluó la proliferación celular de los animales en experimentación, los resultados que se obtuvieron son los siguientes:

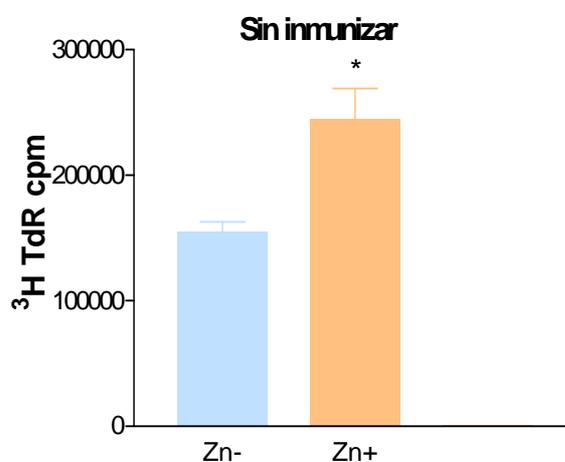
a)



b)

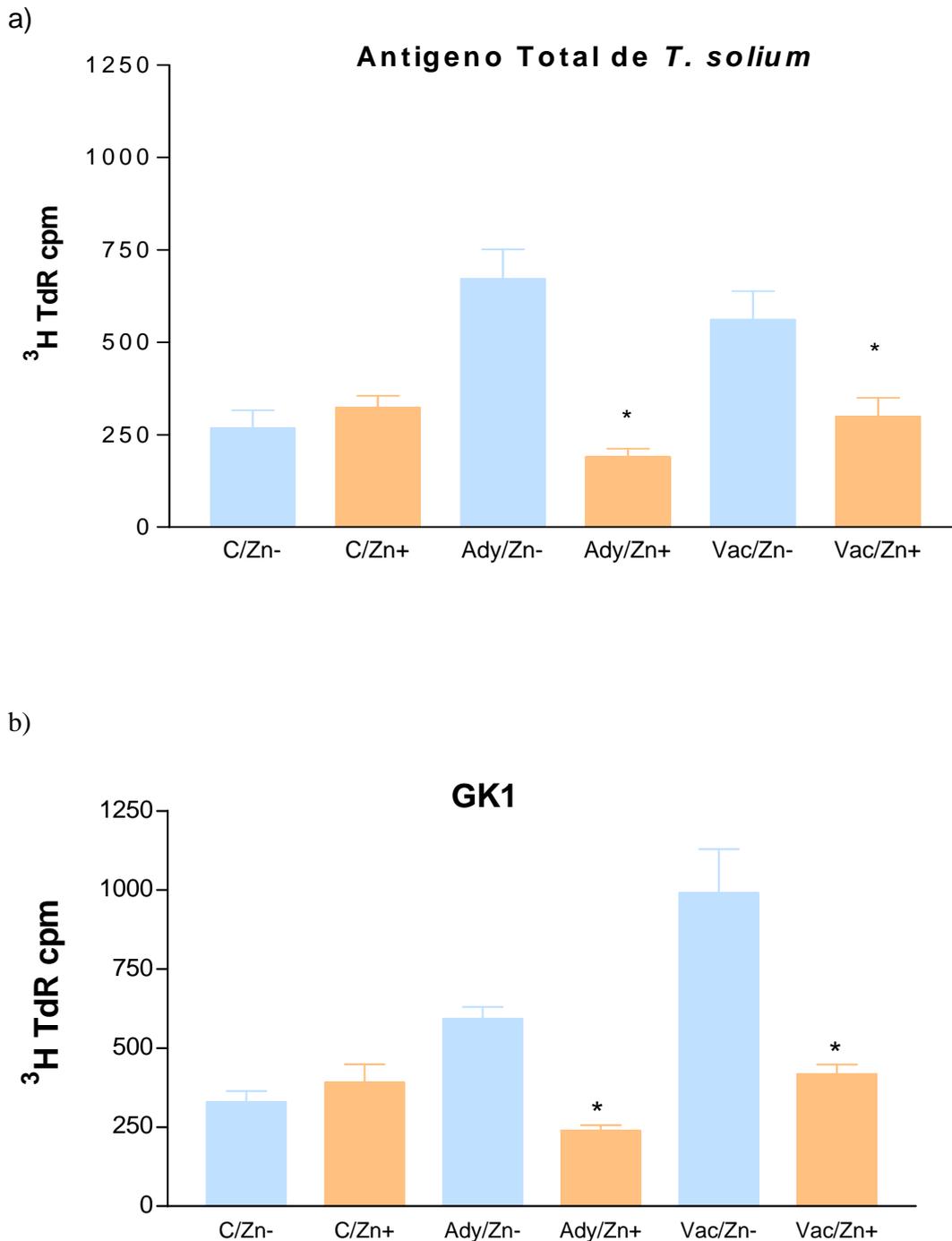


c)



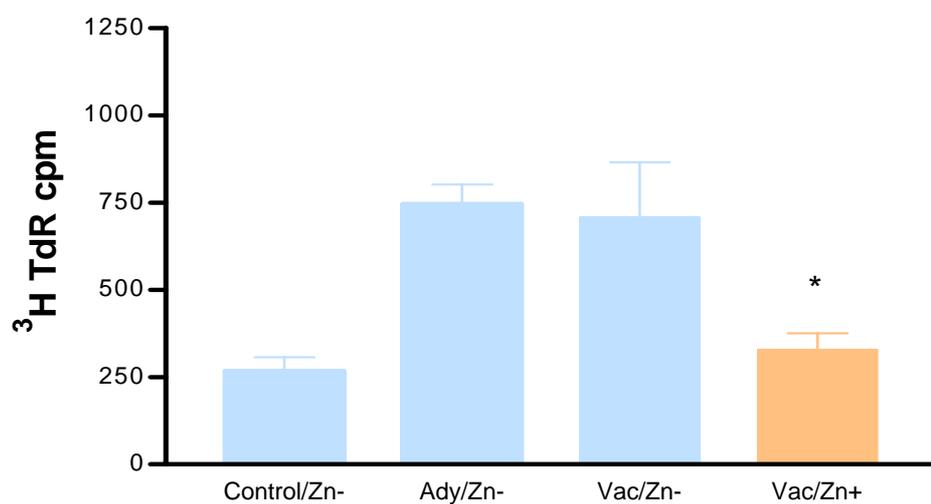
Gráfica 2. Efecto de la suplementación con zinc sobre la respuesta proliferativa de células esplénicas estimuladas *in vitro* con Concanavalina A (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), determinado por la incorporación de ^3H timidina tritiada, en animales a) inmunizados con GK1; b) inmunizados con saponina; c) sin inmunizar. * $p < 0.05$.

Respuesta celular a antígenos específicos



Gráfica 3. Efecto de la suplementación con zinc sobre la respuesta proliferativa de células esplénicas estimuladas *in vitro* con a) con AgTs (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$); b) con GK1 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), determinado por la incorporación de ^3H timidina tritiada. * $p < 0.05$.

Respuesta celular sin estimulación antigénica

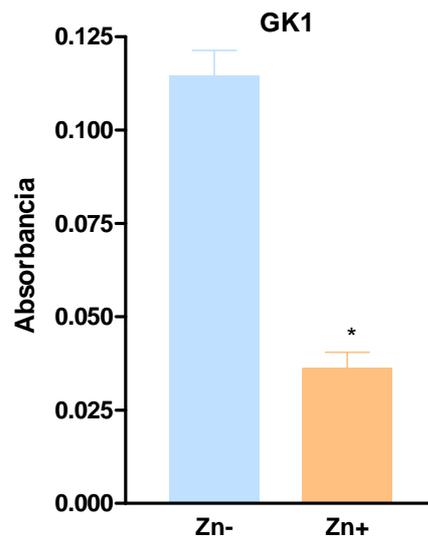


Gráfica 4. Efecto de la suplementación con zinc sobre la respuesta proliferativa de células esplénicas sin estimulación *in vitro* de animales inmunizados con GK1 y de animales de los grupos control, determinado por la incorporación de [^3H] timidina tritiada

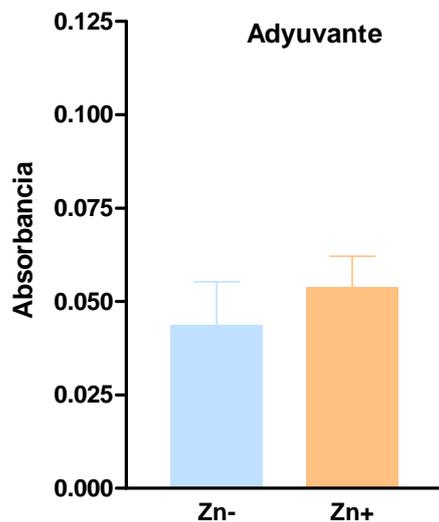
C. Detección de anticuerpos por ELISA

Con el propósito de conocer el efecto inmunológico del zinc sobre el efecto protector del péptido GK1 contra la cisticercosis murina experimental se realizó un ELISA, los resultados son los siguientes:

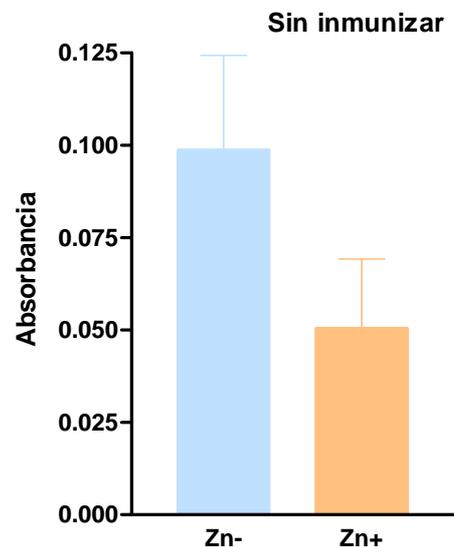
a)



b)



c)



Gráfica 5. Efecto de la suplementación con zinc sobre la producción de anticuerpos anti-GK1 en a) ratones inmunizados con GK1(10 µg/mL); b) ratones inmunizados con saponina (10 µg/mL); c) en ratones sin inmunizar. * $p < 0.0001$.

8. DISCUSIÓN

La deficiencia de zinc es un problema grave en nuestro país. Los efectos relacionados con este problema se reflejan en la salud y particularmente en el sistema inmune.

Trabajos previos de Prasad, Shankar, Dardenne, etc., han demostrado que la deficiencia de zinc incrementa la susceptibilidad a una gran variedad de patógenos; presenta una respuesta celular y humoral disminuida, y afecta la capacidad del hospedero para controlar las infecciones.

La cisticercosis es una enfermedad con grandes implicaciones socioeconómicas y de salud. Considerando el papel de los cerdos como hospederos intermediarios en el ciclo de vida de *Taenia solium*, grupos de investigación se han dedicado a desarrollar una vacuna efectiva que prevenga la cisticercosis porcina como medio para reducir la transmisión a humanos y cerdos ⁽⁴⁷⁾.

En trabajos anteriores del laboratorio de investigación en inmunología se había demostrado que el zinc disminuye 50% la carga parasitaria ⁽¹⁶⁾, se utilizó un modelo experimental murino, se suplementó con 500 mg/L de zinc en el agua de bebida durante la gestación y la lactancia. Se reportó que el zinc incrementa la resistencia en contra de la cisticercosis causada por el cisticerco de *Taenia crassiceps*. En Toledo et al 1999, se menciona que la respuesta generada contra el péptido GK1 protege al hospedero contra la cisticercosis murina, ya que se genera tanto la respuesta celular como la humoral. Se

Indica, además, que los niveles de protección contra la cisticercosis experimental murina se encuentran entre el 40 y el 70%.

Los resultados obtenidos en nuestro estudio nos indican que la suplementación con zinc le confiere una protección al hospedero del 49%. La combinación del suplemento con zinc más la inmunización con GK1 le da a nuestro modelo experimental una protección del 67% (Gráfica 1).

Los ratones suplementados con 500 mg/mL de zinc por períodos mayores a 9 semanas presentan una resistencia a esta parasitosis mayor, comparada con sus controles. Una posible explicación sobre el incremento en la resistencia puede atribuirse a que la suplementación con zinc durante la gestación puede afectar el desarrollo del sistema inmune, promoviendo de manera indirecta el desarrollo de un mayor repertorio antigénico dentro de la inmunidad innata, lo cual puede ayudar a controlar esta parasitosis. Además, se sabe que los requerimientos de zinc durante estas etapas aumentan, por lo que los niveles de zinc tienden a disminuir. La suplementación puede ayudar a restablecer los niveles de zinc y lograr el mantenimiento de una respuesta inmune más eficiente en contra de agentes infecciosos, como en la cisticercosis murina. La resistencia a la cisticercosis murina está dada por la respuesta celular Th1, este perfil le confiere al hospedero protección al evitar el establecimiento del parásito ⁽¹⁶⁾.

Entre las anormalidades bioquímicas e inmunológicas más importantes que se presentan en animales deficientes de zinc se encuentra la respuesta celular disminuida, la cual puede ser ocasionada por daños en la integridad

de la membrana celular, ya que este metal la estabiliza y además juega un papel muy importante como modulador de la señalización celular ⁽⁷²⁾.

En este trabajo vemos que la proliferación celular, en los tres tratamientos, producida en respuesta a la estimulación con ConA (Gráfica 2) aumenta en los grupos que fueron suplementados con zinc, comparado con sus controles.

En cuanto a la estimulación *in vitro* con el antígeno total del parásito (gráfica 3a) los resultados muestran que en los animales inmunizados con el péptido GK1 y suplementados con zinc la proliferación celular disminuye significativamente. En los animales suplementados con zinc e inmunizados con saponina la disminución en la proliferación celular también es significativa, comparando con los controles. Solo en los animales sin inmunizar y suplementados con zinc se nota un aumento en la proliferación pero la diferencia entre ambos grupos no es significativa.

En la gráfica 3b se observa que la proliferación celular, producida por la estimulación *in vitro* con el péptido GK1, en animales suplementados con zinc e inmunizados con la vacuna disminuye significativamente. La proliferación celular en animales suplementados con zinc e inmunizados con saponina también disminuye y la diferencia es significativa. En los animales sin inmunizar y suplementados con zinc se nota un aumento en la proliferación pero la diferencia entre ambos grupos no es significativa.

Fragoso et al 2001, reporta que la proliferación celular en ratones infectados con *Taenia crassiceps* aumenta con la suplementación con zinc.

En Lastra et. al 2001, se menciona que el zinc tiene una acción mitogénica sobre linfocitos esplénicos de ratones suplementados (500mg/L) durante 6

semanas. La suplementación con 500 mg/L de zinc durante 6 semanas aumenta la producción de las monocinas IL-1, IL-12, TNF- α y de las linfocinas IFN- γ e IL-2, en tanto que la suplementación durante 9 semanas disminuye IL-1, IL-12 y aumenta TNF- α ⁽³⁸⁾. Se menciona también que la prolongación de la suplementación con 500mg/L de zinc durante 9 semanas o el aumento de la dosis (1000 mg/L) puede inhibir la producción de citocinas proinflamatorias, la apoptosis, la modulación de la señalización celular y desestabilizar la membrana, lo que a la larga, puede llegar a ser tóxico. Esta toxicidad puede alterar reacciones bioquímicas y manifestarse como una inhibición de la respuesta inmune en general ⁽³⁷⁾.

Mocchegiani, et al 2000 indican que el zinc es muy importante en la fase G0/G1 del ciclo celular y que altas dosis del elemento (900 μ M) ocasiona un arresto en el ciclo celular. La administración de zinc debe ser cuidadosamente monitoreada para obtener efectos óptimos sobre la respuesta inmune.

Según Spolski et. al 2000, la disminución de la proliferación celular en la cisticercosis murina por *T. crassiceps* se debe a ciertos antígenos de excreción/ secreción del cisticerco ^(58,59). Estos antígenos también interfieren en la producción de IFN-gamma e IL-4, además de favorecer la apoptosis de los linfocitos T ^(58,59).

En la Gráfica 5 vemos que la producción de anticuerpos anti-GK1 en los animales que fueron suplementados con zinc e inmunizados con GK1, disminuye significativamente en comparación a sus controles, En los animales inmunizados con saponina y suplementados con zinc la producción de

anticuerpos se eleva, pero esta diferencia no es significativa. En los animales sin inmunizar y suplementados con zinc la producción de anticuerpos se ve disminuida, pero no es significativamente diferente.

Se podría especular que los bajos niveles de anticuerpos inducidos por la inmunización con GK1, pueden ser consecuencia de la suplementación con zinc, durante 6 semanas aumenta la producción de IL-1, IL-12, TNF- α y de IFN- γ e IL-2 teniendo como resultado un perfil Th1 durante la primer dosis de la vacuna, en tanto que al prolongar la suplementación a 9 semanas (los niveles de IL-1, IL-12 disminuyen y los de TNF- α aumentan⁽³⁸⁾). Toledo, et al 1999, reportan la presencia de anticuerpos específicos anti-GK1, después de la inmunización de ratones con el péptido más adyuvante, sin embargo, se menciona también que GK1 tiene poca inmunogenicidad. En García, et al 2001 se menciona que los anticuerpos producidos por la inmunización con el adyuvante solo proporcionan un efecto protector. Se llegó a la conclusión que estas inmunoglobulinas son inespecíficas y que posiblemente son derivadas de la expansión clonal, por lo tanto no ayudan en la resistencia a la cisticercosis. Los anticuerpos producidos por el péptido GK1 son más efectivos en cuanto a la reducción de la intensidad de la infección²⁷. Se ha reportado que los anticuerpos anti-GK1 afectan negativamente la viabilidad de los cisticercos, ya que destruyen las larvas en etapas tempranas de la infección⁴⁰. La inmunoterapia con GK1 en cerdos infectados puede disminuir la transmisión potencial del parásito. Probablemente la suplementación con zinc esta exacerbando la inmunidad innata y es ella quien controla la infección.

9. CONCLUSIONES

La suplementación con zinc favorece la polarización de la respuesta inmune hacia Th1.

La suplementación con zinc afecta la inmunogenicidad y la capacidad protectora del péptido GK1 en cisticercosis experimental murina por *Taenia crassiceps*.

La resistencia a la cisticercosis murina está dada por la respuesta celular Th1, este perfil le confiere al hospedero protección al evitar el establecimiento del parásito.

La resistencia a la cisticercosis murina podría estar dada, también, por los anticuerpos inducidos por la inmunización con el péptido GK1, los cuales destruirían a las larvas del parásito en etapas tempranas de la infección.

La prolongación de la suplementación con 500mg/L de zinc durante 9 semanas o el aumento en la dosis (1000 mg/L) puede inhibir la respuesta inmune en el hospedero, incluso el efecto puede llegar a ser tóxico.

10. BIBLIOGRAFIA

1. Ashworth CJ and Antipatis C. Micronutrient programming of development throughout gestation. *Reproduction* 2001; 122:527-535.
2. Bhaskaram P. Micronutrient, malnutrition, infection and immunity: An Overview. *Nutr Rev* 2002 60(5):540-545.
3. Erickson LK. Micronutrients and Innate Immunity. *J Infect Dis.* 2000; 182 (Sup 1):S5-S10.
4. Faillal Mark. Trace Elements and host defense: Recent Advances and continuing challenges. *J. Nutr* 2003; 133:1443S-1447S.
5. Giuseppe Matarese and Antonio La Cava. The intricate interface between immune system and metabolism. *Trends Immunol.* 2004; 25(4):
6. Salgueiro. Zinc as an essential micronutrient: a review. *Nutr. Res.*2000; 20(5):737-755.
7. Santini MG. Zinc, Su Uso Parenteral. *Bioteconoquímica CA.* 2000. Hallado en www.bioteconoquimica.com
8. Black RE. Zinc deficiency, Infectious Disease and Mortality in the Developing World. *J Nutr.* 2003; 133:1485S-1489S.
9. Fraker JP. Reprogramming of the immune system during zinc deficiency. *Annu Rev Nutr* 2004; 24:277-298.
10. Prasad SA. Effects of Zinc deficiency on Th1 and Th2 cytokine shifts. *J. Infect Dis.* 2000; 182 (supl 1): S62-S68.

11. Aguilar AE, Lastra MD, Maturano A., Hernández R., Pastelin R. IFN gamma secreted by zinc induced murine spleen cells during mice perinatal stages. *Metal Ions in Biology and Medicine: vol. 8.* Eds MA Cser, I Sziklai, László, JC Etienne, Y Maymard, J Centeno, L Khassanova, Ph. Collery. John Libbey Eurotext, © Paris 2004 pp.85-88.
12. Rosado JL. Deficiencia de zinc y sus implicaciones funcionales. *Salud Pública Méx.* 1998; 40(2): 181-188.
13. Bhatnagar S, Natchu UM. Zinc in child health and disease. *Indian J Pediatr* 2004;71:991-995.
14. Fraker JP, King EL, Lakko T and Vollmer LT. The dynamic link between the integrity of the immune system and zinc status. *J Nutr.* 2000; 130:1399S-1406S.
15. Fischer WC and Black ER. Zinc and the risk for infectious disease. *Annu. Rev Nutr* 2004; 24:255-275.
16. Fragoso G., Lastra M.D., Aguilar A.E., Pastelín R., Rosas G., Meneses G, et al. Effect oral zinc supplementation upon *Taenia crassiceps* murine cisticercosis. *J. Parasitol,* 2000;87(5): 1034-1039.
17. Vega RGB, Carrero JC and Ortiz-Ortiz L. Effect of zinc on *Entamoeba histolytica* pathogenicity. *Parasitol Res* 1999;85:487-492.
18. Strand TA, Aaberge IS Ulvestad E and Sommerdelt H. The Immune Response to Pneumococcal Polysaccharide Vaccine in Zinc-Depleted Mice. *Scan. J. Immunol* 2003; 58:76-80.

19. Aluja de, AS y Villalobos ANM. Cisticercosis por *Taenia solium* en cerdos de México. Salud Pública Méx. 2000.
20. Aluja de SA, Villalobos NM, Nava G, Toledo A, Martínez JJ, Plancarte A, Rodarte LF, Fragoso G and Sciutto E. Therapeutic capacity of the synthetic peptide-based vaccine against *Taenia solium* cisticercosis in pigs. Vaccine 2005; 23: 4062-4069.
21. Sciutto E., Fragoso G., Fleury A., Lacleste J.P., Sotelo J., Aluja A, et al. *Taenia solium* disease in humans and pigs: an ancient parasitosis disease rooted in developing countries and emerging as a major health problem of global dimensions. Microbes Infect 2000;2 :1875-1890.
22. Vega R, Piñero D, Ramanankandrasana B, Dumas M, Booteille B, Fleury A, et al. Population genetic structure of *Taenia solium* from Madagascar and México: implications for clinical profile diversity and immunological technology. Parasitol 2003; 33: 1479-1485.
23. Falchuk KH. The molecular basis for the role of zinc in developmental biology. Moll Cell Biochem 1998; 188: 41-44.
24. Bao B, Prasad SA, Frances W, Beck J and Godmere M. Zinc modulates mRNA levels of cytokines. Am J Physiol Endocrinol Metab 2003; 285: E1095-E1102.
25. Prasad AS, Bin Bao, Beck FWJ, Kuck O and Sarker FH. Antioxidant Effect of Zinc in Humans. Free Radic. Biol. Med. 2004; 37(8):1182-1190.

26. Kim PW, Sun ZJ, Blacklow SC, Wagner G and Eck MJ. A Zinc Clasp Structure Tethers Lck to T Cell Coreceptors CD4 and CD8. *Science* 2003; 301:1725-1728.
27. MacDonald SR. The role of zinc in growth and cell proliferation. *J Nutr* 2000; 130:1500S-1508S.
28. McCall AK, Huang C and Fierke AC. Function and mechanism of zinc metalloenzymes. *J Nutr* 2000; 130:1437S-1446S.
29. Prasad SA. Zinc and immunity. *Mol Cell Biochem.* 1998; 188: 63-69.
30. Wellinghousen N. Immunobiology of gestational zinc deficiency. *B. J. Nutr.* 2001;85 (Supl 2):581-586.
31. Castillo-Durán C and Weisstaub. Zinc Supplementation and Growth of the Fetus and Low Birth Weight Infant. *J Nutr.* 2003; 133:1494S-1497S.
32. Chandra RK. Nutrition and the immune system from birth to old age. *Eur. J. Clin. Nutr.* 2002; 56(supl 3): S73-S76.
33. Dardenne M. Zinc and immune function. *Eur. J. Clin. Nutr.* 2002; 56 (supl 3): S20-S23.
34. Shankar AH and Prasad A. Zinc and immune function: the biological basis of altered resistance to infection. *Am J Clin Nutr* 1998; 68:447S-463S.
35. Wapnir RA, Zinc deficiency, malnutrition and the gastrointestinal tract. *J Nutr* 2000; 130:1388S-1392S.
36. Lothar Rink and Holger Kirchner. Zinc-altered immune and cytokine production. *J Nutr* 2000; 130:1407S-1411S.

37. Lastra MD, Pastelín R, Camacho A, Monroy B and Aguilar AE. Zinc intervention on macrophages and lymphocytes response. *J. Trace Elem Med Biol.* 2001;15::5-10.
38. Lastra MD, Aguilar AE, Cabañas MA, Hernández R, Humanez K and Pastelín R. IL-1 α , TNF- α and IL-12 Secreted by Zinc-Induced Murine Macrophages in Vivo and in Vitro. *J Trace Elem Exp Med.* 2004; 17:123-135.
39. Scott EM and Koski GK. Zinc deficiency impairs immune responses against parasitic nematode infections at intestinal and system sites. *J Nutr* 2000; 130:1412S-1420S.
40. Shi NH, Scott EM, Stevenson MM and Koski GK. Energy restriction and zinc deficiency impair the functions on murine T cells and Ag-presenting cells during GI nematode-infection. *J Nutr* 1998;128: 20-27.
41. Pinna K, Kelley DS, Taylor PC and King JC. Immune Functions Are Maintained in Healthy Men with Low Zinc Intake. *J Nutr.* 2002; 132: 2033-2036.
42. Osendarp SJM, West CE and Black RE. The need for maternal zinc supplementation in developing Countries: An unresolved issue. *J Nutr* 2003; 133:817S-827S.
43. Lastra MD, Saldivar L, Martinez K, Munguia N, Marquez C, Aguilar AE. Zinc concentrations during mice gestation. *Biol Trace Elem Res.* 2005;105 (1-3):205-14.
44. Díaz M.A., Villalobos N., De Aluja A., Rosas G., Gómez-Conde E., Hernández P, et al. Th1 and Th2 indices of the immune response in pigs

- vaccinated against *Taenia solium* cysticercosis suggest various host immune strategies against the parasite. *Vet Immunol Immunopathol* 2003; 93: 81-90.
45. Hernández M, Beltrán C, García E, Fragoso G, Gevorkian G, Fleury A, et al. Cysticercosis: towards the design of a diagnostic kit based on synthetic peptides. *Immunol Lett.* 2000; 71(1):13-7.
46. Cruz-Revilla C, Rosas G, Fragoso G, López-Casillas F, Toledo A., Larralde C. and Sciutto E. *Taenia Crassiceps* cysticercosis: protective effect and immune response elicited by DNA immunization. *J. Parasitol* 2000; 86(1):67-74.
47. Garcia G, Sciutto E, Fragoso G, Cruz-Revilla C, Toledo A, Villalobos N, et al. Inhibitory role of antibodies in the development of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* toward reproductive and pathogenic stages. *J Parasitol.* 2001; 87(3):582-6.
48. Toledo A., Larralde C., Fragoso G., Rosas G., Gevorkian G., Hernández M, et al. Two epitopes shared by *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* confer protection against murine *T. crassiceps* cysticercosis along with a prominent T1 response. *Infect. Immun.* 2001;69(3) :1766-1773.
49. Fleury A, Beltran C, Ferrer E, Garate T, Harrison LJ, Parkhouse RM, et al. Application of synthetic peptides to the diagnosis of neurocysticercosis. *Trop Med Int Health.* 2003; 8(12):1124-30.
50. Casagrande BE, Ramos ML, Livramento JA and Vaz AJ. Cellular Response of Patients with neurocysticercosis (inflammatory and non-inflammatory phases). *Acta Trop.* 2004; 91:205-213.

51. Flores-Pérez I, Fragoso G, Sciutto E and AS de Aluja. Apoptosis induced by gamma irradiation of *Taenia solium* metacestodes. *Parasitol Res.* 2003; 90:203-208.
52. Lopez-Briones Sergio. *Taenia crassiceps* cysticercosis: immune response in susceptible and resistant BALB/c mouse substrains. *Parasitol Res* 2003; 90: 236-242.
53. Mooney KA, Spolsky RJ, See EJ and Kuhn RE. Immune Destruction of Larval *Taenia crassiceps* in Mice. *Infect. Immun.* 2000; 68(5): 2393-2401.
54. Padilla A, Govenzensky T, Sciutto E, Jiménez-Gaecía LF, Gonsebatt ME, Ramírez P, et al. Kinetics and characterization of cellular responses in the peritoneal cavity of mice infected with *Taenia crassiceps*. *J. Parasitol* 2001; 87(3):591-599.
55. Morales-Montor J, Baing S, Kabbani A and Damian RT. Do IL-6 and Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) inhibitory factor play a role during sex-associated susceptibility in murine cysticercosis? *Parasitol Res* 2002; 88: 901-904.
56. Morales-Montor J, Hallal_Caballero C, Romano MC, Damián RT. Inhibition of p450 aromatase prevents feminization and induces protection during cisticercosis. *Int J Parasitol* 2002; 32:1379-1387.
57. López BS, Sciutto E, Ventura JL, Zentella A and Fragoso G. CD4+ and CD19+ splenocytes undergo apoptosis during an experimental murine infection with *Taenia crassiceps*. *Parasitol Res* 2003; 90:157-163.

58. Spolski RJ, Corson J, Thomas PG and Kuhn RE. Parasite-secreted products regulate the host response to larval *Taenia crassiceps*. *Parasite Immunol* 2000 ; 22:297-305.
59. Spolski RJ, Thomas PG, See EJ Mooney KA and Kuhn RE. Larval *Taenia crassiceps* secretes a protein with characteristics of murine interferon- γ . *Parasitol Res* 2002; 88: 431-438.
60. Manoutcharian K, Diaz-Orea A, Gevorkian G, Fragoso G, Acero G, González E, et al. Recombinant bacteriophage-based multiepitope vaccine against *Taenia solium* pig cysticercosis. *Vet Immunol Immunopathol.* 2004; 99(1-2):11-24.
61. Sciutto E. New Approaches to improve a peptide vaccine against porcine *Taenia solium* cysticercosis. *Arch Med Res* 2002; 33:371-378.
62. Rosas G, Fragoso G, Garate T, Hernández B, Ferrero P, Foster-Cuevas M, et al. Protective immunity against *Taenia crassiceps* murine cisticercosis induced by DNA vaccination with a *Taenia saginata* tegument antigen. *Microbes Infect* 2002; 4:1417-1426.
63. Toledo A., Larralde C., Fragoso G., Gevorkian G., Manoutcharian, K., Hernández M, et al. Towards a *Taenia solium* Cysticercosis Vaccine: an Epitope Shared by *Taenia Crassiceps* and *Taenia solium* protects mice against experimental cysticercosis. *Infect. Immun.* 1999:67(5) 2522-2530.
64. Morales-Montor J, Baing S, Mitchell R, Deway K, Hallal-Calleros and Damian RT. Immunoendocrine Interactions During Chronic Cysticercosis

- Determine Male Mouse Feminization: Role of IL-6. *J Immunol.* 2001; 167: 4527-4533.
65. Rodríguez-Sosa M, Davis JR, Bojalil R, Satoskar AR and Terrazas LI. Cutting Edge: Susceptibility to the Larval Stage of the Helminth Parasite *Taenia crassiceps* Is Mediated by Th2 Response Induced Via STAT 6 Signaling. *J Immunol* 2002 ;168: 3135-3139.
66. Rodríguez-Sosa M, Rosas LE, David JR, Bojalil R, Satoskar AR and Terrazas LI. Macrophage Migration Inhibitory Factor Plays a Critical Role in Mediating Protection against the Helminth Parasite *Taenia crassiceps*. *Infect. Immun.* 2003;71(3):1247-1254.
67. Rodríguez-Sosa M, Saavedra R, Tenorio EP, Rosas LE, Satoskar AR and Terrazas LI. A STAT-Dependent Th1 response Is Required for Resistance to the Helminth Parasite *Taenia crassiceps*. *Infect. Immun.* 2004; 72(8):4552-4560.
68. Rodríguez-Sosa M, Satoskar RA, Davis RJ, Terrazas LI. Altered T helper response in CD40 and IL-12 deficient mice reveal a critical role for TH1 responses in eliminating the helminth parasite *Taenia crassiceps*. *Int J Parasitol* 2003; 33:703-710.
69. Terrazas LI, Cruz M, Rodríguez-Sosa R, Bojalil, García-Tamayo F, Larralde C. Th1-type cytokines improve resistance to murine cisticercosis caused by *Taenia crassiceps*. *Parasitol Res* 1999; 85:135-141.

70. Toenjes SA. The systemic immune response of BALB/c mice infected with larval *Taenia crassiceps* is a mixed Th1/Th2-type response. *Parasitol* 1999; 117:625-633.
71. Kidd P. Th1/Th2 Balance: The Hypothesis, its Limitations and Implications for Health and Disease. *Altern Med Rev.* 2003; 8(3): 223-246.
72. Kitamura H, Morikawa H, Kamon H, Iguchi M, Hojyo S, Fukada T, et al. Toll-like receptor-mediated regulation of zinc homeostasis influences dendritic cell function. *Nat. Immunol.* 2006;7(9):971-977.