



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

ESTUDIO *IN VIVO* EN EL RATÓN DEL EFECTO
DEL GLICOFOSFOPEPTICAL, SOBRE LA
PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS
ESPECÍFICOS ANTI-GST-r Y ANTI-TPI-r DE
Taenia solium.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A:

PATRICIA CUAUTLE RODRÍGUEZ



MÉXICO, D. F.

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado asignado:

Presidente	Prof. Juan José Mandoki Weitzner
Vocal	Prof. Fernando García Tamayo
Secretario	Prof. Juan Arcadio Molina Guarneros
1er. Suplente	Prof. Maria Eva González Trujano
2º. Suplente	Prof. José Cordero Hernández

Sitio donde se desarrolló el tema: Laboratorio de Inmunofarmacología y Bioterio del Departamento de Farmacología. Facultad de Medicina. U.N.A.M.

ASESOR DEL TEMA:

Dr. JUAN ARCADIO MOLINA GUARNEROS

SUPERVISOR TÉCNICO:

Q.F.B. JUANA GARCÍA MONDRAGÓN

SUSTENTANTE:

PATRICIA CUAUTLE RODRÍGUEZ

Agradezco al Dr. Juan Molina Guarneros por haberme dado la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo, por la confianza, apoyo y dedicación de su tiempo, durante el desarrollo de esta tesis. Dr. Molina, gracias por sus consejos, enseñanzas, observaciones, y deseos de transmitir sus conocimientos y ayudar a la formación de nuevos profesionistas. Gracias por su actitud siempre positiva, optimista, amable, paciente y por los momentos y anécdotas compartidas, las cuales de alguna manera cooperan con una formación integral.

Gracias también a Maribel, mi compañera de laboratorio, de quien siempre he observado y tratado de aprender de su actitud entusiasta y el carácter para enfrentarse a diversas situaciones. Por tener paciencia y compartir conmigo esa aventura de la investigación y el aprendizaje; por su ayuda y consejos, por tener siempre una sonrisa y hacer que el ambiente de trabajo siempre sea más agradable.

Mis más sinceros agradecimientos para Juanita y Amelia, quienes siempre tuvieron la amabilidad y paciencia de enseñarme. Por siempre ser un apoyo y demostrarme que las cosas aunque difíciles, siempre se pueden hacer. Por siempre estar dispuestas a ayudar. Aunque les causé muchas molestias, siempre estuvieron ahí y fueron mis cómplices. También agradezco a la Señora Matilde quien siempre colaboró conmigo e hizo que todo fuera más agradable.

Gracias al Dr. Abraham Landa, a Lucía y su equipo de trabajo por haberme proporcionado las proteínas utilizadas en este experimento, así como su ayuda y observaciones aportadas a mi formación.

Dedico el presente trabajo a mi familia, como muestra de agradecimiento y el profundo amor hacia ellos. Por ser parte imprescindible en mi vida, por todas las experiencias vividas, por todos esos tropiezos que juntos hemos tenido y también por toda esa felicidad con la que nos hemos levantado. Por que tengo la seguridad que siempre estaremos juntos y por el amor que siempre nos hemos tenido, nos tenemos y tendremos, por que el amor siempre ha sido lo más importante en nuestra familia. Gracias a mi padres por la educación que me brindaron, ya que gracias a ellos soy quien soy. Este trabajo es el reflejo del esfuerzo de ustedes.

Agradezco el apoyo de mis hermanas, ya que gracias a su amor, interés y ejemplo; he podido salir adelante y disfrutar aún más mi vida. Gracias por siempre estar ahí y quererme como soy.

A María Luisa, por ser siempre optimista y perseverante. Por darnos una alegría inmensa: Jimena, quien llegó a iluminar nuestras vidas. También quiero compartir este momento con Paul, quien también ha sido parte de nuestras vidas y con quien nos hemos divertido.

A Edith, a quien admiro y respeto; por tener siempre interés en que las cosas sean mejores, por luchar siempre, por su sensibilidad por ser siempre un apoyo para mi.

A Angélica, como bien le pusieron mis papás. A ese angelito que llegó a llenar mi vida de amor, hermanita: gracias por ser siempre mi compañera, por estar conmigo y por regalarme siempre tu ternura y alegría.

También agradezco a todos mis amigos, quienes han formado parte de mi vida y que han dejado huella. Gracias por todos esos momentos, siempre divertidos, siempre buenos, siempre tan nuestros. Muchas gracias por permitirme ser parte de su vida, por tener el placer de conocerlos y disfrutar de su compañía.

Gracias especialmente a mis amigos de la dona, quienes tuvimos la fortuna de convivir durante toda la carrera, quienes disfrutamos y sufrimos; y que afortunadamente seguimos juntos.

Dedico este trabajo también, a la persona que siempre me ha apoyado a lo largo de toda la carrera. No solo agradezco su ayuda, sino también deseo decirle que éste también es su trabajo, ya que juntos hemos conseguido culminarlo.

A ARTURO, la persona más sensible, más tierna, más humana, a quien tuve la fortuna de conocer al inicio de éste sueño.

Gracias por haber llegado a mi vida, por caminar siempre a mi lado, por siempre apoyarme emocionalmente, por trabajar conmigo, por ser un magnífico equipo.

Dedico este trabajo a mi compañero y amigo desde primer semestre, a mi fabuloso compañero en tantos laboratorios, siempre un buen equipo y un magnífico ejemplo. A mi amigo, quien siempre ha estado ahí para escuchar mis tristezas, mis alegrías, mis enojos, mis momentos de desesperación, y los momentos más importantes de mi vida. Gracias por siempre estar dispuesto a darme un abrazo, por decirme tu opinión y hacerme reflexionar, por simplemente siempre estar ahí, no sólo cuando te necesité.

A mi novio, quien siempre tuvo confianza en mi y me apoyo, quien siempre tuvo palabras de aliento, quien siempre me ayudó no sólo en cuestiones emocionales, sino también estuvo ahí para ayudarme en la realización de esta tesis, desde su inicio hasta el último detalle. Muchas gracias.

Gracias a Arturo por ser todas esas personas al mismo tiempo para mi, por ser un excelente ser humano al cual admiro y de quien cada día aprendo cosas nuevas, por ser siempre el mejor amigo, por ser un excelente equipo de trabajo y por ser un novio excepcional. Gracias por amarme de todas las maneras posibles.

ESTUDIO *IN VIVO* EN EL RATÓN DEL EFECTO
DEL GLICOFOSFOPEPTICAL, SOBRE LA
PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS
ESPECÍFICOS ANTI-GST-r Y ANTI-TPI-r DE
Taenia solium.

CONTENIDO

	Página
ABREVIATURAS	5
INTRODUCCIÓN	7
1. GENERALIDADES	9
1.1. Antecedentes Históricos	9
1.1.1. Glicofosfopeptical	9
1.1.2. <i>Taenia solium</i> y vacunación	14
1.1.3. GST-r y TPI-r	17
1.1.3.1. GST-r	17
1.1.3.2. TPI-r	18
1.2. Marco Teórico	19
1.2.1. Composición del Glicofosfopeptical	19
1.2.2. <i>Taenia solium</i> : Definición y estructura	20
1.2.3. Composición y definición de enzimas GST-r y TPI-r	24
1.2.4. Respuesta inmunológica y adyuvantes	26
1.2.4.1. Respuesta inmunológica	26
1.2.4.2. Adyuvantes	29
2. MATERIALES Y MÉTODOS	31
2.1. Equipos y reactivos	31
2.1.1. Equipos	31
2.1.2. Reactivos	32
2.2. Metodología	33
2.2.1. Cuantificación de proteína	33
2.2.2. Electroforesis: Pureza de proteínas	33
2.2.3. Esquema de Inmunización, tratamiento con Glicofosfopeptical y obtención de muestras.	34
2.2.4. Determinación de anticuerpos mediante ELISA indirecto	36
3. RESULTADOS	38
3.1. Cuantificación de proteínas	38
3.2. Electroforesis	39
3.3. Determinación de anticuerpos anti-GST-r y anti-TPI-r	41
4. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	47
5. BIBLIOGRAFÍA	51
6. APÉNDICES	58
7. GLOSARIO	62

ÍNDICE DE FIGURAS

No. Figura	Observación	Página
1	Imágenes de huevo, escólex y proglótidos grávidos de <i>Taenia solium</i>	20
2	Anatomía de <i>Taenia solium</i> (componentes estructurales)	21
3	Imagen de huevo de <i>Taenia solium</i>	22
4	Imagen del escólex, cuello y proglótidos de <i>Taenia solium</i> .	22
5	Esquema del ciclo biológico de <i>Taenia solium</i>	23
6	Estructura tridimensional de la triosa fosfato isomerasa	25
7	Esquema de interacción entre células y componentes solubles de la respuesta inmune.	27
8	Esquema de la relación celular entre macrófago, linfocitos T y linfocitos B.	28
9	Gel de poliacrilamida: Ubicación de las muestras	33
10	Clave de marcación de ratones	34
11	Esquema de la formación de grupos experimentales de trabajo (estratos balanceados de pesos).	34
12	Esquema de inmunización	35
13	Esquema ELISA Indirecto	36
14	Esquema: Controles del ensayo (ELISA Indirecto)	37
15	Gel de poliacrilamida: Pureza de proteínas	39
16	Gráfica de controles de ensayo ELISA Indirecto para anticuerpos anti-GST-r	42
17	Gráfica de controles de ensayo ELISA Indirecto para anticuerpos anti-TPI-r	42
18	Gráfica de la respuesta Inmune humoral generada por GST-r y sus controles.	43
19	Gráfica de la respuesta Inmune humoral generada por TPI-r y sus controles.	45

TABLA DE ABREVIATURAS

Ac	Anticuerpo
AFC	Células formadoras de anticuerpos
Ag	Antígeno
AM3	Glicoconjugado (Glicofosfopeptical)
Anti-IgG-FA	Anticuerpo anti ratón producido en cabra, anti-IgG conjugado a fosfatasa alcalina
CDNB	1-cloro-2,4-dinitrobenceno
CMC	Carboximetilcelulosa
EC	Extracto crudo
ELISA	Ensayo inmunoenzimático en fase sólida
Fig.	Figura
GALT	Tejido linfoide asociado a tracto gastrointestinal.
GM-CFS	Factor estimulador de colonias granulocito-macrófago
Gp	Glicofosfopeptical (Inmunol)
GPX	Glutación Peroxidasa
GST	Glutación S-transferasa
GST-r	Glutación S-transferasa recombinante
GSTs	Superfamilia de enzimas Glutación S-transferasas
GSTT	Glutación S-transferasa de <i>Tenia</i>
Ig	Inmunoglobulinas
IgG	Inmunoglobulina clase G
IL	Interleucina
INF- γ	Interferón – gamma
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducida
LGL	Linfocito granular largo
LPS	Lipopolisacárido

MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
NK	Células asesinas naturales
OVA	Ovoalbúmina
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
PMN	Células polimorfonucleares
RO	Radicales de oxígeno
SDS	Duodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida Con dodecil sulfato de sodio
Tc	Linfocito T citotóxico
TEA	Amortiguador de trietanolamina
Th1	Linfocito T cooperador clase 1
Th2	Linfocito T cooperador clase 2
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
TPI	Triosafosfato isomerasa
TPI-r	Triosafosfato isomerasa recombinante

ABREVIATURAS (UNIDADES DE MEDIDA)

10 X	Diez veces la concentración
°C	Grados centígrados
g	Gramo
µg	Microgramo
kDa	Kilodaltones
M	Molar
V	Volt
mA	mili Ampere
2,375 X g	Equivalente a 7000 rpm

INTRODUCCIÓN

La neurocisticercosis y teniosis causadas por *Taenia solium* generan graves problemas de salud pública y pérdidas económicas en países subdesarrollados como México. La ignorancia y pobres condiciones sanitarias en el manejo de animales portadores del parásito (cerdos) nos llevan a una continua transmisión del mismo, y a un incremento en los padecimientos no sólo en países del tercer mundo, sino también empieza a serlo en los países desarrollados; por lo que ha surgido la necesidad de desarrollar vacunas y/o fármacos para erradicar al parásito.

Tanto la triosafosfato isomerasa (TPI-r) como la Glutación S- transferasa (GST-r), son proteínas candidatas para la producción de una vacuna contra la cisticercosis provocada por *Taenia solium*, ambas enzimas de origen recombinante, participan en el metabolismo de energía y neutralizan la toxicidad de xenobióticos.

Las infecciones del tracto digestivo y respiratorio son la principal causa de morbilidad en México. En la actualidad se utiliza un modificador de la respuesta biológica (Glicofosfopeptical) como adyuvante en tratamientos con antibióticos y antivirales. Además de ser considerado como estrategia en el manejo de pacientes inmunocomprometidos y sometidos a quimioterapia, debido a su efecto protector de la médula ósea.

Las sustancias inmunomoduladoras constituyen una familia muy heterogénea si se toman en consideración su origen, naturaleza química y actividad biológica específica. Con su empleo se logra una economía de antígeno y de tiempo, así como un mayor nivel de anticuerpos específicos.

El desarrollo de adyuvantes inmunológicos, como el Glicofosfopeptical, al cual respaldan varias investigaciones; sugieren su utilización como adyuvante de vacunas por su capacidad de inducir citocinas endógenas (V.gr. IL- 1 α) y a la estimulación de células inmunes.

El Glicofosfopeptical tiene la capacidad de regular el funcionamiento de algunas células del sistema inmunológico e incluso activarlas mediante factores solubles; por lo que la hipótesis de trabajo es: si se administra el Glicofosfopeptical vía oral durante cinco días posteriores a las inmunizaciones (en animales de experimentación), se incrementarán los niveles séricos de anticuerpos específicos en la respuesta inmune murina primaria y secundaria.

El objetivo general de este trabajo es Investigar si el glicofosfopeptical modifica en el ratón la producción de anticuerpos específicos anti-GST-r y anti-TPI-r de *Taenia solium*. Los objetivos particulares son: 1) Implementar un modelo experimental que nos permita observar y medir la existencia de dicho fenómeno, así como verificar la pureza y realizar la cuantificación de proteínas a utilizar. 2) Determinar los anticuerpos anti-GST-r y TPI-r mediante ensayos inmunoenzimáticos en fase sólida del tipo indirecto (ELISA).

1. GENERALIDADES

1.1. Antecedentes históricos.

1.1.1. GLICOFOSFOPEPTICAL (Gp)

Es el principio activo de un medicamento denominado Inmunoferrón (España) e Inmunol (México). Los primeros reportes que se encontraron de este polisacárido se refieren a investigaciones realizadas en España y comienzan en 1984, pero aparecen en revistas de escasa difusión internacional. Ollera Tassara (Geriatría) reporta en este mismo año: El uso de un nuevo inmunoestimulante como tratamiento de bronquitis y por otro lado Muñoz-Duque y colaboradores también informan un estudio sobre este nuevo inmunoestimulante. Ambas investigaciones reportan una mejora en la salud de los pacientes tratados con Gp (Glicofosfopeptical), pues se reduce el tiempo de estancia en el hospital de dichos pacientes.

Glicofosfopeptical actúa a nivel del tejido linfoide y macrofágico asociado al intestino, activando y logrando modificar los mecanismos celulares efectores (Células polimorfonucleares, sistema monocito-macrófago, y células asesinas naturales) así como la producción de citocinas endógenas (Interleucinas, IL-1 α y factor de necrosis tumoral alfa, TNF- α), implicados en la resistencia anti-infecciosa y antitumoral (PLM, Thompson: 2005).

Años más tarde Rojo (1986) presentó su trabajo sobre el incremento en actividad de células asesinas naturales (NK), de producción de IL-2 y sobre proliferación linfocitaria en modelos murinos, donde encontró que al administrar 300 μ g de Gp por cada 10 g peso del ratón, en forma diaria; la actividad de las células NK y la producción de IL-2 en el bazo se

incrementaron y el efecto fue mayor tras una administración diaria del glicofosfopeptical. Aunque no observó un efecto mitogénico considerable para linfocitos T y B en ratones normales, si lo pudo apreciar en ratones inmunosuprimidos. De ahí que surgiera el interés por este regulador de la respuesta biológica (Gp) (Rojo, 1986).

Se realizaron varias investigaciones en el área geriátrica entre 1989 -1995 y todas señalan que los pacientes tratados con Glicofosfopeptical tienen una recuperación más rápida de infecciones respiratorias, sin embargo, aún no se encontraban reportes a nivel internacional que señalaran una mayor evidencia sobre este medicamento. El uso del glicofosfopeptical en pacientes de la tercera edad fue estudiado abundantemente debido a que estos individuos presentan mayor vulnerabilidad hacia las infecciones pues su sistema inmunológico se encuentra disminuido, ya que con el transcurso de la vida y a mayor edad, componentes del sistema inmunológico, como el timo, disminuyen en tamaño y función.

En 1995 aparece un primer artículo en Stem Cells, donde Güenechea y colaboradores reportaron que el Gp estimuló la hematopoyesis y al factor de crecimiento hematopoyético endógeno en un sistema murino, encontraron que hubo un incremento dosis-dependiente en las células progenitoras hematopoyéticas en los sistemas tratados con Gp, también determinaron mediante Northern blots, que hubo un incremento en la expresión del mRNA de IL-1 α y en el factor estimulador de colonias granulocito-macrófago (GM-CSF), estos resultados sugirieron que la estimulación hematopoyética por Glicofosfopeptical está mediada por la inducción de factores de crecimiento endógenos (Güenechea, 1995).

A partir del año 2000, se realizaron las primeras investigaciones en México relacionadas con el uso del Glicofosfopeptical, donde Ramírez (2000) señaló que, en un modelo murino de quemaduras y heridas, hubo una recuperación más rápida y mayor de las lesiones que presentaban los pacientes, quizá por la acción moduladora del Glicofosfopeptical pues genera mediadores de la inflamación y estimula la proliferación

Celular (Ramírez, 2000). El mismo investigador señaló que encontró un efecto inmunoestimulante en pacientes traumatizados, pues ellos tienen reacciones inmediatas al traumatismo; como es alteración en la fagocitosis, la disminución discreta pero constante de la respuesta inmunitaria (CD4, CD8 y NK). Los resultados encontrados fueron de estimulación, en los casos tratados con Glicofosfopeptical pues hubo un aumento de células con actividad fagocítica (200 %, promedio) y niveles de leucocitos constantes y normales (5000 a 10 000, a pesar de traumatismo), cabe mencionar que los pacientes que fueron tratados con placebo no mostraron dicho aumento de actividad además de presentar leucocitosis persistente. Además el principal resultado fue la reducción hasta en un 50 % en el tiempo de estancia hospitalaria y un hallazgo inesperado que prueba la actividad estimulante del Gp en la hematopoyesis (elevación en el número plaquetas) (Ramírez, 2002). Prieto también encontró un efecto estimulante en la actividad fagocítica de PMN y Células del sistema monocito-macrófago (50 %) y aumento en la actividad de las células NK (50 %) en pacientes con las enfermedades pulmonares crónicas.

Junto con éste hubo más reportes, el uso de Gp en niños con leucemia aguda linfoblástica, ya que mostraron un número menor de infecciones comparados con los no tratados con AM3 (Glicofosfopeptical), así como una menor pérdida de leucocitos, neutrófilos, monocitos y plaquetas (Moreno, 2003). Por su parte, Ruiz mostró la utilidad del AM3 como adyuvante en lesiones del pie diabético, pues hay evidencia de disfunciones inmunitarias asociadas a la enfermedad, como son deterioro de quimiotaxis de polimorfonucleares (fagocitosis) y disminución de CD4 (Ruiz, 2000). El grupo de investigación de Brieva, publicó que el Glicofosfopeptical regula la producción de TNF- α generado por el sistema monocito-macrófago y que es inducido por estímulos proinflamatorios como el Lipopolisacárido (LPS).

Existe una regulación del sistema inmune por glucocorticoides y otros productos del eje HPA (Sistema adrenal-pituitaria-hipotálamo) durante la inflamación, dicha inflamación induce la activación del sistema monocito-macrófago y la expresión de citocinas proinflamatorias como TNF- α , IL-6, etc; estas citocinas promueven la respuesta neuroendócrina y metabólica de la inflamación y cuando es excesiva, logra estimular a su vez la producción de proteínas hepáticas que tienen el papel de limitar la inflamación (proteínas de fase aguda: Fibrinógeno, hematóglubulina, α 1-anti-tripsina y α -1 anti-quimiotripsina); la actividad de anti-proteasas les confiere a estas proteínas la capacidad de limitar los procesos inflamatorios y protege o evita el daño directo a los tejidos. También encontraron que los hepatocitos de ratas que recibieron Gp eran viables pues no sufrieron daño por administración del medicamento (Brieva, 2002).

Debido a la administración del Glicofosfopeptical como adyuvante en otros tratamientos en humanos, se volvió necesario determinar si la coadministración del inmunoregulador afecta la actividad de los otros medicamentos. En investigaciones realizadas se encontró que no hubo diferencia en el metabolismo de la antipirina en animales tratados con y sin Glicofosfopeptical, además no hubo variación a nivel Citocromo P-450 ni en fase II de conjugación por lo que Gp no es capaz de afectar al sistema de bioconjugación hepática y parece no interactuar ni modificar el efecto al ser coadministrado con otros medicamentos (Brieva, 2003).

La información más reciente (2004 – 2006), también le atribuye al AM3, la inhibición de la expresión y acumulación del mRNA del virus de la hepatitis B (50 %) mediante un mecanismo indirecto; a través de activación de células mononucleares de sangre periférica, producción y secreción de INF- γ e IL-1 α (Brieva, 2004). Además el AM3 vía oral también logra disminuir en un 40 % la acumulación de NO lo que demuestra que hay una inhibición

de la expresión de la iNOS, y posiblemente esta relacionada esta inhibición con la del TNF- α y los macrófagos, quienes son una fuente importante de iNOS (Brieva, 2005).

En el 2006 en el laboratorio de Inmunofarmacología (Departamento Farmacología) de la Facultad de Medicina (UNAM), se realizó un estudio preliminar titulado “Estudio *In vivo* del efecto del glicofosfopeptical, sobre la producción de anticuerpos específicos en la respuesta inmune murina primaria y secundaria”, donde se utilizó como antígeno a la OVA (Ovoalbúmina), una proteína conservada evolutivamente. Se administró el Glicofosfopeptical posterior a cada una de las inmunizaciones (2 administraciones mediante la vía subcutánea) por un periodo de 5 días. Se evaluaron tres dosis del inmunomodulador, la equivalente a la utilizada en humanos 430 μg Gp por cada 10 g (peso del ratón), 4.3 μg Gp/10 g y 0.43 μg Gp/10 g. Se encontró un incremento del 14 % en la producción de anticuerpos anti-OVA con la dosis mayor del Glicofosfopeptical, 11% con la dosis 100 veces menor a la anterior y 7% con la dosis más baja. Es importante mencionar que no se habían encontrado reportes sobre la influencia del Gp en la respuesta inmune humoral por lo que dicho estudio preliminar muestra un efecto estimulante del Gp sobre la producción de anticuerpos en la respuesta inmune secundaria.

1.1.2. *Taenia solium* Y VACUNACIÓN.

Akira (1991) reporta un análisis preliminar de resultados de una vacunación contra *Taenia taeniaeformis* usando una proteína recombinante (GST de fusión) y demostró que era altamente efectiva pues logró disminuir entre 90 – 95 % la carga parasitaria en animales infectados con oncosferas. Posterior a este trabajo se sugirió que los antígenos de la oncosfera, al ser purificados, podrían funcionar como antígenos para generar protección. También reportó que todas las ratas vacunadas con la proteína GST de fusión mostraron fuerte resistencia contra la infección provocada por el parásito. Pero se tuvo el inconveniente que otras proteínas provenientes de otras clonas (misma familia de proteínas) no lograron generar protección. Sin embargo, este estudio muestra la posibilidad de la generación de vacunas contra parásitos y que tienen cierta efectividad (Akira, 1991). Más adelante Toenjes (1998) demuestra que hay un incremento de IFN- γ (100 veces mayor al control) e IL-4 (460 veces) tras la infección con antígenos larvarios de *Taenia crassiceps* (Toenjes, 1998).

En 2001, se encontró que los antígenos recombinantes de *Taenia crassiceps*, KETc1 y KETc12, indujeron el 100 % y el 80 % de protección respectivamente, contra la cisticercosis en un modelo murino para *Taenia crassiceps*. Dichos antígenos recombinantes también se encuentran en *T. solium* (en su forma no recombinante) y están presentes en todos los estadios del parásito, por lo que pueden ser considerados como candidatos para una vacuna contra la cisticercosis porcina causada por dicho helminto (Toledo, 2001).

Posteriormente se encontró otro antígeno, KETc7 y al realizar un ensayo de protección, encontraron que presenta niveles de protección estadísticamente significativos ($p < 0.05$) contra la cisticercosis murina producida por *Taenia solium*.

También encontraron la estructura primaria de dicha proteína y obtuvieron tres fragmentos GK-1, GK-2 y GK-3 y al evaluarlos obtuvieron como resultado que sólo GK-1 induce protección del 40 al 70 %, así como su habilidad para inducir una respuesta de anticuerpos debido a que al menos debe tener un epítipo para las células B y al menos uno para células T ya que estimula a CD4 y CD8. Es importante mencionar que dicho péptido no necesita proteína acarreadora y además se encuentra en todos los estadios del parásito. Por lo antes mencionado éste péptido se considera también como fuerte candidato para una vacuna sintética contra la cisticercosis porcina causada por *Taenia solium* (Toledo, 1999).

En un estudio más reciente, se vacunaron 5 cerdos con el tri-péptido sintético S₃Pvac (KetC1, KetC12 y GK-1) contra *Taenia solium* y posteriormente adquirieron la infección en forma natural con dicho parásito; se evaluaron los niveles de citocinas (INF- γ , IL-2, 4 y 10) y se encontró un incremento estadísticamente significativo ($p < 0.05$) únicamente en la producción de las citocinas IL-2 e INF- γ , las cuales polarizan la respuesta inmune celular hacia los linfocitos Th1. Esta respuesta celular (Th1) permite exacerbar la inflamación local en el sitio cercano en donde se encuentra el cisticerco y podría interferir con el establecimiento exitoso del parásito. “La infección en forma natural es un escenario real donde las vacunas deben mostrar su verdadero efecto”, dice la Dra. Edda Sciutto. Encontraron que los niveles de anticuerpos contra el tripéptido sintético (Ketc1, KetC12 y GK-1) fueron mayores (estadísticamente significativos con una $p < 0.001$) con respecto al control (Díaz, 2003).

Hacia el desarrollo de una vacuna en contra de la cisticercosis porcina basada en la paramiosina de *Taenia solium*, es el título de un trabajo publicado en 2003 por Laclette y su grupo, en el cual muestran los resultados de un ensayo de protección en un modelo murino de cisticercosis en ratones inmunizados con fragmentos recombinantes de TPmy (Paramiosina de *Taenia solium*) y revelaron que induce el 60 % de protección en contra de un reto intraperitoneal con cisticercos de *Taenia crassiceps*.

La proteína mejor caracterizada del cisticerco de la *Taenia solium* es el antígeno B, que posteriormente se identificó como una paramiosina. Los resultados obtenidos en los ensayos de protección en ratones son altamente prometedores, ya que esta parece estar relacionada con la respuesta Th1 (Solís, 2004).

El uso de proteínas oncosferales de *Taenia solium* con fines de investigación son reducidas debido a que hay escasez de las oncosferas y el riesgo que implica trabajar con ellas es alto, pues es una forma infectante para el ser humano. El estadio larvario o cisticerco es ventajoso ya que presenta una mayor cantidad de proteína y no presenta riesgos (Jiménez, 2000).

La gran adaptación del parásito a su hospedero se refleja en que la forma larvaria sobrevive en tejidos por varios años y esto es posible debido a sus mecanismos de evasión, tal es el caso de las enzimas, como las que eliminan o reducen la toxicidad, puesto que inactivan a los radicales libres de oxígeno (RO) generados por las células inmunes en respuesta a los parásitos. La glutatión S-transferasa (GST), glutatión peroxidasa (GPx), y Glutatión reductasa, inactivan RO secundarios así como a otros compuestos electrofílicos como algunos medicamentos.

Algunas enzimas detoxificantes en céstodos se han purificado, como la GST. La glutatión S-transferasa se purificó parcialmente en 4 especies de céstodos, incluida *T. solium* y es muy abundante en ellos. Se purificó y se encontró en gran cantidad en el tegumento del cisticerco. Tras realizar ensayos de protección se vio que logra reducir la carga parasitaria hasta en un 74 % en un modelo de cisticercosis murina (*Taenia crassiceps*) (Vibanco, 2001). La triosa fosfato isomerasa (TPI) es de gran interés pues su deficiencia provoca serias complicaciones en el desarrollo y su carencia resulta en la muerte del organismo. Esta enzima es considerada como un candidato a vacuna en contra de la esquistosomiosis por *S. mansoni* y la cisticercosis por *T. solium*. (Jiménez, 2001).

1.1.3. GST-r y TPI-r

1.1.3.1. GST-r

Se reportó recientemente que la GST es reconocida por anticuerpos de ratones previamente infectados con *S. japonicum*. Smith purificó a la glutatión S-transferasa de parásitos y la consideró como candidata para ser un antígeno vacunal, sus resultados sugieren que la enzima puede ser expuesta hacia el sistema inmune del hospedero en los parásitos y por ello funcionar como antígeno vacunal (Smith, 1997). Nava y su grupo de trabajo, reportan la purificación y caracterización de la Glutatión S-transferasa microsomal de cisticercos de *Taenia solium* e indican que los cisticercos podrían utilizar dicha enzima como mecanismo de evasión (Nava, 2005).

La importancia de la enzima y la factibilidad de usarla como antígeno protector, fue puesta de manifiesto en un experimento en el cual se obtuvieron ratones transgénicos que expresaban la GST de 28 kDa de *S. mansoni*. Si estos ratones transgénicos eran infectados con el parásito, la carga parasitaria se incrementaba significativamente respecto a los ratones no transgénicos. Además ratas inmunizadas intradérmicamente con un plásmido conteniendo DNA que codifica para la GST de *S. mansoni*, produjeron IgG 2a e IgG 2b en su suero. La respuesta de citocinas (IL-2 e INF- γ) polarizaron la respuesta celular hacia Th1, además que el suero de estas ratas indujo una respuesta celular citotóxica dependiente de anticuerpos *in vitro* (Nava, 2005).

1.1.3.2. TPI-r

Landa, en 2000 publicó información sobre la clonación, expresión y caracterización de la triosafosfato isomerasa recombinante de *Taenia solium* (TPI-r), pero aún cuando la enzima es altamente eficiente es poco expresada en varios organismos (10 g de homogenado de cisticercos proporcionan 0.01 mg de TPI). También encontraron que la TPI se encuentra en todas los estadios del parásito por lo que sugiere que ésta enzima se expresa en todo su ciclo de vida. La distribución celular y localización de la triosa fosfato isomerasa en los céstodos, es desconocida, pero si sabe que es esencial para ellos. La deficiencia de TPI puede producir disfunción, anemia hemolítica, etc. Estas características sugieren que su inhibición puede inducir la destrucción del parásito.

En un ensayo de protección realizado en un modelo de cisticercosis murina-*Taenia crassiceps*, se encontró que al inmunizar ratones con 5 µg de TPI-r, se logró una reducción del 45 % de la carga parasitaria y cuando se inmunizó con 1 µg de TPI-r, la reducción fue del 52 % (Jiménez, 2003).

1.2. Marco Teórico

1.2.1. COMPOSICIÓN DEL GLICOFOSFOPEPTICAL

El glicofosfopeptical esta constituido por un componente orgánico, consistente en un polisacárido de origen fúngico, extraído de la pared celular de la levadura *Candida utilis*, es un Glucan – manan β 1-6 unido no covalentemente a una proteína de origen vegetal proveniente de la semilla no germinada de *Ricinus communis*, y adsorbidos ambos en una matriz inorgánica de fosfato-sulfato-cálcico (Brieva, 2001).

A través de procedimientos bioquímicos y comparación con bases de datos de proteínas, se aisló e identificó la proteína a la que está unido el polisacárido. Dicha proteína se denominó RicC3, y está compuesta de dos subunidades diferentes, alfa y beta, que forman un heterodímero de alta estabilidad y resistencia a la desnaturalización, al pH y a las enzimas proteolíticas. Estos datos confirman las excelentes propiedades del producto después de la administración por vía oral (Pantoja, 2003).

La matriz inorgánica se solubiliza completamente en el medio ácido estomacal, liberando de esa manera el componente orgánico (Gp) en aproximadamente media hora, se sabe que sólo el 5 % del total del medicamento es absorbido y pasa al torrente sanguíneo y el resto es eliminado por las heces sin metabolizarse (Brieva, 2002).

1.2.2. *Taenia solium*: DEFINICIÓN Y ESTRUCTURA.

Taenia solium es un céstodo (platelminto) parásito del hombre y del cerdo.

Reino: *Animalia*

Phylum: *Platyhelminthos*

Clase: *Cestoda*

Orden: *Cyclophyllidea*

Familia: *Taeniidae*

Género: *Taenia*

Especie: *solium*



Figura 2a. Huevo de *Taenia* sp.

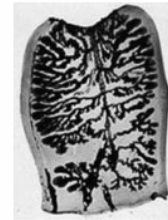


Figura 2d. Proglótido gravido de *Taenia solium*.



Figura 2b. *Taenia solium* (armado). Escólex que muestra cuatro ventosas y doble corona de ganchos.

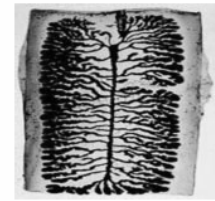


Figura 2e. Proglótido gravido de *Taenia saginata*.

Fig. 1

Huevo, escólex y proglótidos grávidos de *Taenia solium*.

El adulto (solitaria) de *T. solium* es un gusano plano que llega a medir de 2 a 7 m. Habita en el intestino delgado del hombre. Provista de un tegumento o epitelio que le permite absorber los nutrientes del medio, la *Taenia* carece de un tubo digestivo interno. A través del escólex se mantiene firme en el primer tercio del intestino delgado, es del tamaño de una cabeza de alfiler y su forma es cuboide; posee una doble corona de ganchos o rosetos y cuatro ventosas, con los primeros se prende del intestino y con las segundas se adhiere a sus paredes (Castro, 2005).

Posterior al escólex o cabeza se encuentra una porción no segmentada llamada cuello o región cervical.

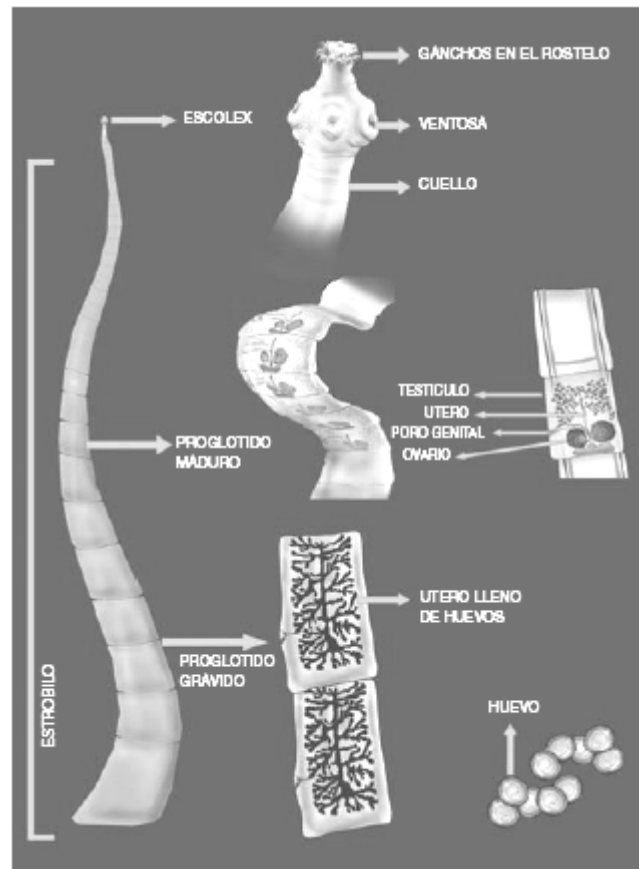


Fig. 2
Estructura de *Taenia solium*

El cuerpo de la tenia, estróbilo, está segmentado y cada segmento o proglótido inicia de una región germinal en la porción inferior del escólex. Los proglótidos más cercanos al cuello son inmaduros, sin órganos sexuales desarrollados; van mostrando un grado creciente de desarrollo y diferenciación a medida que se alejan del escólex, hasta aparecer segmentos maduros en la parte media del estróbilo (Flisser, 2006).

Cada proglótido maduro posee órganos genitales masculinos y femeninos, pues es un parásito hermafrodita. Los proglótidos más alejados del escólex muestran útero “grávido” ramificado, lleno de huevos (aprox. 50,000 en cada uno), dichos segmentos, son liberados

espontáneamente por la solitaria con las heces. Conforme se van expulsando proglótidos grávidos, van gestándose otros nuevos en el cuello. Los huevos son semiesféricos, de color ámbar a café nogal.

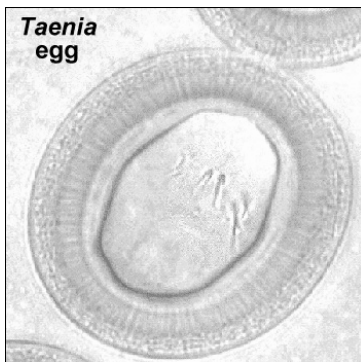


Fig. 3

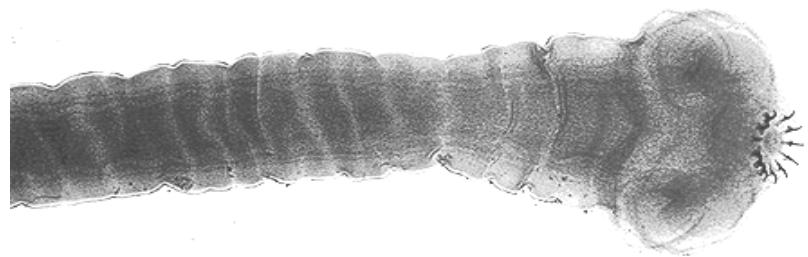


Fig. 4

(3) Huevo y (4) escólex de *Taenia solium*

El ciclo biológico de *Taenia solium*: Se Alterna entre el ser humano como hospedero definitivo y el cerdo como principal hospedero intermediario. En su estado adulto, el platelminto habita en el intestino humano y su presencia ocasiona la teniosis. La tenia, o solitaria, produce miles de huevos, que se expulsan con las excretas. El cerdo se infecta al ingerir heces donde hay huevos o segmentos del parásito adulto. Cada huevo puede convertirse en un cisticerco, forma larvaria del parásito. El cisticerco ocasiona la cisticercosis porcina. El ciclo culmina cuando el hombre consume carne de cerdo infectada con cisticercos y a medio cocer, lo que permite la supervivencia de las larvas.

Las larvas se fijan a las paredes del intestino humano donde maduran hasta convertirse en gusanos adultos. La falta de higiene y la convivencia con un portador del parásito, pueden ocasionar la ingestión de huevos, desarrollándose la cisticercosis humana (Flisser, 2006).

Ciclo biológico de *Taenia solium*

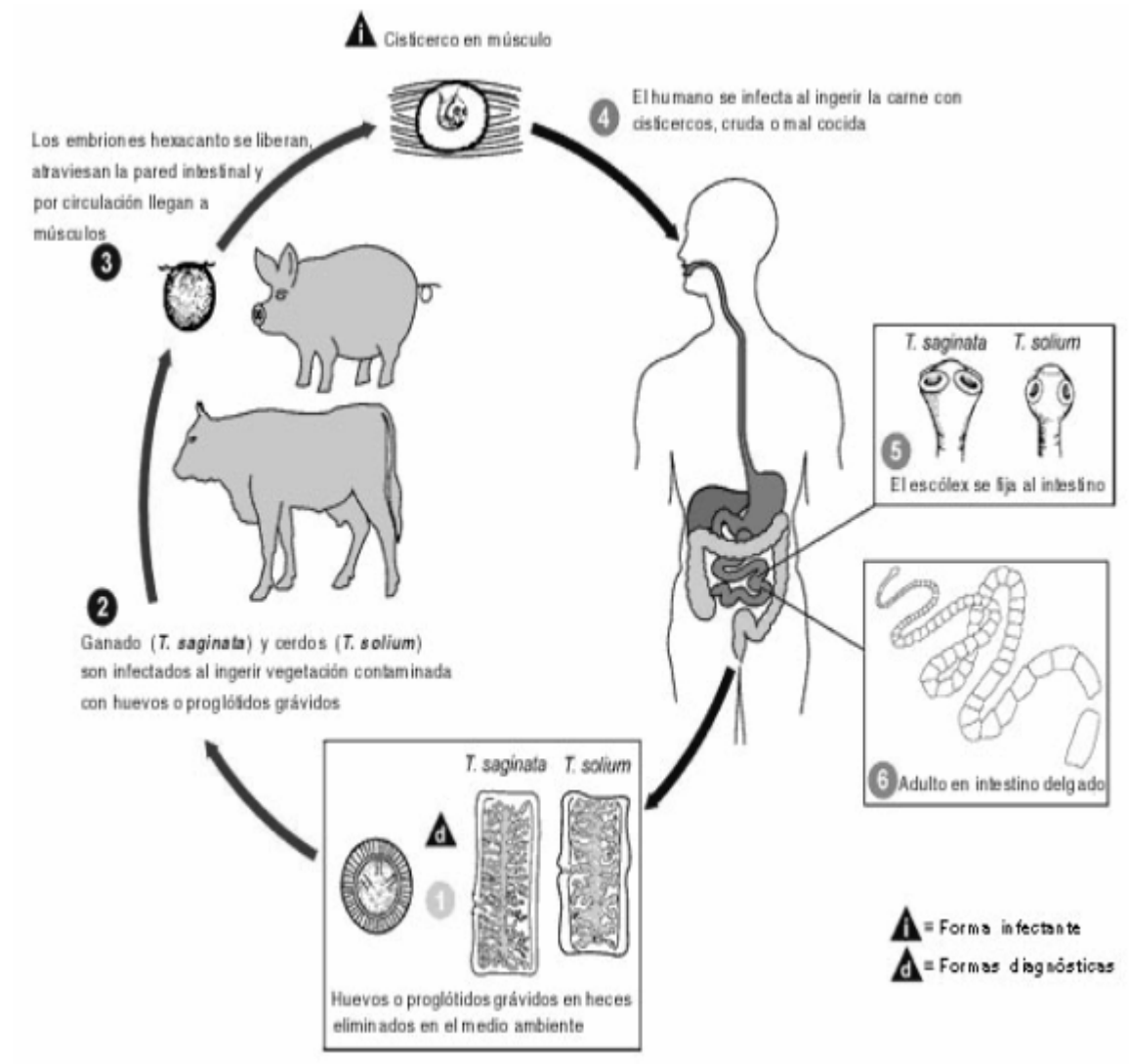


Fig. 5

1.2.3. COMPOSICIÓN Y DEFINICIÓN DE LAS ENZIMAS GST-r Y TPI-r

Las enzimas glutatión S-transferasa (GST) se encuentran en diversos organismos eucariontes y realizan una serie de reacciones esenciales para proteger los constituyentes celulares del ataque de las especies reactivas de oxígeno y las asociadas a radicales libres. Fue identificada en 1961 y es una superfamilia de enzimas multi-funcionales diméricas que conjugan el ion tiolato (azufre de la cisteína del Glutatión reducido, GSH: γ -glutamyl-cisteinil-glicina) a centros electrofílicos de compuestos orgánicos, hidrofóbicos, que pueden ser provistos por un átomo de carbón, nitrógeno o azufre. Dichos conjugados se hacen más solubles, facilitándose su eliminación de las células (Castro, 2005).

Esta reacción es una de las primeras etapas de la vía del ácido mercaptúrico, en la cual los xenobióticos hidrofóbicos (sustancias químicas que no tienen utilidad metabólica y que pueden ser tóxicos) son inactivados y eliminados del organismo (Castro, 2005).

Las GSTs realizan 4 tipos de reacciones catalíticas con sus sustratos:

1) Adiciones reversibles de tipo Michael de cetonas y aldehídos α,β -insaturados. 2) isomerización. 3) Sustitución nucleofílica aromática. 4) Apertura de anillos epóxidos. El 1-cloro-2,4-dinitrobenceno (CDNB) es considerado el sustrato universal de las GSTs; pero liga con alta afinidad a esteroides, bilirrubina, grupo hemo, carcinógenos, dexametasona y numerosos aniones orgánicos.

Existen como proteínas diméricas formando homodímeros o heterodímeros que poseen subunidades con peso aproximado de 25 kDa por cada monómero (Castro, 2005).

La triosa fosfato isomerasa (TPI) es una enzima homodimérica con subunidades polipeptídicas de aproximadamente 27 kDa, las cuales catalizan la interconversión de dihidroxiacetona fosfato y gliceraldehído-3-fosfato y su acción es importante durante la glucólisis, gluconeogénesis, síntesis de ácidos grasos, etc. La estructura de esta enzima es muy conservada evolutivamente, a pesar de tener variaciones considerables en su secuencia de aminoácidos (Jiménez, 2000).

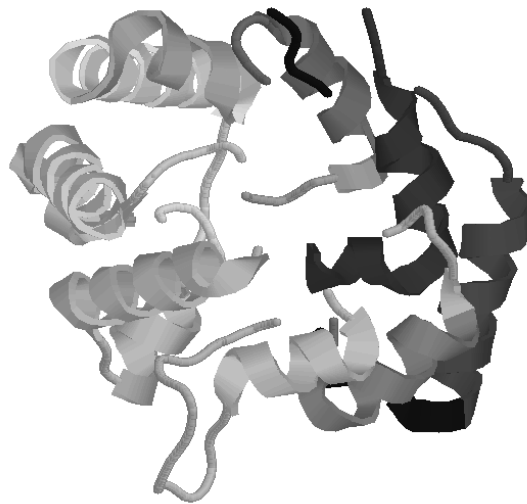


Fig. 6

Estructura tridimensional de la enzima triosa fosfato isomerasa

1.2.4. RESPUESTA INMUNOLÓGICA Y ADYUVANTES

1.2.4.1. Respuesta inmunológica

La respuesta inmune en contra de la cisticercosis se da tanto por la respuesta inmune celular como la humoral, se sabe que hay una participación activa de células T (Th1 y Th2) de acuerdo con el patrón de citocinas que producen. Los individuos con cisticercosis crónica presentan una polarización hacia fenotipo Th2, mientras que los individuos en donde los parásitos son destruidos, o su desarrollo está limitado, la respuesta inmune está polarizada hacia fenotipo Th1.

La fase de activación de los linfocitos T nativos, está dada por el reconocimiento de determinantes antigénicos presentados en el contexto de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad de clase II, expresada en células presentadoras de antígeno profesionales (Células dendríticas, Linfocitos B y Macrófagos). Los linfocitos Th1 secretan interferón gamma ($\text{INF-}\gamma$), IL-2 y factor de necrosis tumoral ($\text{TNF-}\alpha$). Estas citocinas participan en la activación de macrófagos y de la hipersensibilidad retardada. En cambio, los linfocitos Th2 producen IL-4,-5,-10 y -13, cooperando con la respuesta inmune humoral a través de la proliferación de linfocitos B y del cambio de isotipo de los anticuerpos para la producción de inmunoglobulinas IgE e IgG1 (ratón) o IgG4 (humanos), y también promueve la diferenciación de eosinófilos y mastocitos (Castro, 2005).

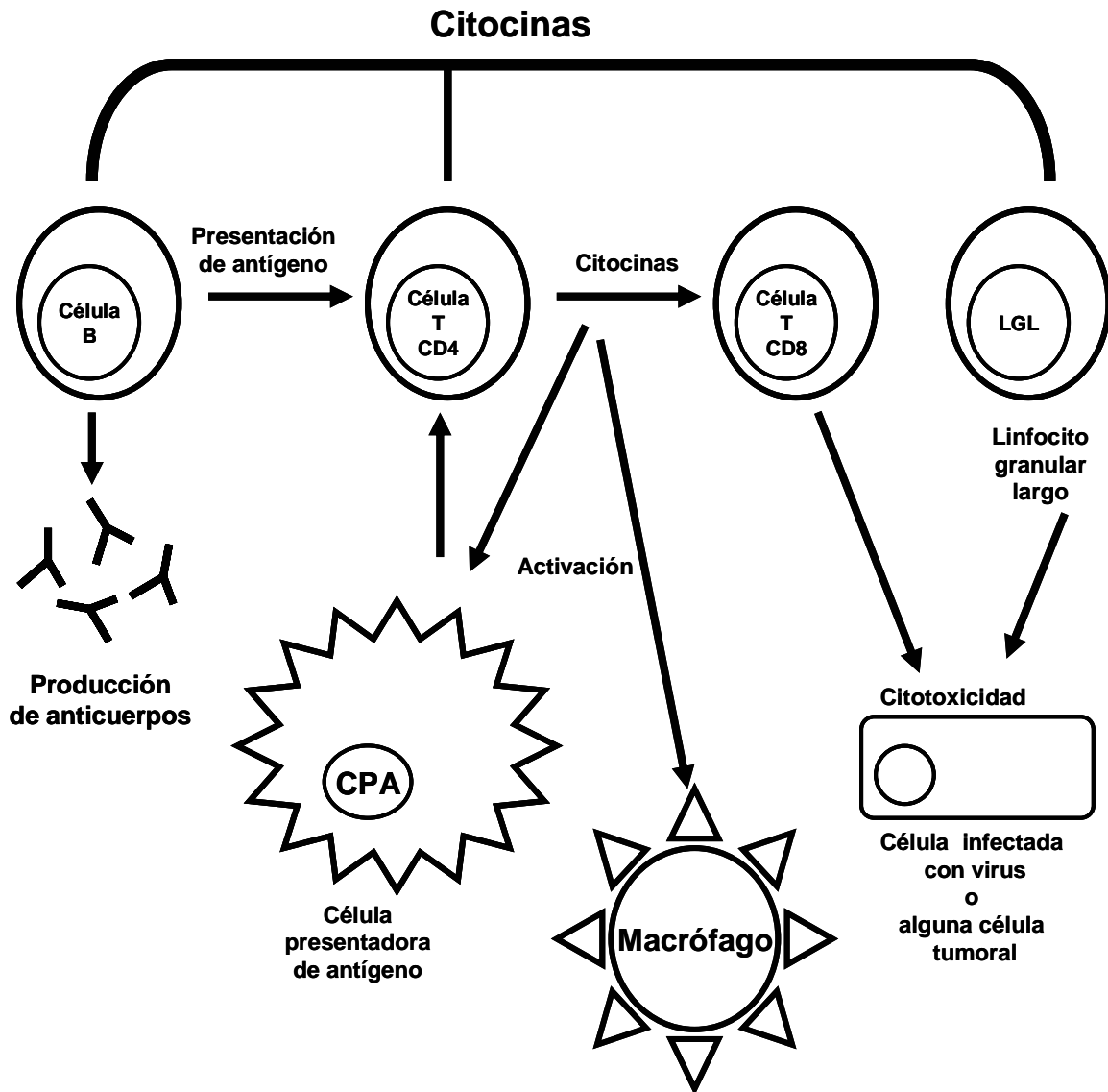


Fig. 7

Interrelación de células y factores solubles del sistema inmune y como responden a los estímulos.

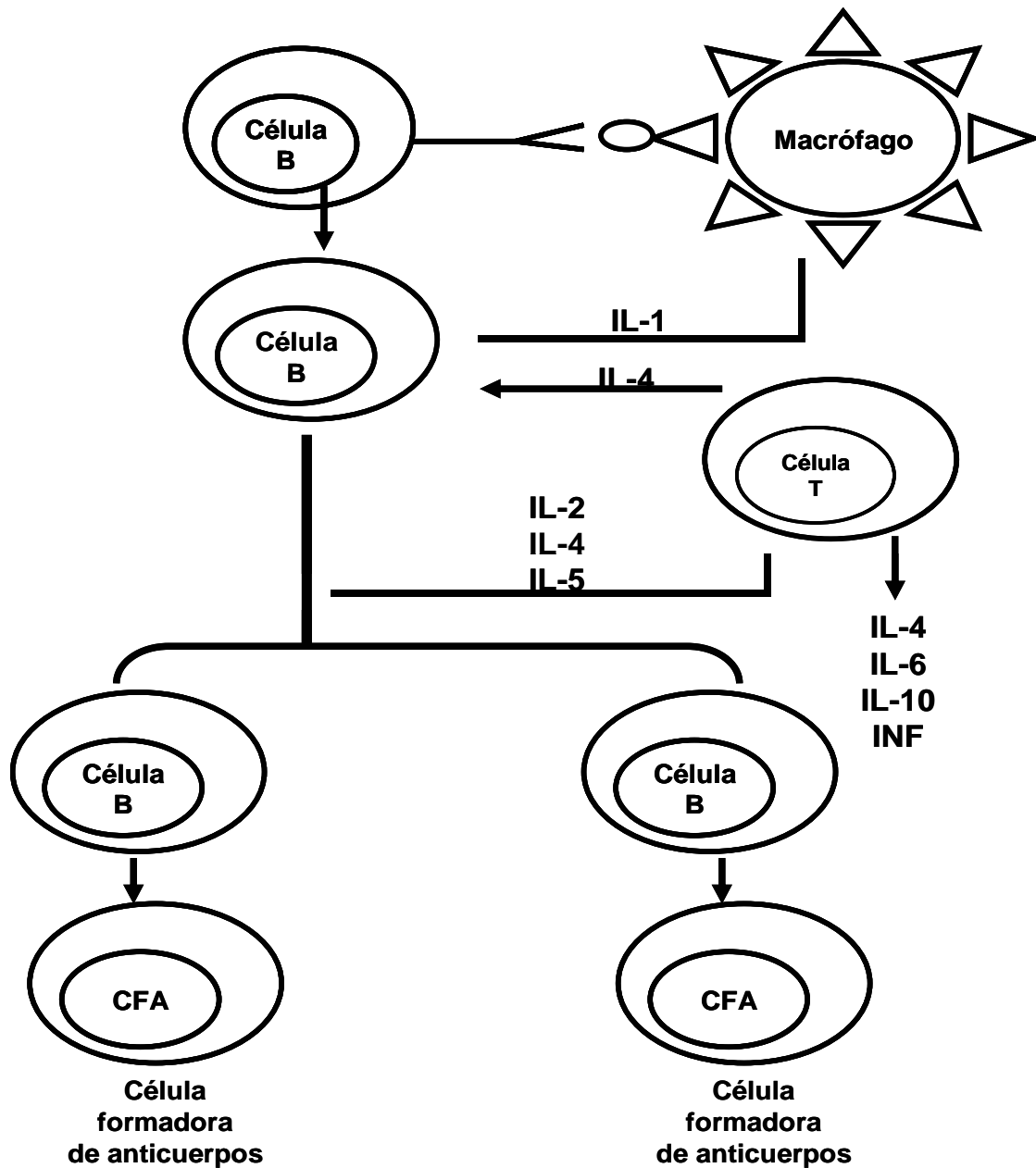


Fig. 8

Las células B son activadas por antígenos no procesados o por células presentadoras de antígeno, tales como los macrófagos en la presencia de IL-1 y 4, esto causa la expresión de receptores para IL-2 y otras citocinas. La IL-2, -4 y -5 promueven la división celular; posteriormente ocurre la fase de diferenciación a células formadoras de anticuerpos.

1.2.4.2. Adyuvantes

Los adyuvantes (del latín adjuvare= ayudar) son sustancias o preparados químicos que incorporados al antígeno o inyectados simultáneamente con él, hacen más efectiva la respuesta inmune. O bien toda sustancia, proceso o combinación de sustancias que aumentan, no específicamente la respuesta específica a un inmunógeno cuando son administrados conjuntamente. Este incremento en la inmunogenicidad puede consistir en: a) una mayor producción de anticuerpos específicos frente al Antígeno (Ag). b) Un incremento de la afinidad y poder neutralizante de los mismos. c) La generación de memoria inmunológica frente al Ag en cuestión. d) La formación de una respuesta celular específica de Ag. Los adyuvantes constituyen una familia heterogénea de sustancias debido a su origen, naturaleza química y actividad biológica específica. Además su uso tiene como ventajas: 1) Economía de antígeno y tiempo. 2) Aumento en niveles de anticuerpos específicos, etc.

El antígeno normalmente difunde con mucha rapidez desde tejidos locales que rodean el sitio de inoculación, una función importante es crear un reservorio o depósito de antígeno de larga vida. Casi todos los adyuvantes activan o estimulan a macrófagos y al activar a dichas células, se estimula la respuesta inmune por incremento en la cantidad de Ag expresado en membrana celular y la eficiencia de su presentación a linfocitos.

Ejemplos de adyuvantes más comunes: Adyuvante completo de Freund (FCA), adyuvante incompleto de Freund (FIA), aunque son los más eficaces, presentan alta toxicidad o una menor bioseguridad. El FCA es utilizado con mucha frecuencia, pero debido a la alta toxicidad que presenta, su uso es cada vez más restringido. También están los materiales inertes, compuestos de aluminio, liposomas, saponinas, DDA (Bromuro de dimetil dioctadecil amonio), Formulación Syntex-1 (SAF-1, contiene treonil análogo del dipéptido murámico). Así como las emulsiones aceite/agua o agua/aceite, polímeros no iónicos (NBP) y Lipopéptidos. La elección de adyuvantes con fines de investigación, requiere cubrir ciertas

necesidades como: Alta eficacia, amplio espectro de aplicación, fácil manipulación y disponibilidad comercial (Villarubia, 1996).

Los adyuvantes más utilizados en el campo veterinario, son las emulsiones de aceite mineral o los adsorbentes (incluyen hidróxidos y fosfatos de aluminio), y con menor frecuencia se usan los liposomas e ISCOM (Complejos inmuno estimulantes).

Las emulsiones agua en aceite producen una fuerte respuesta pero a veces provocan riesgos y efectos no deseados por la limitada biodegradabilidad.

En el caso de los humanos, lo más importante para el uso de adyuvantes, es la bioseguridad. Los compuestos de aluminio son los únicos adyuvantes con licencia para su uso en humanos. El hidróxido de aluminio tiene un punto isoeléctrico de 11.1, por lo que en condiciones biológicas está cargado positivamente y puede adsorber proteínas cargadas negativamente. El grado de adsorción depende de la naturaleza y concentración del antígeno, sales y pH de la mezcla. Las fuerzas de adsorción del antígeno al hidróxido de aluminio, son electrostáticas e interacciones hidrofóbicas.

Los polisacáridos naturales presentan también una actividad estimulante de hematopoyesis, respuesta inmune humoral y celular, principalmente los glucanos aislados de la pared celular de levaduras (Villarubia, 1996).

La saponina (adyuvante), son moléculas triterpenoides (Lípidos complejos), que se obtienen de un extracto del árbol Quillay (Quillaza saponaria Molina) a través de una extracción acuosa de la madera, este árbol es nativo de Chile.

Entre sus principales funciones está: reducir la tensión superficial, formación de espumas, permeabilizar las membranas celulares, etc. Este adyuvante es resistente al calor, a bajas condiciones de acidez, al etanol y es compatible con otros emulsificantes. Su aplicación en la industria es muy amplia, desde alimentos, minería, agricultura, adyuvantes, etc.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Equipos y reactivos

2.1.1. EQUIPOS

- Espectrofotómetro Amersham Biosciences
- Cámara para electroforesis Hoefer MiniVE
- Fuente de poder: EPS 100, Amersham pharmacia biotech
- Campana de flujo laminar clase II A/AB3, Nuair Biological Safety Cabinets UN-426-300 Serie 24
- Capilares Art. No. 34,500 (1.5-1.8 X 100 mm) KIMAX-51
- Biofuga Heraeus Sorvall
- Balanza analítica Adventure Ohaus 1899012
- Filtros para esterilización 0.2 μm
- Microplacas NUNC de 96 pozos, maxisorp certificadas 439454
- Lector de microplacas Biotek ELX 800 (filtro 405 nm).

2.1.2. REACTIVOS

- PBS IX pH 7.4, 10 mM
- Amortiguador de Trietanolamina 100 mM, pH 8 (TEA)
- Gel de poliacrilamida: Acrilamida 30% y Bisacrilamida 0.8 %, Tris 1.5 M pH 8.8, SDS 10%, Persulfato de amonio, Temed, Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8 y agua destilada; Amortiguador de carga 5X, mercaptoetanol, Azul de Coomassie al 0.1% (Coomassie brillant Blue R-250) No. 1610400
- GST-r en PBS IX y TPI-r en TEA
- Saponina (Quillaza Bark, SIGMA No. 5-7900)
- Carboximetilcelulosa al 0.2 % (CMC 0.2 %)
- INMUNOL (Glicofosfopeptical), Laboratorio Andrómaco. Cápsulas con 500 mg.
- Amortiguador de Carbonatos pH 9.5
- Svelty al 0.1 % en PBS IX pH 7.4-Tween 20 (al 0.05%) (SIGMA P-2287)
- Anti-IgG de ratón (producido en cabra) –conjugado a fosfatasa alcalina, SIGMA No. A1418
- Tris-HCl pH 7.4 (10 mM Tris-HCl)
- Tris-HCl pH 9.5 (Sustrato de fosfatasa alcalina) : 10 mM de Tris-HCl, 1 M dietanolamina, 10 mM p-nitrofenilfosfato, 0.25 mM MgCl₂.
- p-nitrofenilfosfato, SIGMA No. N-3254, Lote: 44H5032
- Amortiguador de Glicina 1X

2.2. Metodología

2.2.1. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

Las proteínas proporcionadas por el Dr. A. Landa del departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina, fueron cuantificadas espectrofotométricamente, se midió la absorbancia a 280 nm. Para la GST-r, se usó como blanco de calibración el amortiguador en que estaba disuelta PBS 1X y para TPI-r se utilizó TAE (Amortiguador de Trietanolamina).

2.2.2. ELECTROFORESIS: PUREZA DE PROTEÍNAS

Se realizó electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE). El gel se preparó al 10 %, una vez gelificada la poliacrilamida y con los pozos ya formados, se prepararon las muestras: Se tomaron 5 µg de cada una de las muestras, se les adicionó la cantidad proporcional del amortiguador de carga (5X), posteriormente se llevaron a 100 °C por un minuto. Posterior a esto se cargaron las muestras en los pozos y su orden en el gel fue el siguiente:

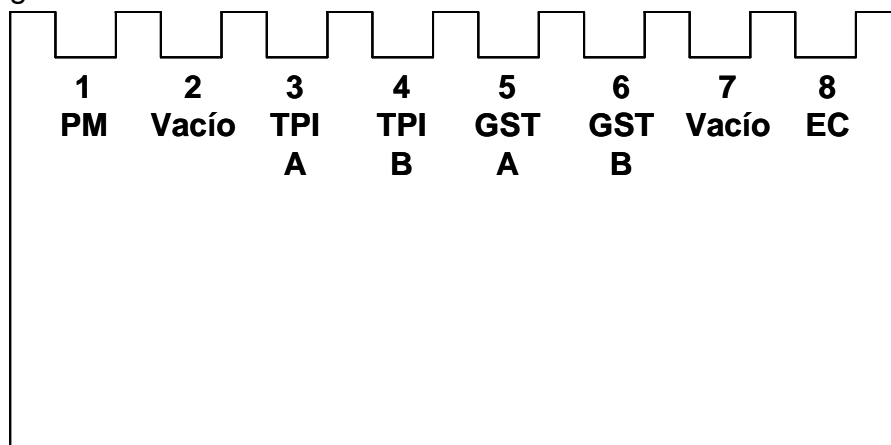


Fig. 9
Esquema donde se observa la ubicación de las muestras en el gel (SDS-PAGE)

Después se introdujo el dispositivo de electroforesis a la cámara y se llenaron los carriles con amortiguador de glicina 1X, posteriormente se saturó la cámara con el mismo amortiguador. Se continuó con la conexión de la cámara a una fuente de poder y se corrió la electroforesis a 100 V y 25 mA. Finalmente el gel se tiñó en una solución con azul de Coomassie al 0.1 % y luego fue desteñido con una solución de ácido acético al 10 %, en agitación a temperatura ambiente hasta que las bandas de proteínas fueron observadas (tras varios cambios de ácido acético).

2.2.3. ESQUEMA DE INMUNIZACIÓN, TRATAMIENTO CON GLICOFOSFOPEPTICAL Y OBTENCIÓN DE MUESTRAS

Se utilizaron ratones machos, Balb/C de 12 semanas de edad (20-30 g peso). Se pesaron, marcaron (figura 10) y formaron grupos mediante estratos balanceados de peso (n= 7 ratones por grupo).

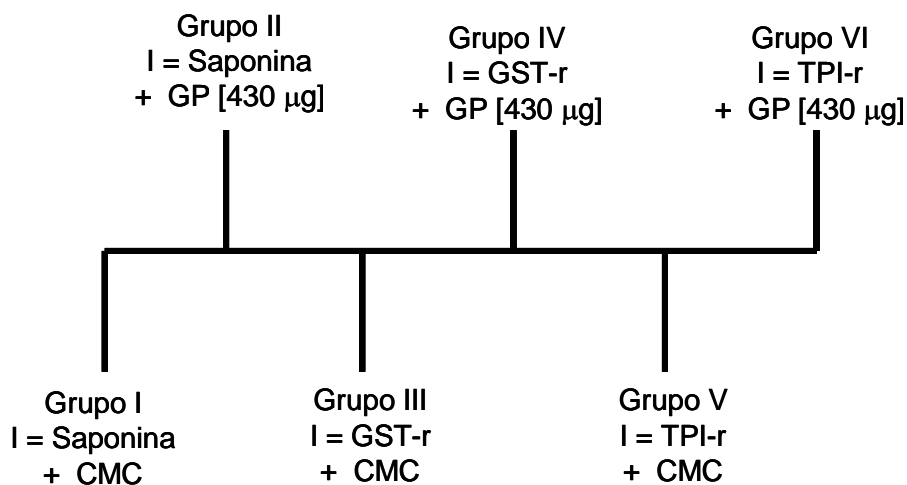


Fig.11

Esquema de la formación de grupos.

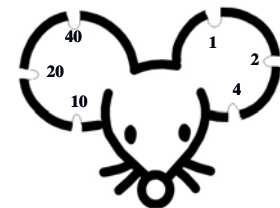


Fig. 10

I = Inmunización, CMC = Carboximetilcelulosa 0.2 % (Vehículo, vía oral),
Gp = Glicofosfopeptical [430 µg].

Se inmunizaron a los ratones de acuerdo al siguiente esquema:

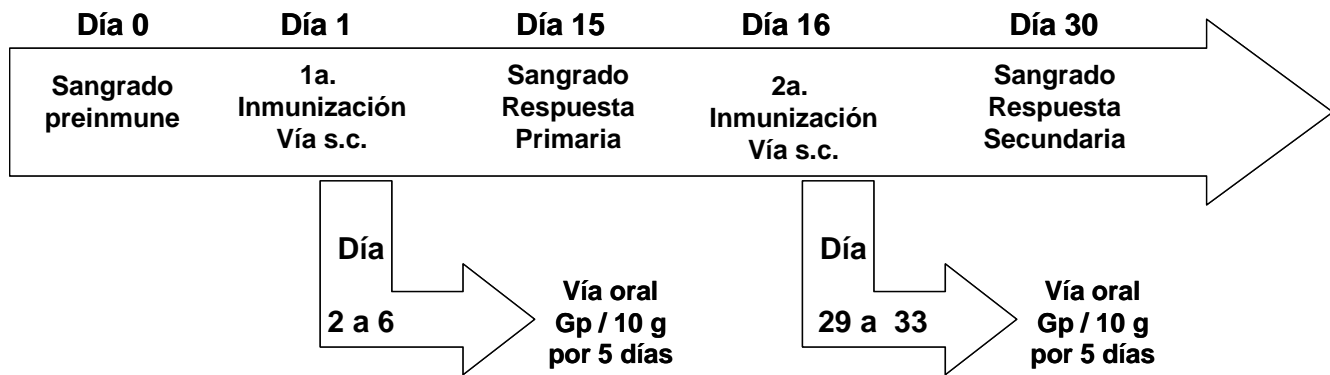


Fig. 12

Las inmunizaciones se hicieron vía subcutánea con 10 μ g de Proteína (GST-r, TPI-r) y 1 μ g de saponina en PBS (volumen final: 200 μ L) por cada ratón. Esto para los grupos III, IV, V y VI.

Al grupo I se administró vía subcutánea, con 1 μ g de saponina /ratón en PBS (volumen final: 200 μ L), al II = con 1 μ g de saponina /ratón PBS (volumen final: 200 μ L) y en el caso de la administración vía oral del Gp, el grupo II, IV y VI recibieron la dosis equivalente a la usada en humanos (430 μ g de Gp por cada 10 g de peso del ratón, por 5 días consecutivos y posteriores a cada una de las inmunizaciones). En cambio los grupos I, III y V, sólo recibieron CMC 0.2 % (100 μ L/10 g peso) que es el vehículo en que se resuspende el Gp, ya que presentó mayor solubilidad que en agua.

Las muestras de sangre se obtuvieron a partir del plexo venoso del ratón, aproximadamente de 80 a 100 μ L de sangre periférica, la cual se centrifugó a 2,375 Xg y se obtuvieron los sueros, que fueron conservados a 4 °C para su posterior análisis.

2.2.4. DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS SÉRICOS ANTI-GST-r Y ANTI-TPI-r MEDIANTE ELISA INDIRECTO.

La determinación de los anticuerpos específicos séricos se realizó mediante ensayos inmunoenzimáticos en fase sólida del tipo indirecto (ELISA indirecto). La técnica se muestra en la figura siguiente:

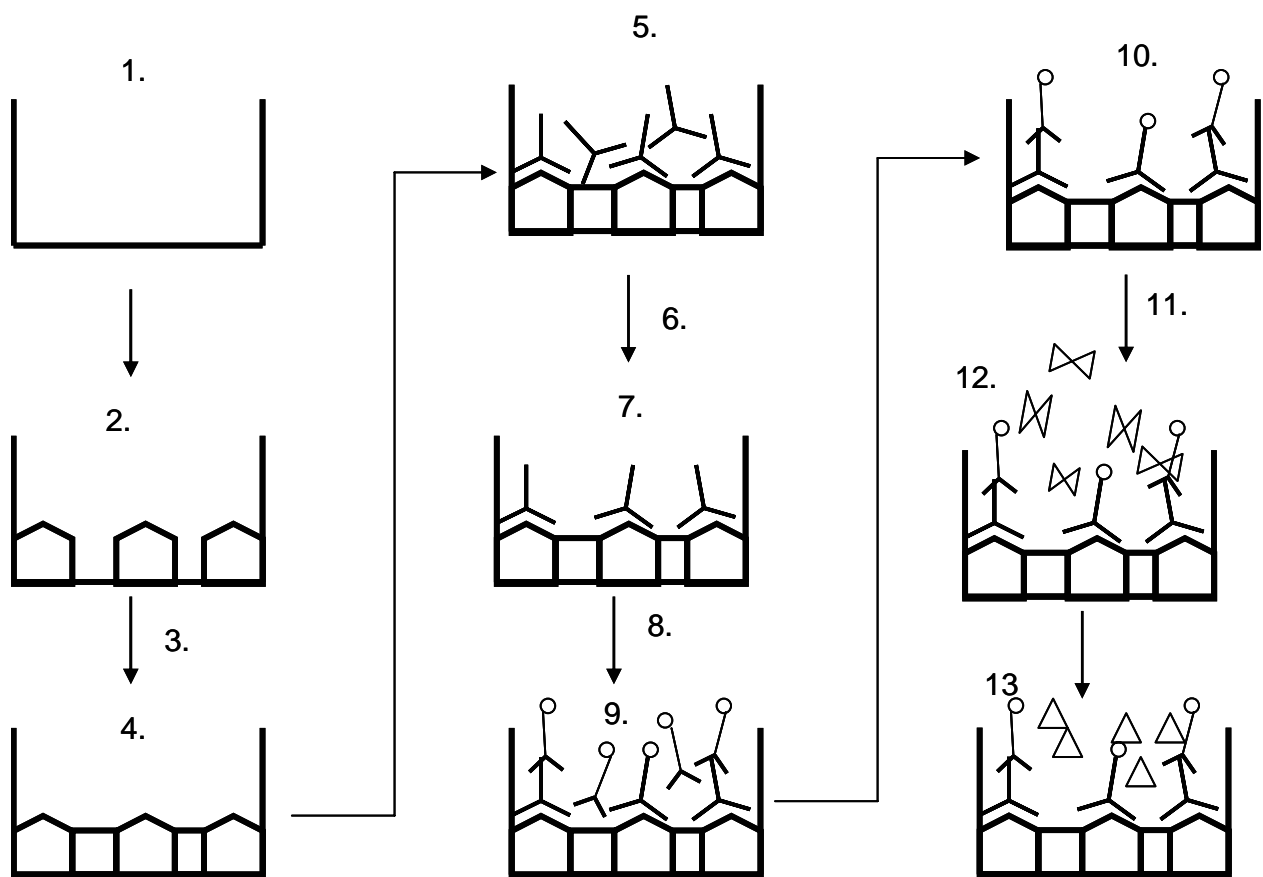


Fig. 13

Esquema del ELISA indirecto.

Para la realización del ensayo, 1) Se utilizaron placas de 96 pozos NUNC. 2) se cubrió la placa con 1 μg de proteína por pozo en 100 μL de amortiguador de carbonatos pH 9.4 y se incubó a 4 °C por 24 horas. 3) Se hicieron 4 lavados con PBS IX -Tween 20 (0.1%) pH 7.4 y se enjuagó 3 veces con PBS IX pH 7.4. 4) La placa fue bloqueada con Svelty 0.1 % y se adicionaron 150 μL /pozo, para luego incubarse a 4°C por 24 horas y después realizar el procedimiento de lavado del paso 3. 5) Se adicionaron los sueros (100 μL /pozo), los cuales fueron diluidos 1:500 en PBS IX pH 7.4 y se incubaron a temperatura ambiente por 2 horas. 6) Se realizó el mismo procedimiento que en el paso 3. 7) Se retiró el exceso de muestra. 8) Se adicionó el anticuerpo de detección, anticuerpo conjugado o secundario, anti-IgG-FA (anti-IgG-acoplado a fosfatasa alcalina) en una dilución 1:20 000. 9) Se incubó a temperatura ambiente por 1 hora y en oscuridad. 10) El paso 3 se repitió nuevamente pero los lavados se realizaron con Tris-HCl pH 7.4. 11) Se retiró el exceso de conjugado. 12) Se agregó el sustrato de la fosfatasa alcalina, el p-nitrofenilfosfato en Tris-HCl pH 9.5, trietanolamina y MgCl_2 . 13) Finalmente, ocurrió la reacción entre la enzima y sus sustrato. La última incubación es por 1:30 horas a temperatura ambiente y en oscuridad.

La actividad de la fosfatasa alcalina puede ser medida por un método colorimétrico pues el producto, el p-nitrofenol, en solución tiene color y absorbe a 405 nm.

En la figura 13 se muestran los controles utilizados para cada componente:

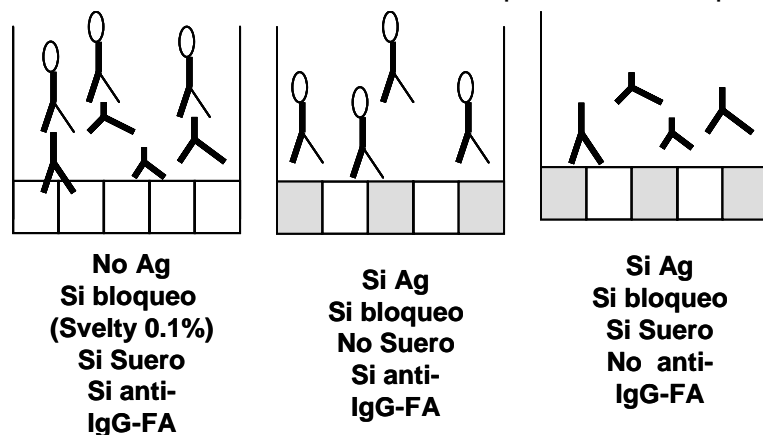


Fig. 14

Esquema de los controles utilizados en el ensayo.

Las lecturas se realizaron en el espectrofotómetro Biotek ELX800 y para el análisis estadístico de los datos se utilizó el programa Sigma Stat V.3.1. Para las pruebas estadísticas se estableció un α de $p < 0.05$ y un poder de 0.08 . Para las gráficas se utilizó el programa Sigma Plot V.9.0.,

3. RESULTADOS

3.1. Cuantificación de proteínas

Proteína	Absorbancia a 280 nm
GST-r	1.516
TPI-r	0.271
EC	2.47

Mediante la ley de Lambert y Beer; $A = \varepsilon l [\text{Concentración}]$, de donde:

$$[\text{Concentración}] = A / \varepsilon l$$

Donde A es absorbancia

ε es el coeficiente de extinción molar

l es la longitud de la celda

[Concentración] es la concentración de la muestra

Lecturas espectrofotométricas a 280 nm.

Proteína	[Concentración] $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
GST-r	0.78
TPI-r	0.202
EC	1.05

3.2 Electroforesis

En la figura 15 se muestra un gel SDS-PAGE al 10 %, donde se ve que las proteínas utilizadas tanto para la inmunización como para la determinación de anticuerpos, están puras pues se aprecia una sola banda para cada uno de ellas. En el último carril de la derecha se encuentra una muestra de extracto crudo (EC) preparado a partir de cisticercos. Éste contiene proteínas con tamaños moleculares en el intervalo de 8 – 200 kDa y en el gel se observa un barrido. En cambio en el caso de la GST y TPI se puede apreciar la diferencia entre una muestra pura y el barrido concerniente al cúmulo de proteínas.

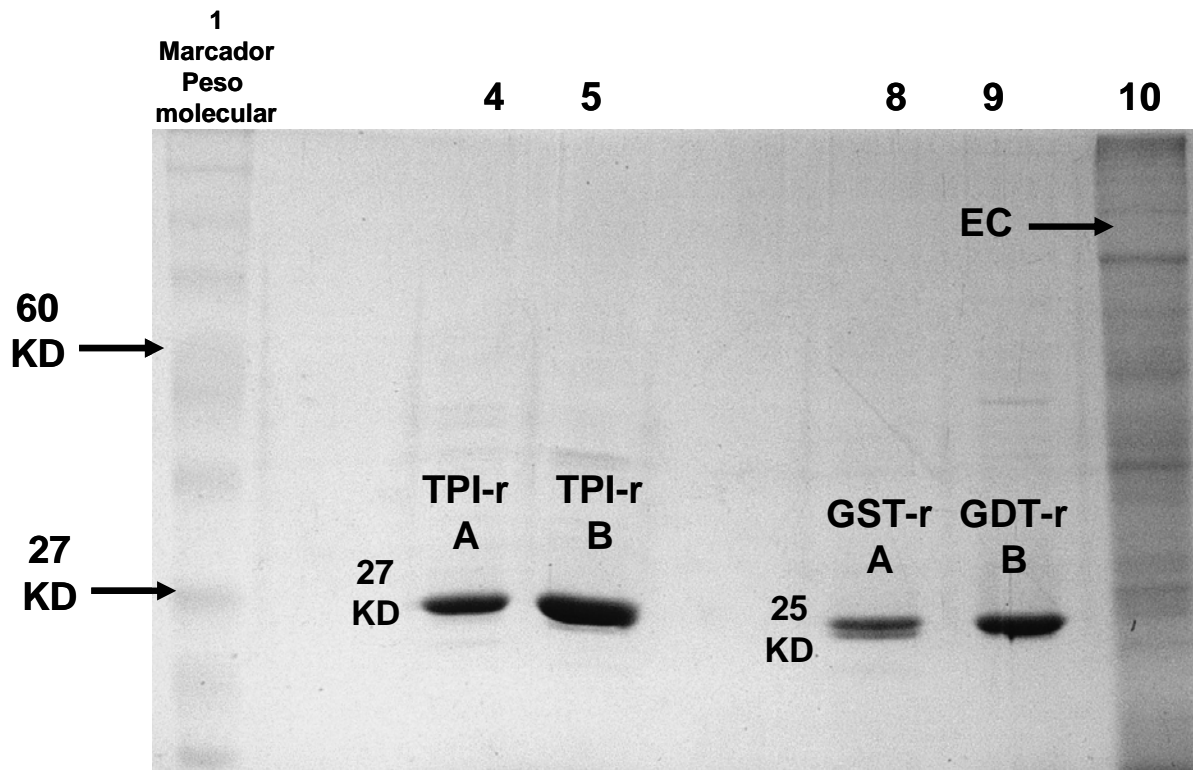


Fig. 15
Gel (SDS-PAGE), se observa la pureza de las proteínas
GST-r y TPI-r.

Para poder determinar la producción de anticuerpos específicos en el ensayo inmunoenzimático es preciso contar con proteínas puras, lo que se determinó mediante criterio electroforético.

Como se puede observar, se encontró la TPI de 27 kDa en el corrimiento electroforético previsto. Según el marcador de pesos moleculares se encontraría dos bandas debajo de la 60 kDa y así ocurrió. En el caso de la GST que cuenta con 25 kDa se aprecia ligeramente debajo de las bandas de 27 kDa de TPI, por lo que también corresponde a lo reportado en la literatura.

3.3 Determinación de anticuerpos séricos anti-GST-r y anti-TPI-r de *Taenia solium*.

En nuestros estudios previos, encontramos que la administración de GP por vía oral durante los cinco días siguientes a la inmunización primaria y secundaria, incrementaron la producción de anticuerpos antígeno específicos en un 14% (anti-ovoalbúmina), en los animales tratados con la dosis de 430 $\mu\text{g}/\text{día}$ de Glicofosfopeptical.

En el presente trabajo encontramos los resultados siguientes:

1.-Estandarizamos el ensayo ELISA indirecto para cuantificar la producción de anticuerpos antígeno específicos empleando como inmunógenos dos proteínas recombinantes; GST-r y TPI-r.

Empleamos como controles de cada ensayo, pozos sin antígeno, bloqueados con svelty, pozos con antígeno y bloqueados también con svelty, a los que no se les adicionó suero de animales en experimentación (sin el primer anticuerpo) y pozos a los que no se les adicionó el anticuerpo de detección marcado con fosfatasa alcalina (sin segundo anticuerpo).

En la figura 16 observamos las absorbancias obtenidas con cada control para los pozos cubiertos con GST-r y en la figura 17 observamos las absorbancias obtenidas con los pozos cubiertos con TPI-r.

**CONTROLES DEL ENSAYO ELISA INDIRECTO
ESTIMACIÓN DE ANTICUERPOS SÉRICOS ANTI-GST-r**

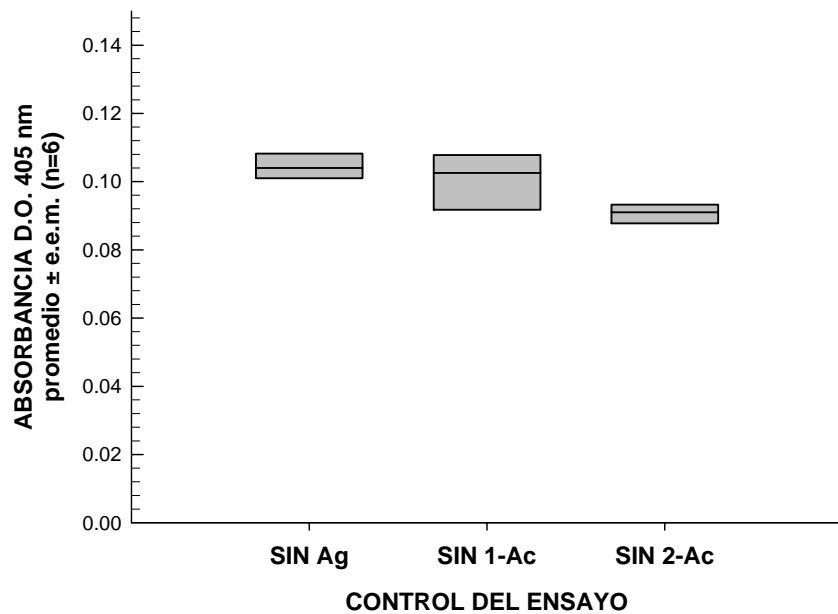


Fig. 16

**CONTROLES DEL ENSAYO ELISA INDIRECTO
ESTIMACIÓN DE ANTICUERPOS SÉRICOS ANTI-TPI-r**

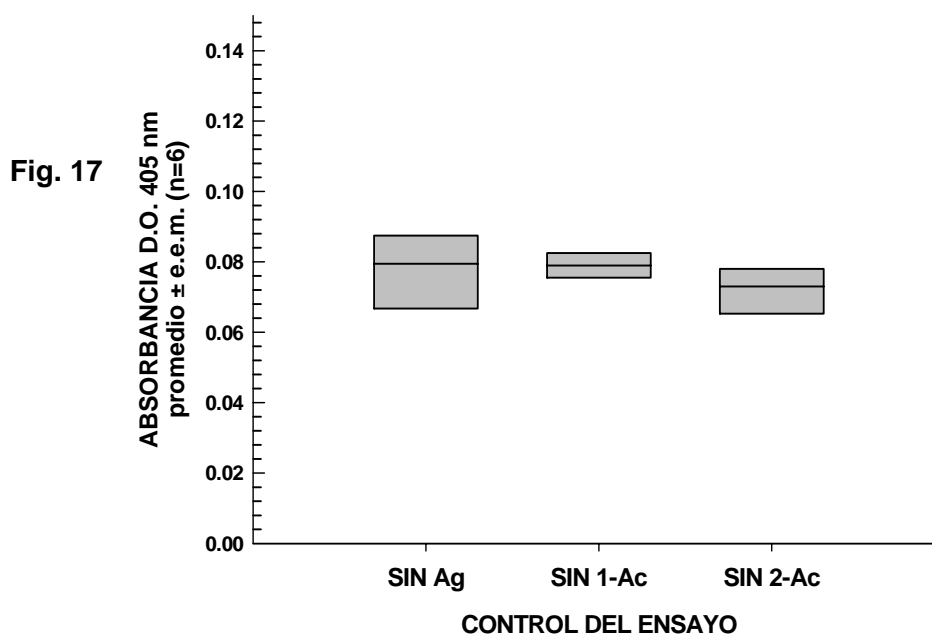


Fig. 17

2.-Estudiamos la respuesta inmune humoral en los diferentes grupos (Inter-grupo)

a) GST-r

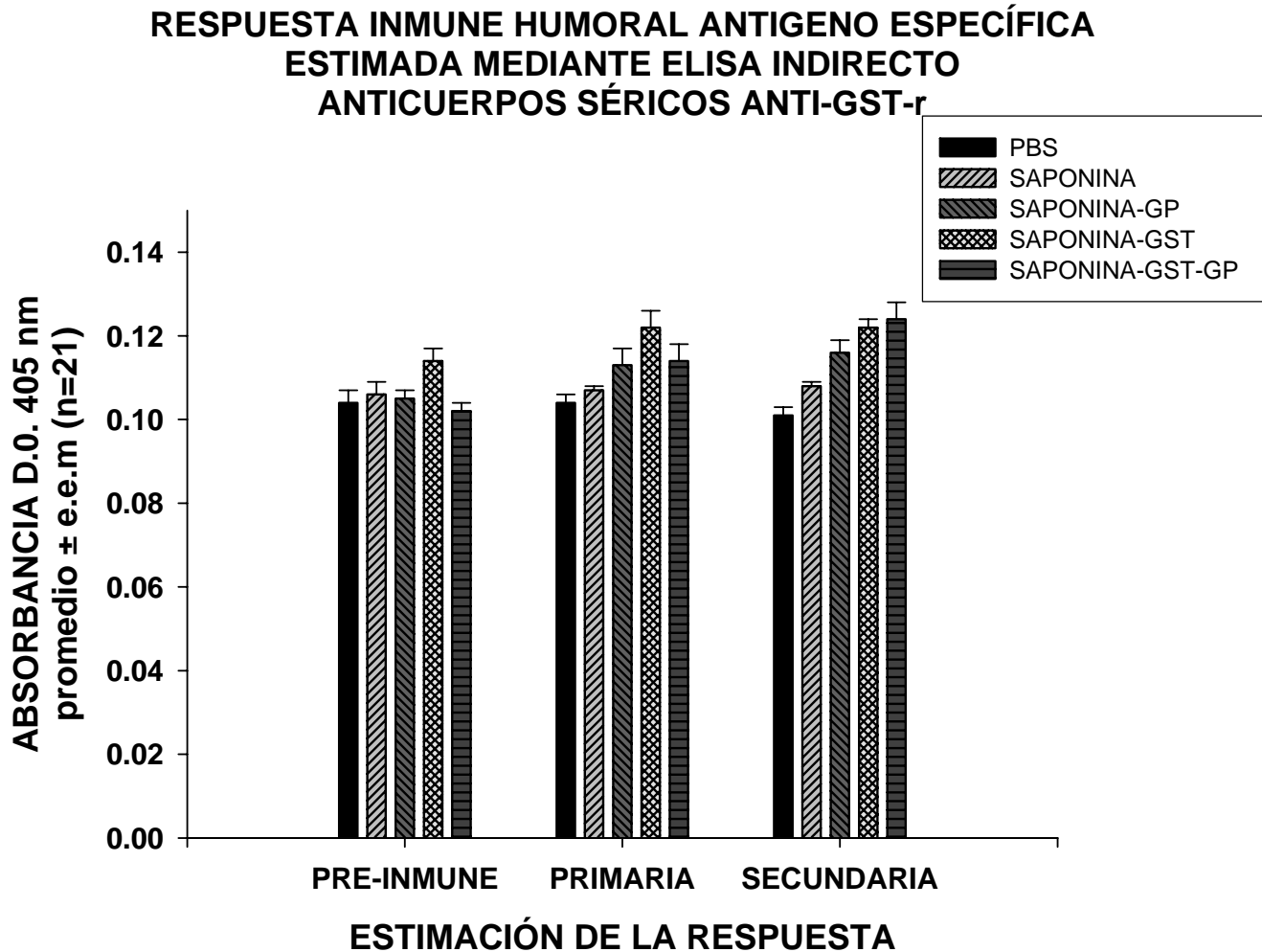


Fig. 18

En la figura 18 observamos que los sueros preinmunes de los grupos I (PBS), II (SAPONINA), III (SAPONINA-GP), IV (SAPONINA-GST), V (SAPONINA-GST-GP) mostraron una diferencia estadísticamente significativa ($p=0.039$, mediante ANOVA de rangos, prueba de Kruskal-Wallis). Esta diferencia se dio entre el grupo IV y el V, los niveles de anticuerpos séricos de este último con respecto al IV fueron menores ($p<0.05$, prueba de Tukey).

En los sueros de los animales donde estudiamos la respuesta primaria con este antígeno, encontramos una diferencia estadísticamente significativa (p=0.049, mediante ANOVA de rangos, prueba de Kruskal-Wallis), solamente entre el grupo IV y el I, ya que observamos una disminución de 16% de este último (IV) con respecto al grupo I (p<0.05, prueba de Tukey).

En cuanto a la respuesta secundaria, encontramos una diferencia estadísticamente significativa (p<0.001, mediante ANOVA de rangos, prueba de Kruskal-Wallis). Esta diferencia se dio entre los grupos IV y el V, con el grupo II, ya que observamos incrementos de 13% y de 18% respectivamente con el grupo II (p<0.05, prueba de Tukey).

b) Cuando analizamos la producción de anticuerpos antígeno específicos para GST-r, por cada grupo, comparando los niveles séricos de anticuerpos preinmune, con los de la respuesta primaria y secundaria, encontramos que en los grupos II, III, IV no hubo diferencias estadísticamente significativas (mediante ANOVA de rangos, prueba de Kruskal-Wallis). En el grupo V si encontramos diferencias estadísticamente significativas (p=0.002, mediante ANOVA de rangos, prueba de Kruskal-Wallis). Se observó un incremento de 17.5% en la respuesta primaria con respecto a los niveles de anticuerpos séricos preinmunes del mismo grupo V, esta diferencia adicionalmente incrementó un 14% entre la respuesta secundaria y la primaria, lo que mostró un incremento total del 31.5% de la respuesta secundaria con respecto a el suero preinmune (p<0.05 prueba de Tukey).

3.-Cuando estudiamos la respuesta inmune humoral en los diferentes grupos (Inter-grupo).

a) TPI-r

RESPUESTA INMUNE HUMORAL ANTÍGENO ESPECÍFICA ESTIMADA MEDIANTE ELISA INDIRECTO ANTICUERPOS SÉRICOS ANTI-TPI-r

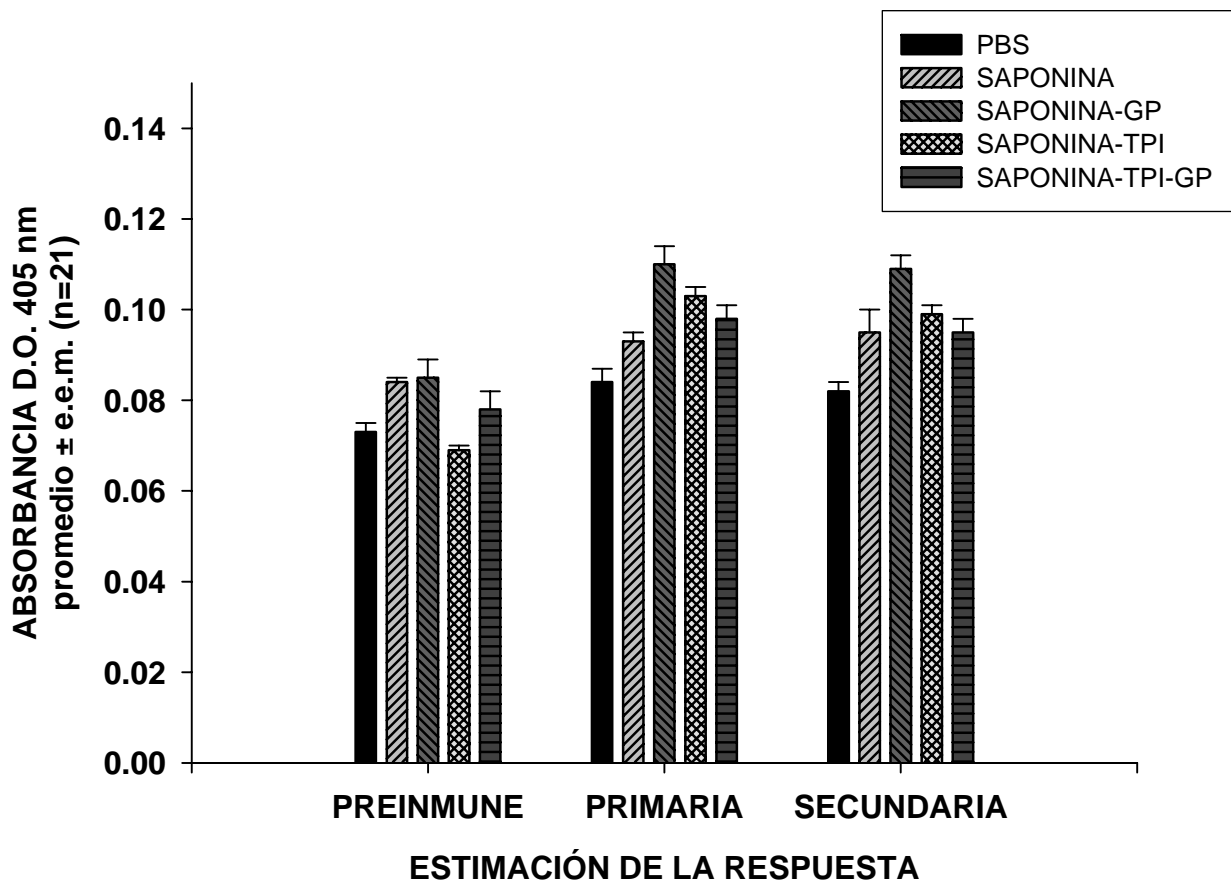


Fig. 19

En la figura 19 observamos que los sueros preinmunes de los grupos I (PBS), II (SAPONINA), III (SAPONINA-GP), VI (SAPONINA-TPI), VII (SAPONINA-TPI-GP) mostraron una diferencia estadísticamente significativa ($p=0.001$, mediante ANOVA de rangos, prueba

de Kruskal-Wallis). Esta diferencia se observó entre el grupo II y el grupo III con el VI, al disminuir respectivamente 22% y 23% en relación al grupo VI ($p < 0.05$, prueba de Tukey).

En los sueros de los animales donde estudiamos la respuesta primaria con este antígeno, encontramos una diferencia estadísticamente significativa significativa ($p = 0.001$, mediante ANOVA de rangos, prueba de Kruskal-Wallis), se observó un incremento de 18% solamente entre el grupo II y el III ($p < 0.05$, prueba de Holm-Sidak).

En los sueros de los animales donde estudiamos la respuesta secundaria, encontramos una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.001$, mediante ANOVA de rangos, prueba de Kruskal-Wallis). Esta diferencia se repitió entre los grupos II y III, observamos un incremento de 24% ($p < 0.05$, prueba de Tukey).

b) Cuando analizamos la producción de anticuerpos antígeno específicos para TPI-r, en los grupos II, III, VI y VII, comparando los niveles séricos de anticuerpos en los sueros preinmunes, con los de la respuesta primaria y secundaria, encontramos que, en el grupo II no hubo diferencias estadísticamente significativas (mediante ANOVA de rangos, prueba de Kruskal-Wallis). En el grupo III se observaron diferencias estadísticamente significativas entre la respuesta primaria y los niveles preinmunes (incremento del 26%), así como de la respuesta secundaria con respecto al preinmune ($p < 0.05$, prueba de Tukey). En el grupo VI se observó un incremento del 50 % de los niveles séricos de anticuerpos específicos con respecto a los preinmunes ($p < 0.05$, prueba de Tukey). En el grupo VII de igual manera se observó un incremento del 21 % con respecto a los niveles de los sueros preinmunes ($p < 0.05$ prueba de Tukey).

4. Discusión y conclusiones

El glicofosfopeptical ha mostrado estimular a las unidades formadoras de colonias de granulocitos macrófagos (CFU-GM), así como las unidades formadoras de colonias de bazo (CFU-S). El sobrenadante de estas células tratadas con el GP, tiene actividad inductora de la actividad estimulante de de las colonias de granulocitos macrófagos. Northern blot de células de médula ósea, tratadas *in vivo* con GP mostraron un incremento significativo de la expresión del RNAm de la IL-1 α , del factor estimulante de las colonias de granulocitos macrófagos (GM-CSF), del factor estimulante de macrófagos (M-CSF) y del factor estimulante de granulocitos (G-CSF) (Güenechea, 1995).

Majano (2004) reportó la inhibición de la replicación viral (hepatitis B) a través de la estimulación de células mononucleares de sangre periférica, por el GP, al parecer debido a la producción de interferón- γ por éstas células (Majano, 2004).

Es sabido que los linfocitos B, cuando son activados se convierten en células productoras de anticuerpos. Estos linfocitos pueden procesar los antígenos directamente o bien les pueden ser presentados por las células presentadoras de antígeno o por los macrófagos.

Los antecedentes de estimulación por el Gp de las estirpes celulares mencionadas, nos hicieron proponer la hipótesis de que existía la posibilidad de una estimulación indirecta de los linfocitos B, para producir anticuerpos específicos, por lo que este trabajo intenta probar esa hipótesis.

En estudios previos encontramos que la combinación de un antígeno exógeno (ovoalbúmina) con el glicofosfopeptical produjo esta respuesta esperada. En este trabajo se investigó si otros antígenos (en este caso recombinantes), descritos como “protectores” en ensayos de protección (disminución del número de cisticercos), producirán una mejor respuesta

al provenir de parásitos como la *Taenia solium* a diferencia de otro antígeno que no tenía origen parasitario (ovoalbúmina).

De nuestros resultados presentados en el apartado correspondiente, podríamos sugerir que la combinación de uno de ellos (la GST-r) con el glicofosfopeptical administrado por vía oral, logró el mismo efecto descrito que con la ovoalbúmina (aumentar los niveles de anticuerpos séricos). Aunque este efecto sinergista del glicofosfopeptical no es muy relevante (solamente incrementaron en 31.5%).

Inicialmente se observó que en los niveles séricos de anticuerpos “específicos” (sueros pre-inmunes), había diferencia solamente con uno de los grupos (saponina-GST-r), con respecto a los demás grupos. Esta diferencia se mantuvo en la respuesta primaria, pero no se mantuvo en la respuesta secundaria. Los incrementos de anticuerpos específicos se observaron con más claridad en el grupo de **saponina-GST-r-GP**, ya que en la respuesta secundaria estos niveles se incrementaron en relación a la respuesta primaria y esta incrementó en relación a los niveles séricos pre-inmunes (total 31.5%), a diferencia del grupo saponina-GST-r sin GP en la que solo incrementó 16% de los niveles pre-inmunes a la respuesta primaria y no volvió a aumentar en la respuesta secundaria. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando una alfa de $p < 0.05$ y un poder de 0.08.

En el caso del grupo **saponina-TPI-r-GP**, no se observó el mismo comportamiento, ya que solo existió un incremento del 18% que no mejoró en la respuesta secundaria, o sea este fue casi la mitad del grupo semejante con la GST-r. El grupo saponina-TPI-r sin GP, incrementó los niveles preinmunes a la respuesta primaria en 22%, manteniéndose en este nivel en la respuesta secundaria, presentando el mismo comportamiento que con el grupo semejante de la GST-r sin GP.

Esto sugiere que la combinación antígeno-GP, logró mejorar la producción de anticuerpos a diferencia de cuando se emplea el antígeno solo, mostrando más capacidad estimulante un antígeno parasitario (31.5%), que la ovoalbúmina (14%), utilizando el mismo ensayo para la medición.

Llama la atención que en caso de la TPI, el grupo de saponina-GP, mostró un incremento en los niveles de anticuerpos específicos, aunque no se haya administrado el antígeno, pero solamente hubo diferencia estadísticamente significativa con el grupo de saponina, tanto en la respuesta primaria como en la secundaria, no la hubo con respecto a los dos grupos; con antígeno y antígeno-GP. Es posible que el glicofosfopeptical haya estimulado de manera inespecífica la producción de anticuerpos, ya que como se mencionó en los grupos donde si se administró cualquiera de los dos antígenos y el glicofosfopeptical, se observó un incremento en los niveles séricos de los mismos. La naturaleza polisacárida del glicofosfopeptical podría explicar este comportamiento, aunque no se observó con los grupos de GST-r

Nuestros resultados no permiten afirmar si los incrementos observados son debidos a la acción directa del glicofosfopeptical sobre los linfocitos B, o cual es el mecanismo para producir el efecto observado.

Estos hallazgos no han sido reportados previamente hasta donde sabemos. Es claro que pueden existir diferencias dependiendo del antígeno empleado en combinación con el glicofosfopeptical, aunque no podemos explicarlas en este momento.

CONCLUSIONES

- 1.-El modelo murino empleado permitió identificar diferencias entre los tratamientos.
- 2.-El ensayo inmunoenzimático en fase sólida (ELISA), es una herramienta útil para cuantificar anticuerpos antígeno específicos, cuando se emplean proteínas purificadas.
- 3.-El esquema de inmunización utilizado, la vía de administración y la dosis del fármaco empleadas, fueron los apropiados para lograr probar la hipótesis de trabajo.
- 4.-Logramos identificar un antígeno recombinante originario de un parásito, como útil para estudiar la respuesta inmune humoral *in vivo* en un modelo murino.
- 5.-El glicofosfopeptical a las dosis empleadas en humanos, podría ser un adyuvante para potenciar la respuesta inmune humoral a determinados antígenos en este modelo murino.

5. BIBLIOGRAFÍA

Abbas, A. et al. (2002). Inmunología celular y molecular. España: Mc Graw Hill. Interamericana.

Akira, Ito. et al. (1991). Vaccination against *Taenia taeniaeformis* infection in rats using a recombinant protein and preliminary análisis of the induced antibody response. *Molecular and Biochemical Parasitology*; 44: 43 – 52.

Ávila, G. et al. (2006). Laboratory animal models for human *Taenia solium*. *Parasitology International*; 55: S99 – S103.

Beat A. et al. (2004). Adhesión mechanisms regulating the migration of monocytes. www.nature.com/reviews/immunol; 4:432 – 444.

Bongiorno, A. et al. (1989). Estudio controlado versus placebo de la eficiencia y tolerancia de un nuevo modificador de la respuesta biológica AM3 (Inmunoférón) en BNCO. *Ciencia Médica*; 6: 357 – 362.

Bourlan, R. et al. (1992). Reporte preliminar de la utilidad de un Nuevo modificador de la respuesta biológica (MRB) AM3 en el tratamiento de la hepatitis crónica B. *Com. Inv. Clin. Lat. Am. Mex.*; 12.

Brieva, A. et al. (2001). Inmunoférón, a glycoconjugate of natural origin, inhibits LPS-induced TNF- α production and the response to endotoxemia. *Int. Immunopharmacology*; 1979 – 1987.

Brieva, A. et al. (2002). Inmunoférón, a glycoconjugate of natural origin, regulates the liver responses to inflammation and inhibits TNF- α producción by an HPA axis-dependent mechanism. *International Immunopharmacology*. 2: 807 – 813.

Brieva, A. et al. (2003). Inmunoférón; inmunomodulator of natural origin, does not affect the rat liver cytochrome P-450 and phase II conjugation enzymes. *Methods. Find Clin. Ex. Immuno.*; 25: 117 – 191.

Brieva, A. et al. (2004). AM3 inhibits HBV replication through activation of peripheral blood mononuclear cells. *International Immunopharmacology*; 4: 921 – 927.

Carlo, M. et al. (1990). Estudio doble ciego controlado con placebo de una nueva sustancia inmunomoduladora. *Geriátrika*; 6: 65 – 69.

Carlo M. et al. (1990). Eficacia y tolerancia de un nuevo modificador de la respuesta biológica. (AM3) para la prevención de las reagudizaciones bronquísticas en el curso de bronconeumopatía crónica obstructiva (BNO). *Geriátrika*; 6 (1): 37 – 42.

Castro Fuentes, I. (2005). Estudio de la respuesta inmune en un modelo murino al complejo GST de *Taenia solium*. México, D.F. Tesis para obtención del título Q.F.B. Facultad de Química. UNAM

Cervantes, S.G. et al. (1991). Un nuevo modificador de la respuesta biológica. Efectividad como recuperador de la mielosupresión en pacientes de alto riesgo que reciben esquemas agresivos de quimioterapia. *Cancerología*; 37: 1415 – 1424.

De la Garza, S.G. et al. (1987). Evaluación de Inmunoférón (AM3) en la recuperación de a depleción medular en pacientes con cáncer de mama sometidos a quimioterapia. *Rev. Del. INC*. 33: 453 – 457.

Díaz, M.A. et al. (2003). Th1 and Th2 indices of the immune response in pigs vaccinated against *Taenia solium* cysticercosis suggest various host immune strategies against the parasite. *Veterinary Immunology and Immunopathology*; 93: 81 – 90.

Edward T, M. (editor). (1987). *Enzyme-Immunoassay*. USA: CRC Press. Capítulos 6 – 9.

Flisser, A. et al. (2006). *Taenia solium*: un parásito cosmopolita. *Investigación y Ciencia*: 24 – 33.

Foster, L.H. (1983). *The mouse in biomedical research*. Volume III. USA: Academic Press, INC. Capítulos: 1, 2, 15 y 18.

Gachlin, G. (2001). Antigen Recognition by lymphocytes. *Encyclopedia of life sciences*; www.els.net.

Gallego, J. et al. (1997). Study of the immunostimulating effect of glicophosphopeptical (AM3) in mice. FEMS Immunology and Medical Microbiology. 18: 87 – 89.

Golub, Edward. Immunology Synthesis. USA: 1987. Sinauer.

Güenechea, G. et al. (1995). AM5 a protein- associated polysacharide, stimulates hematopietics and modulates the expresión of endogenous heaematopietic growth factors in murine long-termbone marrow cultivates. Stem Cells; 13: 175 – 185.

Hötzingter, H. (1988). Estudio de un modificador de la respuesta biológica, en el tratamiento de las infecciones de la esfera ORL. Acta Otorrinolaring; 39: 135 – 138.

James, K. (2001). Immune responses: Primary and Secondary; Encyclopedia of life sciences; www.els.net.

Jiménez, L. et al. (2000). Cloning, expresión and characterisation of a recombinant triosaphosphate isomerase from *Taenia solium*. International Journal for Parasitology; 30: 1007 – 1012.

Jiménez, L. et al. (2003). A comparative study of biochemical and immunological properties of triosephosphate isomerasa from *Taenia solium* and sus SCROFA. J. Parasitol; 89 (2): 209 - 214.

Johannes, B. (973). T-cell-antigen recognition and the immunological synapse. Narure reviews/immunology; 3: 973 - 983.

Kapsenberg, M. (2003). Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization; 3: 984 – 993.

León Rosario, P. (2005). Estudio de la expresión diurna de la catepsina H, en el plexo coroideo de la rata. México, D.F.: Tesis para obtención del título Q.F.B. FES Iztacala. UNAM

Maizels, R. Yazdanbaktsh. (2003). Immune regulation by herminth parasites: Celular and molecular mechanisms. Nature Review immunology; 3: 732 – 744.

Majano, P. et al. (2004). AM3 inhibits HBV replication through activation of peripheral blood mononuclear cells. *International immunopharmacology*: 4: 921 – 927.

Majano, P. et al. (2005). AM3 inhibits LPS-induced iNOS expresión in mice. *International pharmacology*. 5: 1165 – 1170.

Marcos Sánchez, F. et al. (1989). Valoración clínica de glicofosfopeptical (Inmoferón) como tratamiento asociado en pacientes afectados de enfermedad pulmonar crónico. *An. Med. Intern.*; 6 (12): 657 – 658.

Millan Rodríguez, et al. (2003). Estudio piloto del tratamiento coadyuvante de la cistitis recidivante de la mujer mediante AM3 (Inmoferón). *Actas Urol Esp.*; 27: 195.

Moya, P. et al. (1988). Inmoferón (AM3) enhances the activities of early – type interleucin inducers and natural killer cells. *Immunopharmacol. Immunotoxicol*; 9: 243 – 356.

Moreno Ramírez, Arturo. (2003). Glicofosfopeptical como inmunorestaurador en niños con leucemia aguda linfoblástica sometidos a fase de consolidación. 6th International Congreso for Infection Diseases.

Muñoz-Duque, J.G. (1984). Estudio de un nuevo inmunoestimulante en geriatría. *Geriátrika*. 2: 61 – 68.

Nava Baleras, G. et al. (2005). Purificación y caracterización de la enzima glutation S-transferasa microsomal de cisticercos de *Taenia solium*. *Memorias del XIV Congreso de Bioquímica, A.C. del 13 – 18 Nov. 2005, Oaxaca, Oaxaca.*

Nath, Indira.(2001). Immune Mechanisms gainst intracellular pathogens. *Enciclopedia of life sciencse*. www.els.net.

Ollera Tassara, N. et al. (1984). Valoración clínica del Inmoferón en el tratamiento de la bronquitis crónica. España. *Geriatrika*. 3: 73 – 79.

Ortega del Álamo, P. et al. (2005). Efecto de AM3 sobre la resolución de la otitis media serosa (OMS) en pacientes pediátricos. *Acta otorrinolaringol. Esp.*; 56: 1 – 5.

Pantoja-Uceda, David. et al. (2003). Solution structure of RicC3, a 2S Albumin storage protein from *Ricinus communis*. *Biochemistry*; 42:13839 – 13847.

Pederse, A. (2001). Immunity to infection. *Enciclopedia of life sciences*. www.els.net.

Perna, G. (1990). AM3 (Inmunofeón) un nuevo modificador de la respuesta biológica, eficacia y tolerancia en la profilaxis de las recidivas infecciosas en pacientes ancianos con bronconeumopatía. *Geriátrika*; 6 (3): 94 – 96.

Pérez, O. (2002). Los adyuvantes. Simples ayudantes o secretos e imprescindibles agents vacunales. Depto. Inmunología básica y clínica, Instituto Finlay, La Habana, Cuba.

Prieto, A. et al. (2001). Defective Natural Killer and phagocytic activities in chronic obstructive polacreny disease are pulmonary disease are restored by Glycophosphopeptical (Inmunofeón). *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*; 163: 1578 – 1583.

Ramírez Almaraz, J.A. et al. (2002). Efecto de la inmunoestimulación en el paciente traumatizado. *Acta Ortopédica Mexicana*; 16 (5): 253 – 257.

Ramírez Almaraz, J.A. et al. (2000). Inmunomodulación en un modelo murino de quemaduras y heridas. *Rev. Lat. De Microbiología*; 42: 393.

Rao, K. (2001). Antigens. *Encyclopedia of life sciences*. www.els.net.

Ravindranath, M. (2001). Antigens: Carbohydrates. *Enciclopedia of life sciences*. www.el.net.

Reyes Martín, E. et al. (2004). Efecto del inmunomodulador AM3 sobre las agudizaciones en enfermos con bronquitis crónica: una revisión sistemática de estudios controlados. *Rev. Clin. Esp.* 2004; 204: 466 – 471.

Reyes, E. et al. (2006) Treatment with AM3 restores defective T-Cell function in COPD patients. *American College of Chest Physicians*; 129: 527 – 535.

Rivera, I.R. et al. (1990). Efecto del AM3 en la granulocitopenia inducida por quimioterapia en pacientes pediátricos con tumores sólidos. *Cancerología*; 36: 1027 – 1032.

Rodríguez, P. D. et al. (2005). B cells as antigen presenting cells. *Cellular immunology*. 238: 67 – 75.

Roitt, I. (1998). *Immunogy*. USA : Mosby.

Rojo, M.J. et al. (1986). Enhancement of lymphocyte proliferation, interleukin-2 producción y actividad de NK por Inmunofeón (AM3), a fangal immunomodulator: Variations in normal and immunosuppressed mice. *International Journal of Immunopharmacology*; 8 (6): 593 – 597.

Ruiz Mercado, Hector. (2000). Utilidad del tratamiento coadyuvante con glicofosopeptical como inmumodulador en lesiones del pie diabético. Hospital regional “Valentín Gómez Farias”, Zapopan, Jalisco, México.

Scaglione, S. et al. (1990). AM3 (Inmunofeón) en el tratamiento y en la prevención de las vías aéreas en los ancianos con bronconeupatía crónica. *Geriátrika*; 6 (1): 37 – 42.

Shmith, P. et al. (1991). Purified glutathione S-transferases from parasites as condidate protective antigens. *Internacional Journal Parasitology*; 21: 839 – 846.

Sharon, N. et al. (2004). History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology*; 14: 53R-62R.

Solis, C. et al. (2004). Hacia el desarrollo de una vacuna en contra de la cisticercosis porcina basada en la paramiosina de *Taenia solium*. *Gac. Méd. Méx.*; 140: 129 – 138.

Toenjes,R. et al. (1999). The systemic immuno response of BALB/c mice infected with larval *Taenia crassiceps* is a mixed Th1/Th2-type response. *Parasitology*; 118: 623 – 633.

Toledo, A. et al. (2001). Two epitopes Shared by *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* confer protection agaist murine *Taenia crassiceps* cysticercosis along with a prominent T1 response. *Infection and immunity*; 69: 1 – 8.

Toledo, A. et al. (1999). Towards a *Taenia solium* cysticercosis vaccine: an Epitope Shared by *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* protects mice against experimental cysticercosis. *Infection and immunity*; 2522 – 2530.

Varela, J. et al. (2002). Identification and characterization of the peptidic component of the immunomodulatory glycoconjugate, Inmunofeón. *Methods. Find Exp. Clin. Pharmacol.*; 24: 471 – 480.

Vibanco-Pérez, N. et al. (1999). Characterization of Glutathione S-transferase of *Taenia solium*. J. Parasitol; 85 (3): 448 – 453.

Vibanco-Pérez, N. et al. (2002). Characterization of a recombinant mu-class Glutathione S-transferase of *Taenia solium*. Parasitol Res; 88: 398 – 404.

Villarrubia, G. Vicente. et al. (1996). Las nuevas vacunas y la respuesta inmunológica (y II). El entorno de la presentación antigénica. Adyuvantes como inductores de linfocitos T-inductores de respuestas a mediación celular; Medicina Clínica: 107; 185 – 196.

Wingren, C. (2001). Antibody responses: Development. Encyclopedia of life sciences. www.els.net.

Zouali, M. (2001). Antibodies. Enciclopedia of life sciences. www.els.net.

6. Apéndices

6.1 Sistema de geles de poliacrilamida con Dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE)

GELES DE POLIACRILAMIDA

SEPARADOR

Soluciones	10 %
Acrilamida 30 % (p/v) Bis acrilamida 0.8 %	3.3 mL
Tris 1.5 M, pH 8.8	2.5 mL
H ₂ O dd	3.4 mL
SDS 10 % (p/v)	200 µL
Persulfato de amonio	66 µL
Temed	6.6 µL

CONCENTRADOR

Soluciones	10 %
Acrilamida 30 % (p/v) Bis acrilamida 0.8 %	1 mL
Tris 1.5 M, pH 6.8	1.5 mL
H ₂ O dd	3.02 mL
SDS 10 % (p/v)	60 µL
Persulfato de amonio	20 µL
Temed	3 µL

6.2 Tinción con el colorante Azul de Coomasie al 0.1 %

Azul de Coomasie R-250 (Coomassie brilliant blue R-250, No. 1666610400 BIO-RAD.

Metanol al 50 % v/v

Ácido acético al 7 % v/v

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

6.3 Solución amortiguadora de carbonato, pH 9.5

Carbonato de sodio anhidro (Na_2CO_3) 0.003 M
(0.159 g/ 50 mL)

Carbonato ácido de sodio (NaHCO_3) 0.069 M
(0.293 g/ 50 mL)

Azida de sodio (Na_2N_3) 0.0061 M
(0.020 g/ 50 mL)

6.4 PBS- Tween 20 al 0.1 % v/v pH 7.4

Un mL de Tween 20 para un 1 Litro de PBS IX

Cloruro de sodio (NaCl) 0.015 M
(16 g/ 2 L)

Fosfato de Potasio Dibásico 0.0014 M
(0.4 g/ 2L) (K_2HPO_4)

Fosfato de sodio dibásico 0.02 M
(5.8 g/ 2 L) (Na_2HPO_4)

Cloruro de potasio (KCl) 0.0026 M
(0.4 g/ 2 L)

Ázida de sodio 0.0061 M
(0.4 g/ 2 L) (Na_2N_3)

Tween 20 0.1 %
(2 mL / 2 L)

6.5 Sustrato para enzima Fosfatasa alcalina.

p-nitrofenilfosfato	46.16 mg
Tris-HCl, pH 9.5	10 mL
Dietanolamina	1.05 g
MgCl ₂	25 mg

7. GLOSARIO

- **Anticuerpo:** Molécula (Glicoproteína) producida por animales en respuesta a un antígeno, que tiene la propiedad de combinarse específicamente con el antígeno que indujo su formación.
- **Antígeno:** Molécula que reacciona con un receptor específico de las células T o B. Molécula capaz de ser reconocida por las células inmunes mediante receptores específicos.
- **Adyuvante:** Es una sustancia que estimula la respuesta inmune hacia un antígeno pero en forma inespecífica.
- **Cisticerco:** Forma larvaria del parásito *Taenia solium*.
- **Cisticercosis:** Infección causada por la larva de *Taenia solium*.
- **Coestimulación:** Señales requeridas para la activación de un linfocito, además de la señal antígeno específica enviada vía su receptor de antígeno.
- **Fagocitosis:** Proceso por el cual las células endocitan algún tipo de material y lo encierran en una vacuola (fagosoma) en el citoplasma.
- **GALT:** Tejido linfoide asociado a tracto gastrointestinal.
- **GST:** Glutación S-transferasa. Enzima encargada de detoxificación de xenobióticos.
- **Inmunógeno:** Molécula que tiene la capacidad o habilidad de inducir una respuesta inmune mediante células T o B, además de ser reconocido por los receptores de las células antes mencionadas.
- **Interferón:** Grupo de moléculas involucradas en la señalización entre células del sistema inmune, y ayuda frente a infecciones virales. V.gr. INF- α .
- **Interleucina:** Grupo de moléculas involucradas en la señalización entre células del sistema inmune.
- **Neurocisticercosis:** Infección causada por los cisticercos de *Taenia solium* pero a nivel sistema nervioso central.
- **Oncosfera:** Embrión exacanto de *Taenia solium*.
- **Paramiosina:** Proteína de *Taenia solium*, originalmente conocido como Ag B, y es la molécula mejor estudiada de éste parásito.

- **Polisacárido:** Son carbohidratos en los cuales decenas, centenas o aun millares de azúcares simples están unidos por medio de enlaces glucosídicos..
- **Teniosis:** Infección generada por el parásito adulto de *Taenia solium* (solitaria), y dicha infección es causada sólo en humanos.
- **TNF- α :** Factor de necrosis tumoral; Conjunto de citocinas liberadas por los macrófagos activados que estructuralmente están relacionadas a la liberación de linfotoxina por activación de células T.
- **TPI:** Triosa fosfato isomeraza, enzima participante de metabolismo energético de Diversos organismos, como es la Glicólisis.
- **Vacuna:** Preparados inmunogénicos atenuados, confieren respuesta inmune pero no provocan enfermedad, esta respuesta genera memoria inmunológica produciendo, en la mayoría de los casos, inmunidad permanente frente a la enfermedad. La vacunación fue inventada por Edward Jenner.