



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Medicina

INMUNOLocalización DE LOS Péptidos
RECOMBINANTES PROTECTORES TSOL18 Y
TSOL45 EN LOS TRES ESTADIOS DE
DESARROLLO DEL CÉSTODO *Taenia solium*

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Biología Experimental

P R E S E N T A

Q. F. B Joel Martínez Ocaña

Directora de Tesis: Dra. Ana Flisser Steinbruch

MÉXICO, D.F.

Octubre, 2008



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.

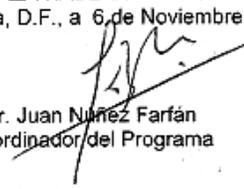
Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 6 de Octubre de 2008, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** del alumno **JOEL MARTÍNEZ OCAÑA** con número de cuenta **86093844** con la tesis titulada **"INMUNOLocalización de los péptidos recombinantes protectores TSOL18 Y TSOL45 en los tres estadios de desarrollo del céstodo *Taenia solium*"**, realizada bajo la dirección de la **DRA. ANA FLISSER STEINBRUCH**:

Presidente: DRA. PATRICIA MARGARITA TATO ZALDÍVAR
Vocal: DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA
Secretario: DRA. ANA FLISSER STEINBRUCH
Suplente: DRA. INGEBORG DOROTHEA BECKER FAUSER
Suplente: DR. RUY PÉREZ TAMAYO

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 6 de Noviembre de 2008.


Dr. Juan Núñez Farfán
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado.

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas por todo el apoyo brindado para la elaboración de esta tesis.

A la Dra. Ana Flisser Steinbruch por su guía, apoyo, confianza y sobre todo; por ser la principal inspiradora en el camino difícil y apasionante de la ciencia.

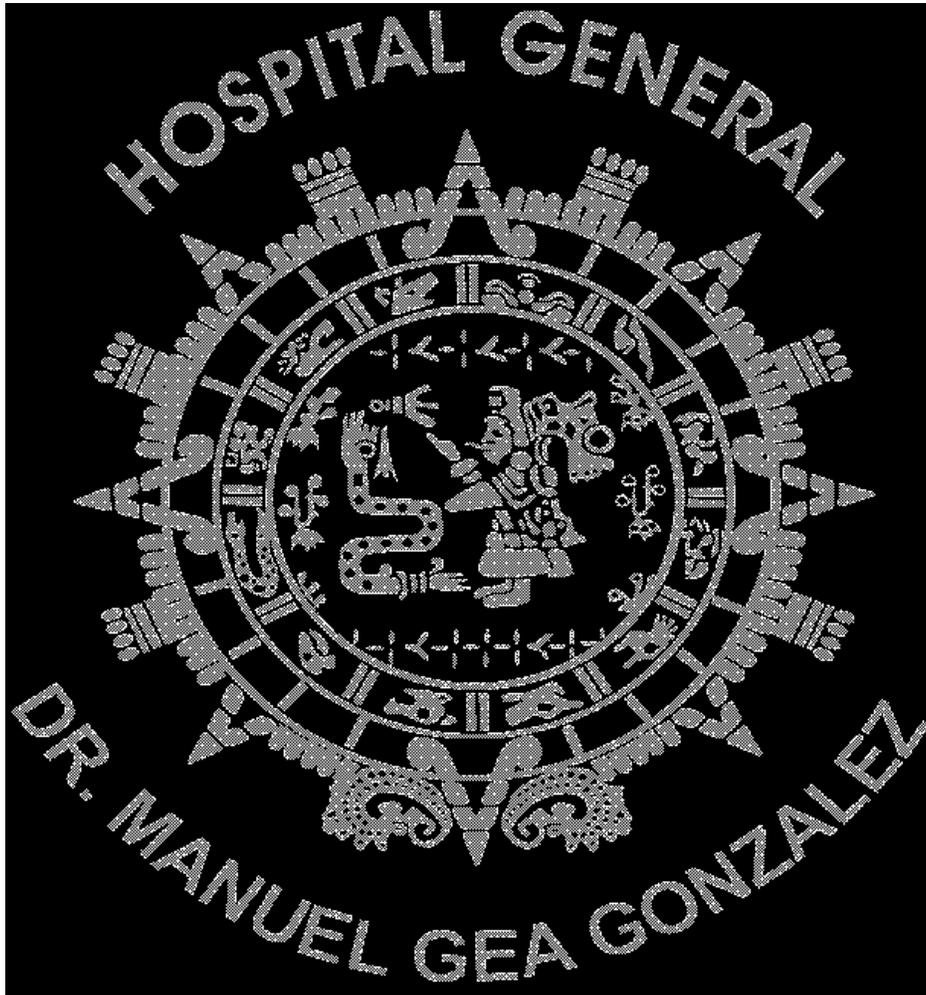
A mi comité tutorial conformado por el Dr. Ruy Pérez Tamayo y el Dr. Luis Felipe Jiménez García. Por su guía, observaciones y comentarios a lo largo de todo este trabajo

A mi jurado: Dra Patricia Margarita Tato Zaldívar y Dra. Ingeborg Dorotea Becker Fauser por sus observaciones y comentarios para la mejoría de esta tesis.

Al Hospital General “Dr. Manuel Gea González” por permitirme ser parte de la institución, por toda la infraestructura y el apoyo brindado para la elaboración de este trabajo.

A la Técnica titular “C” TC María del Carmen García Ponce de León por compartir sus conocimientos en inmunohistoquímica y contribuir con este trabajo.

Al Técnico Pedro Balderas flores por la elaboración de los cortes histológicos.



Al Hospital General “Dr. Manuel Gea González” por apoyo brindado para la elaboración de este trabajo.

AGRADECIMIENTOS

A mi madre y mi padre, gracias por todo su cariño y comprensión, porque gracias a ellos he llegado hasta donde ahora estoy.

A mis hermanas Rosa, Blanca, Lilia y Laura, por todo su cariño y apoyo.

A Miza, Pablo y Angélica por ser amigos y compañeros de trabajo, además de haber colaborado en este trabajo directamente, así como en las largas y enriquecedoras discusiones “bizantinas”.

A Fernando González “Ing” por contribuir con sus conocimientos en computación y escaneo de fotos que apoyaron en la elaboración de esta tesis.

A mis compañeros de laboratorio: Guille, May, Laura, Karina, Diego por su apoyo y porque de alguna manera contribuyeron en este trabajo.

CONTENIDO

1. RESUMEN	8
2. INTRODUCCION	9
2.1 <i>Taenia solium</i>, biología y morfología	10
2.1.1 El estadio adulto de <i>T. solium</i>	11
2.1.2 El huevo	15
2.1.3 El cisticerco	16
2.2 <i>Taenia solium</i>, un parásito de importancia mundial	18
2.3 Vacunación en contra de la cisticercosis	20
2.3.1 Antígenos oncosferales	20
2.3.2 Estudios de inmunolocalización	23
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	24
4. OBJETIVO	24
5. HIPÓTESIS	24
6. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES	25
7. MATERIAL Y MÉTODOS	26
7.1 Obtención de cisticercos y gusano adulto de <i>T. solium</i>	26
7.2 Obtención de oncosferas de <i>T. solium</i>	27
7.3 Inclusión en parafina y elaboración de cortes histológicos	27
7.4 Purificación de inmunoglobulinas a partir de suero de cerdos	28
7.5 Inmunoperoxidasa	29
7.6 inmunofluorescencia	30
8. RESULTADOS	31
8.1 Inmunoperoxidasa	31
8.1.1 Reconocimiento en escólex y cuello de <i>T. solium</i>	31
8.1.2 Reconocimiento en proglótido inmaduros de <i>T. solium</i>	32
8.1.3 Reconocimiento en proglótidos maduros de <i>T. solium</i>	32

8.1.4 Reconocimiento en cisticercos de <i>T. solium</i>	33
8.2 Inmunofluorescencia	33
8.2.1 Reconocimiento en oncosferas de <i>T. solium</i>	34
8.2.2 Reconocimiento en escólex y cuello de <i>T. solium</i>	34
8.2.3 Reconocimiento en proglótidos de <i>T. solium</i>	35
8.3 Resumen de resultados	47
9. DISCUSIÓN	48
10. ANEXOS	51
11. BIBLIOGRAFÍA	53

RESUMEN

Taenia solium es el céstodo que ocasiona la teniosis y cisticercosis. El gusano adulto parasita al ser humano, como hospedero definitivo, cuando la larva o cisticerco de *T. solium* se aloja en el sistema nervioso central produce la neurocisticercosis, que es una enfermedad grave en el ser humano. Cuando los cisticercos se establecen en el cerdo se producen pérdidas económicas en la porcicultura, además de contribuir a la continuación del ciclo de vida del parásito. Una de las medidas para romper el ciclo biológico de *T. solium* es el desarrollo de vacunas en contra de la cisticercosis porcina. Se han utilizado como vacunas desde extractos antigénicos hasta péptidos recombinantes, estos últimos llamados TSOL18 y TSOL45, que indujeron 99.5% y 97% de protección respectivamente, en experimentos de vacunación en cisticercosis porcina. Estos altos valores de protección sugieren que estos péptidos tienen un papel relevante en la biología del parásito, por ello en esta tesis usando los anticuerpos anti TSOL18 y anti TSOL45 producidos en los cerdos vacunados, se buscaron estos antígenos en los tres estadios del parásito por inmunoperoxidasa e inmunofluorescencia. Los resultados mostraron que TSOL18 y TSOL45 se encuentran expresados únicamente en la superficie de la oncosfera de *T. solium*, lo que indica que se trata de antígenos estadio-específicos, debido a ello son el blanco de la protección contra cisticercosis porcina.

2. INTRODUCCIÓN

La teniosis y la cisticercosis ocasionadas por el céstodo *Taenia solium* ocurren tanto en áreas urbanas como rurales de países con condiciones insalubres, entre ellas las prácticas tradicionales de crianza de cerdos, malas condiciones sanitarias y malos hábitos higiénicos (Flisser et al. 1999). El estadio adulto de *Taenia solium* parasita al hombre, alojándose en el intestino delgado. La tenia adulta está constituida por un escólex, cuello y un estróbilo, formado por proglótidos en diferentes grados de madurez sexual; inmaduros, maduros y grávidos, estos últimos, contienen de 50,000 a 60,000 huevos que son liberados en las heces de los portadores. Los huevos, al ser ingeridos por el hombre o el cerdo, producen la cisticercosis. El humano, al ingerir carne de cerdo inadecuadamente cocida, que contiene cisticercos, desarrolla la teniosis, completando de esta manera el ciclo de vida de *Taenia solium* Fig 1, (Flisser et al. 1999, Sotelo, 2000).

La interrupción de la transmisión de *T. solium* requiere de medidas combinadas incluyendo educación para la salud (Flisser et al. 2003) y el desarrollo de vacunas contra la cisticercosis porcina (Roman G et al. 2000). Se han clonado y expresado en *Escherichia coli* los genes de *T. solium* TSOL18 y TSOL45, que son homólogos a los de *Taenia ovis* y que codifican para antígenos oncosferales protectores (Lightowlers et al. 2003). Recientemente realizamos ensayos de vacunación en cisticercosis porcina, obteniendo 99.5% y 97% de protección para TSOL18 y TSOL45 respectivamente, (Flisser et al. 2004). Los altos valores de protección sugieren que estos péptidos tienen un papel relevante en la biología del parásito, por lo cual un primer paso para definir su función es conocer la expresión de estos antígenos en el parásito.

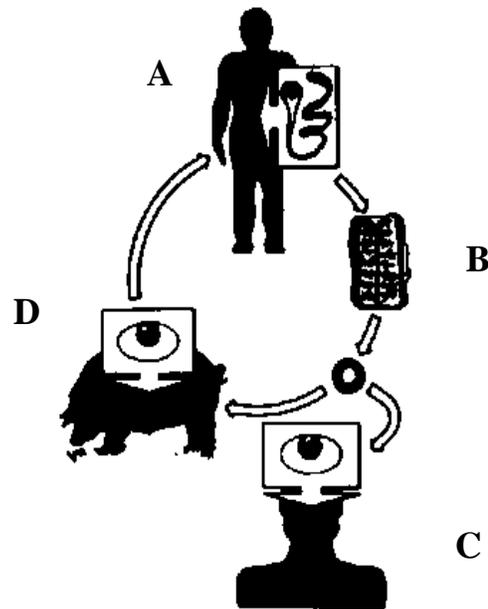


Fig. 1. Ciclo de vida de *Taenia solium*: (A) hospedero definitivo, (B) eliminación de proglótidos llenos de huevos, los cuales pueden ser ingeridos por el hombre (C), o por el cerdo (D) ocasionando la cisticercosis, cuando el cisticerco se aloja en el SNC produce la neurocisticercosis. Finalmente cuando el hombre consume carne de cerdo con cisticercos desarrolla la teniasis. Tomado de Flisser et al. 1998.

2.1 *Taenia solium*, biología y morfología

Clasificación taxonómica

Reino: Animalia

Phylum: Platyhelminthes

Clase: Cestoda

Sub-clase: Eucestoda

Orden: Cyclophyllidea

Familia: Taenidae

Genero: *Taenia*

Especie: *T. solium*

2.1.1. El estadio adulto

El parásito adulto es un gusano plano, en forma de cinta, de color blanquecino, constituido por escólex, cuello y estróbilo. El escólex, que es del tamaño de la cabeza de un alfiler, está formado por cuatro ventosas y un rostelo que posee una doble corona de ganchos: la interna con 12 a 16 (0.13-0.16 mm) y la externa, con igual número de ganchos pero ligeramente más pequeños (0.10-0.12 mm). El cuello se encuentra después del escólex, produce a los proglótidos que constituyen el estróbilo, el cual mide de 2 a 4m de largo y tiene proglótidos en diferentes estados de desarrollo. Los más cercanos al cuello son inmaduros, ya que aún no tienen órganos sexuales, después están los proglótidos maduros, en los cuales ya se han desarrollado los órganos sexuales, tanto masculinos como femeninos. Los últimos segmentos son los grávidos que están llenos de huevos. Cada proglótido grávido mide de 0.5 a 2 cm y contiene aproximadamente 60,000 huevos (Fig 2). Se cree que en general, cada individuo parasitado libera de 2 a 5 segmentos 2 a 3 veces por semana (Yoshino, 1934).

En los maduros se encuentra el aparato sexual masculino que consiste en numerosos testículos dispersos y conectados por medio de túbulos seminíferos finos a un espermatoducto enrollado, cuyo final se encuentra modificado para formar un órgano muscular copulatorio llamado cirro que llega al poro genital, en el cual también desemboca la vagina, que es el conducto femenino que recibe los espermatozoides y los conduce al receptáculo seminal, que se conecta con el oviducto. Los espermatozoides se almacenan en el receptáculo seminífero. Los óvulos liberados periódicamente por el ovario, pasan a través del oviducto hasta el ootipo donde ocurre la fecundación. No se conoce si la inseminación ocurre por autofecundación dentro del mismo proglótido o con otro proglótido, incluso

con otro estróbilo en el caso de que hubiera más de una tenia parasitando al hospedero. Las células vitelinas almacenadas en las glándulas vitelinas migran hasta el ootipo para asociarse con los cigotos. Los cigotos recubiertos por células vitelinas reciben una secreción mucosa y serosa aportada por la glándula de Mehlis, que probablemente sirve como substrato para la formación del embrioforo fig.3 (Ubelaker 1983). En el útero, los cigotos se convierten en embriones maduros y se acumulan en las ramas que se forman a cada lado del conducto uterino principal (fig 4).

El aparato reproductor femenino está constituido por un ovario único formado por dos lóbulos grandes simétricos. El ovario está situado en el tercio posterior del proglótido, sobre la porción inferior de los vasos deferentes, del que parte el oviducto que se dirige a una pequeña cámara llamada ootipo. Existen glándulas accesorias que rodean al ootipo, y que tienen gran importancia en el desarrollo de los huevos. La glándula de Mehlis, que es un conjunto de células mucosas que forman un complejo amorfo que rodea al ootipo; el conducto vitelino común, que resulta de la unión de muchos conductos vitelinos primarios que proceden de las glándulas vitelógenas y el conducto del receptáculo seminal, que es una porción ensanchada del tubo vaginal que suele abrirse al atrio genital común (Smyth, 1989).

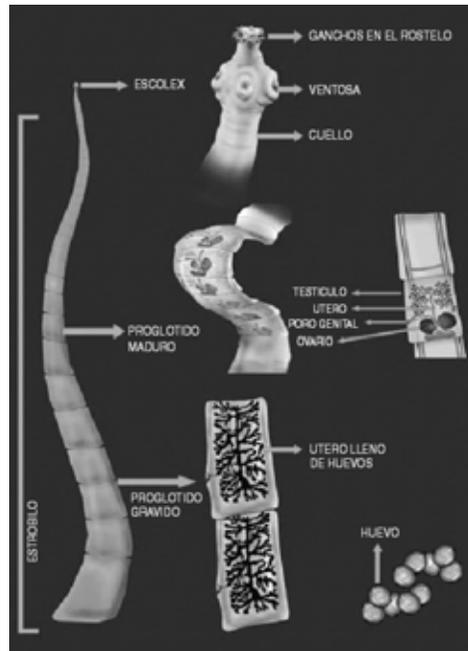


Fig. 2. Diagrama de la anatomía de *T. solium* mostrando: escólex y el estróbilo con proglótidos maduros, grávidos y huevos. Tomado de Flisser et al 2006.

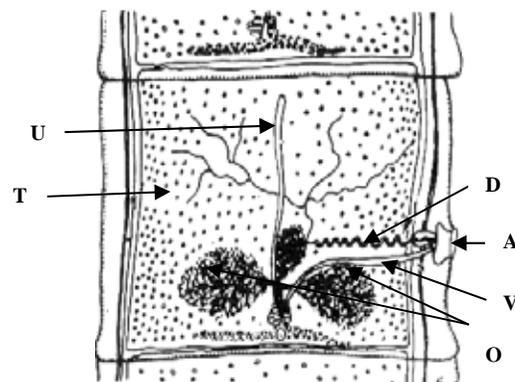


Fig 3. Ilustración esquemática de un proglótido de *T. solium* A: atrio genital, D: ducto genital, O: ovario bilobulado, T: testículos, V: vagina y U: útero. Tomado de Aluja et al 1987.

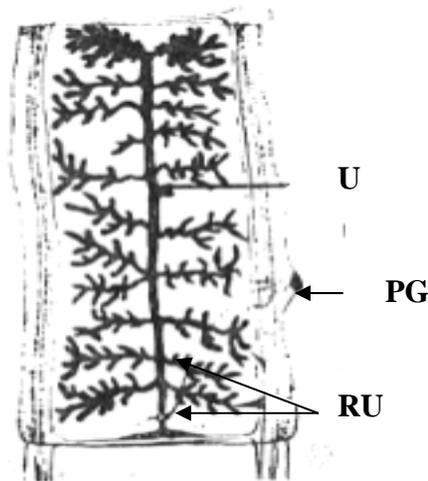


Fig 4. Ilustración esquemática de proglótidos grávidos de *Taenia solium*. U: conducto central del útero PG: poro genital; RU: ramas uterinas;.(Tomado de Aluja, A. *et al.* 1987).

La tenia carece de aparato digestivo, en su lugar, posee una superficie externa de gran importancia fisiológica; el tegumento, que envuelve al parásito en su totalidad, cumple una variedad de funciones como: absorción, digestión, protección y tracción. Este tegumento constituye una superficie celular muy activa, debido a que está cubierto de extensiones citoplásmicas, conocidas como microtricas que amplifican el área superficial de absorción del gusano y conforman una interfase entre el parásito y el lumen del intestino delgado del hospedero (Ubelaker, 1983) El tegumento de la tenia cubre un parénquima pseudo-esponjoso, dentro del cual se encuentran embebidas estructuras internas como músculos, nervios, células flama, ovarios, testículos y diversos tipos de conductos. Este parénquima se encuentra altamente especializado en la absorción de nutrientes principalmente carbohidratos y pequeños péptidos.

El sistema excretor es protonefridial, recorre el estróbilo en toda su longitud con cuatro canales colectores principales, dos ventrales y dos dorsales.

Un único canal transversal conecta los dos canales ventrales en el extremo posterior de cada proglótido. Los cuatro canales tienen ramificaciones cuyo y en el extremo libre tiene células flama que colectan los líquidos que se excretan en cada uno de los proglótidos (Lumsden y Hildreth, 1983, Ubelaker, 1983).

2.1.2. El huevo

Los huevos son esféricos, miden entre 30 y 45 μ m y tienen una apariencia radial cuando se observan bajo el microscopio de luz; son morfológicamente indistinguibles de los de los demás ténidos. La capa más externa del huevo es el vitelo, es poco frecuente encontrar huevos aún cubiertos por el vitelo en la materia fecal. Ya que este funciona como fuente de nutrientes durante la formación del embrión. Hay una siguiente capa gruesa llamada embrioforo constituida por bloques embriofóricos de una naturaleza parecida a de la queratina y una apariencia poligonal irregular. Estos bloques están unidos por una sustancia cementante que es susceptible a la digestión enzimática. La siguiente capa es la membrana embriofórica que tiene apariencia de cráteres y rodea al embrioforo. La capa más interna es la membrana oncosférica, es impermeable a los elementos ambientales, aunque se vuelve permeable cuando se ponen en contacto con la pancreatina y permite que el embrión expuesto, pero en reposo, se active (Laclette et al. 1982). La oncosfera se llama también embrión hexacanto porque tienen seis ganchos, pero se considera una larva al salir del huevo (fig 5).

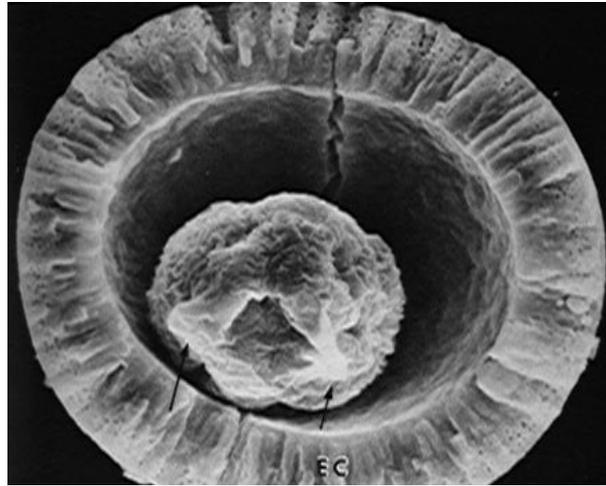


Fig 5. Microscopía electrónica en la que se observa la oncosfera rodeada por una gruesa capa de bloques embriofóricos. Las flechas señalan ganchos del embrión Tomada de Flisser et al 1982.

2.1.3. El cisticerco

La larva, metacéstodo o cisticerco de *T. solium* es una vesícula ovoide o esférica, blanquecina, semitransparente y tiene un escólex esférico invaginado (Flisser y Lightowlers 2001). La superficie interna es irregular con elementos celulares y fibras de colágena como elemento extracelular; el cuello invaginado y plegado, forma el canal espiral (Rabiela et al. 2000). Los cisticercos localizados en el cerebro humano son de dos tipos morfológicos: celuloso y racemoso. El tipo celuloso es pequeño (0.3 a 2.0 cm); tiene una vesícula esférica u ovalada blanca o amarillenta, con una pared translúcida, a través de la cual se puede observar el escólex como gránulo sólido excéntrico (fig 6). Las características morfológicas de los cisticercos celulosos alojados en los seres humanos y en los cerdos son similares. El tipo celuloso es más frecuente que el racemoso y generalmente está separado del tejido del hospedero por una cápsula fina de colágena (Rabiela et

al. 1982). El cisticerco racemoso es una vesícula grande, redondeada o lobulada, circunscrita por una pared delicada, o bien es similar a un racimo de uvas. Los cisticercos de tipo racemoso pueden ser muy grandes, hasta de 10 a 12 cm, y pueden contener hasta 60 mL de fluido (Berman et al. 1981). Probablemente la característica más importante de este tipo de parásitos es que en apariencia no tiene escólex, aunque en algunos casos se pueden observar vestigios de éste por medio de estudios histológicos detallados (Rabiela et al. 1989). No se ha informado de la presencia de cisticercos racemosos en cerdos.

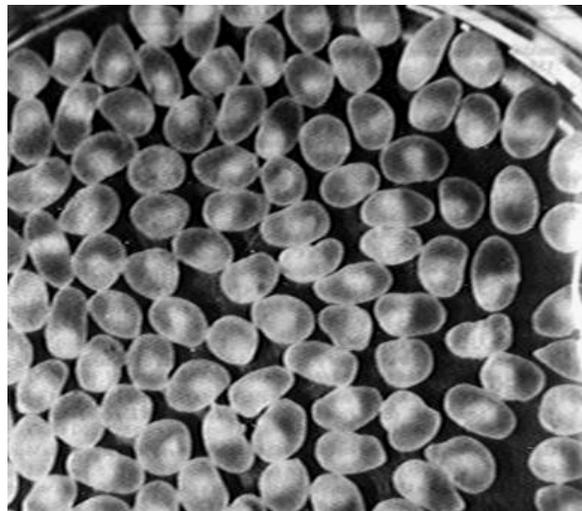


Fig 6. Cisticercos de tipo celuloso con vesícula translúcida, a través de la cual se puede observar el escólex. Tomado de Garcia H, 1998.

2.2 *Taenia solium*, un parásito de importancia mundial.

Taenia. solium es un parásito endémico en varios países de América Latina, Asia y África. En Norteamérica, solo Canadá y Estados Unidos parecen estar libres de la transmisión natural cerdo-humano de este parásito, aunque en estos países se ha observado un incremento en los casos de cisticercosis debido a la reciente inmigración de individuos con neurocisticercosis (NC) y portadores del gusano adulto procedentes principalmente de América Latina (Schantz et al. 1992, Flisser, 2002).

En Asia, la transmisión de *T. solium* se encuentra claramente asociada a prácticas culturales y a ciertas condiciones socioeconómicas. En la India, por ejemplo, una revisión de estudios epidemiológicos mostró que la mayor frecuencia de casos de teniosis se presentó principalmente en poblaciones rurales, consumidoras de carne de cerdo y con bajo nivel socioeconómico, destacando el hecho de que el 78% de los niños de familias que criaban cerdos fueron positivos para huevos de tenia en heces. Sin embargo, aún en las poblaciones donde no se consume ningún tipo de carne, se hallaron casos de cisticercosis debido al contacto indirecto con portadores de la tenia intestinal o por el consumo de alimentos contaminados con huevos de este helminto (Thakur y Anand 1991). Por otra parte, en países estrictamente musulmanes como Irán, Pakistán, Afganistán y Bangladesh, no hay reportes de teniosis y NC. Sin embargo en Kuwait se han reportado casos autóctonos e importados de NC y un caso de teniosis en un cocinero hindú. Aunque en los casos autóctonos no había historial de viajes a países donde la NC es endémica, si había información acerca del empleo de servidoras domésticas procedentes de países como Filipinas, Bangladesh e India (Hira et al. 2004). Asimismo, en países cercanos a la península de Indonesia la infección por *T. solium* parece ser endémica en

países como Sumatra, Bali y Java (Simanjuntak, et al. 1997, Wandra et al. 2000).

En África, la parasitosis por *T. solium* está presente en casi todo el continente, excepto en áreas estrictamente musulmanas como lo es el norte del continente (Willingham y Engels, 2006). En algunas regiones de África la NC es una causa importante de discapacidad y se ha informado que del 30 al 50% de los casos de epilepsia, son ocasionados por la infección por *T. solium* (Preux et al. 1996).

En Asia y África, la cisticercosis subcutánea, en pacientes que también sufren de NC es común, siendo aproximadamente mayor de 30%, en contraste con el continente americano en donde la cisticercosis subcutánea es muy rara. Además en África, debido al limitado desarrollo de los servicios médicos y la infraestructura sanitaria, el impacto de la enfermedad puede estar subestimado. La ausencia de servicios sanitarios y la practica de permitir que los cerdos deambulen libremente, permite que estos tengan acceso a materia fecal humana, por lo tanto favorece la continuación del ciclo de vida de *T. solium* (Permin et al. 1999).

En Perú, la teniosis es muy común y su frecuencia se ha calculado entre 10 al 25% en zonas hiperendémicas, mientras que la NC en general es del 10%, aunque en estudios de pacientes epilépticos de hospitales de neurología se ha visto que la prevalencia puede ser del 30 al 35%. (García et al. 1996).

En México, la prevalencia de teniosis varía del 0.2% al 4%, mientras que la NC es del 5 al 10%. Varios estudios han identificado factores de riesgo para la transmisión de *T. solium*, que incluyen dejar cerdos deambulando libremente en áreas con fecalismo al ras del suelo, lo que ocasiona que estos tengan acceso a las heces humanas, mala higiene personal e ineficiente infraestructura sanitaria. Asimismo se ha identificado como principal factor de riesgo asociado a la cisticercosis la cercanía con un portador de teniosis intestinal (Flisser et al.

2006). Se han llevado a cabo varios estudios de intervención para controlar estos factores de riesgo, por medio de educación para la salud, tratamiento masivo o dirigido para identificar a los portadores de tenia e interrumpir la transmisión de *T. solium* (Flisser et al. 2005).

2.3. Vacunación en cisticercosis

2.3.1 Antígenos oncosferales

Para evitar la transmisión de la teniosis-cisticercosis se requieren medidas combinadas incluyendo educación acerca de la enfermedad entre la población (Sarti et al. 1997), tratamiento contra la teniosis (Sarti et al. 2000), inspección sanitaria en rastros y comunidades (Fleury et al. 2006), etc. También se han desarrollado varias estrategias para el desarrollo de vacunas para evitar la cisticercosis porcina que van desde el uso de extractos crudos de antígenos parasitarios (Molinari et al. 1997) hasta péptidos sintéticos (Toledo et al. 1999, Sciutto et al. 1995, Jimenez et al. 2003) y proteínas recombinantes (Plancarte et al. 1999, Flisser et al. 2004).

Varias especies de céstodos han sido usados para evaluar vacunas basadas en antígenos oncosferales en modelos experimentales de *T. taeniaeformis* y *T. pisiformis*, que son parásitos que infectan a roedores y lagomorfos (Rickard et al. 1982, Lightowlers et al. 2006). Las investigaciones llevadas a cabo desde 1930 con *T. taeniaeformis*, cuyo cisticerco se nombraba “*cysticercus fasciolaris*”, indicaban que era posible producir altos niveles de protección en el hospedero intermediario por medio de la vacunación, con una variedad de preparaciones de antígenos parasitarios (Flisser y Lightowlers, 2001). Posteriormente se demostró que los antígenos derivados de oncosferas, eran los que producían altos grados de protección (Lightowlers, 2003). Con el advenimiento de la tecnología de DNA recombinante y la producción *in vitro* de

proteínas fue posible analizar de manera individual, cuales de las proteínas que conformaban las oncosferas eran las que inducían la protección (Lightowlers et al. 1984, 1986; Harrison et al. 1993). Se identificaron tres antígenos en *T. ovis* que fueron llamados 45W, 16K y 18K, posteriormente estos antígenos se obtuvieron a partir de mRNA de oncosferas y fueron clonados en *Escherichia coli*, se purificaron y se usaron en ensayos de vacunación contra *T. ovis* (Johnson et al. 1989; Harrison et al. 1996). Una vez confirmada su capacidad protectora en *T. ovis*, se usó la misma estrategia para identificar proteínas homólogas en otros céstodos relacionados, clonarlas y usarlas en ensayos de vacunación. De esta manera se identificaron las proteínas homólogas en *T. saginata*, TSA-9 y TSA-18 y en *T. solium*, TSOL18 y TSOL45 (cuadro 1).

Cuadro 1. Antígenos oncosferales recombinantes que han mostrado altos niveles de protección

Especie	Antígeno	Grupo de homología	Protección (%)	Referencia
<i>Taenia ovis</i>	To45W	45W	94	Johnson et al. 1989
	To16K	16K	92	Harrison et al. 1996
	To18K	18K	99	Harrison et al. 1996
<i>Taenia saginata</i>	TSA-9	45W	99	Lightowlers et al. 1996
	TSA-18	18K	99	Lightowlers et al. 1996
<i>Taenia solium</i>	TSOL18	18K	99.5	Flisser et al. 2004
	TSOL45	18K	97	Flisser et al. 2004

Los genes que codifican la proteína 45W consisten en dos exones pequeños que codifican al amino y carboxilo terminal, además de proteínas asociadas a cada uno de ellos y dos exones grandes, de tamaño similar, que codifican la mayor parte de las proteínas (Fig 7a). El tamaño de los exones e intrones es similar y

altamente conservado entre las diferentes especies de tenias. Los genes que codifican la proteína 18K consisten en dos exones pequeños que codifican el amino y carboxilo terminal y un exón más grande que codifica el resto de la proteína. (fig. 7d).

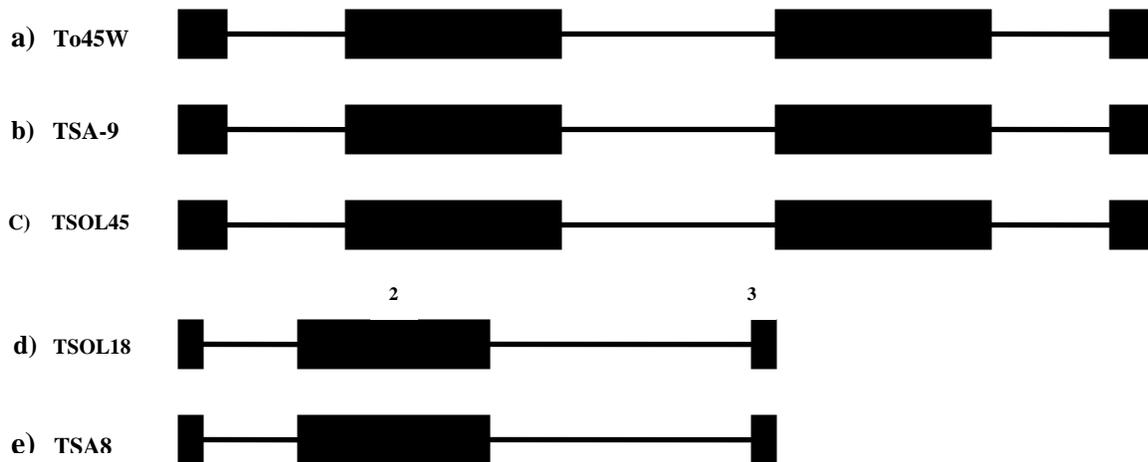


Fig 7. Representación esquemática de los genes de tenias que codifican antígenos oncosferales protectores, los exones se muestran en barras negras y los intrones con líneas. Tomado de Lightowlers et al. 2003.

Recientemente se realizaron ensayos de vacunación en cerdos con los péptidos recombinantes TSOL18 y TSOL45 obteniendo una protección de 99.5% y 97% respectivamente, ya que, excepto por un cisticerco encontrado en un cerdo vacunado con TSOL18 y seis cisticercos en cerdos vacunados con TSOL45, no hubo más cisticercos. En cambio en todos los cerdos testigo (inyectados con agua o con la proteína acarreadora) se encontraron decenas o centenas de cisticercos en la necropsia. Durante el proceso de inmunización de los cerdos se obtuvieron sueros denominados anti-TSOL18 y anti-TSOL45. Estos anticuerpos se utilizaron para evaluar la respuesta inmune humoral de los cerdos (Flisser et al. 2004). En esta tesis se usaron para localizar a los antígenos en cortes del parásito por inmunohistoquímica.

2.3.2. Estudios de inmunolocalización

La inmunohistoquímica permite demostrar una variedad de antígenos o moléculas presentes en las células o tejidos y se basa en la capacidad de los anticuerpos de unirse específicamente a los antígenos correspondientes y su visualización usando un anticuerpo secundario marcado con alguna enzima que, al hidrolizar al sustrato correspondiente, origina un producto que se precipita y da color. Las enzimas más frecuentemente utilizadas son peroxidasa y fosfatasa alcalina y los sustratos diaminobenzidina (color café), aminoetilcarbazol (color rojo) y nitroazul de tetrazolio (color azul) (Harlow, 1988).

En cisticercos de *Taenia solium* se localizó una molécula co-transportadora de glucosa, llamada SGLT, expresada en las microvelocidades de la pared externa del cisticerco (Cornford et al. 2001). En cambio, utilizando anticuerpos monoclonales se identificó miosina II en fibras musculares en el adulto y cisticerco de *T. solium*, además de la identificación de la expresión de isoformas de actina (Ambrosio et al 2003, Cruz et al. 2006). Otra proteína relevante que ha sido inmunolocalizada en *T. solium* es la calreticulina, la cual se ha encontrado expresada en el tegumento, ventosas y rostelo de los cisticercos y de manera diferencial durante el desarrollo sexual en proglótidos maduros del gusano adulto (Mendlovic 2006). En *Schistosoma japonicum* se ha demostrado la expresión de paramiosinas estadio-específicas en la superficie del parásito, utilizando microscopia e inmunocitoquímica, lo cual ha llevado a tratar de desarrollar una vacuna dirigida contra estas moléculas. Otras proteínas como la glutatión-s-transferasa y la proteína de unión a ácidos grasos han sido localizadas en estructuras internas del parásito en regiones asociadas al sistema reproductor femenino y en depósitos de lípidos, respectivamente (Gobert 1998)

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los altos grados de protección inducidos por TSOL18 y TSOL45 sugieren que tienen un papel relevante en la biología del parásito, por ello se propone inicialmente identificar su expresión fenotípica en los estadios de oncosfera, cisticerco y adulto de *Taenia solium*.

4. OBJETIVO

Identificar la expresión fenotípica de los antígenos protectores TSOL18 y TSOL45 en los tres estadios de desarrollo de *T. solium*.

5. HIPÓTESIS

Si los péptidos recombinantes TSOL18 y TSOL45 fueron obtenidos del estadio de oncosfera, es probable que únicamente se expresen en este estadio y no en el parásito adulto de *T.solium*.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los altos grados de protección inducidos por TSOL18 y TSOL45 sugieren que tienen un papel relevante en la biología del parásito, por ello se propone inicialmente identificar su expresión fenotípica en los estadios de oncosfera, cisticerco y adulto de *Taenia solium*.

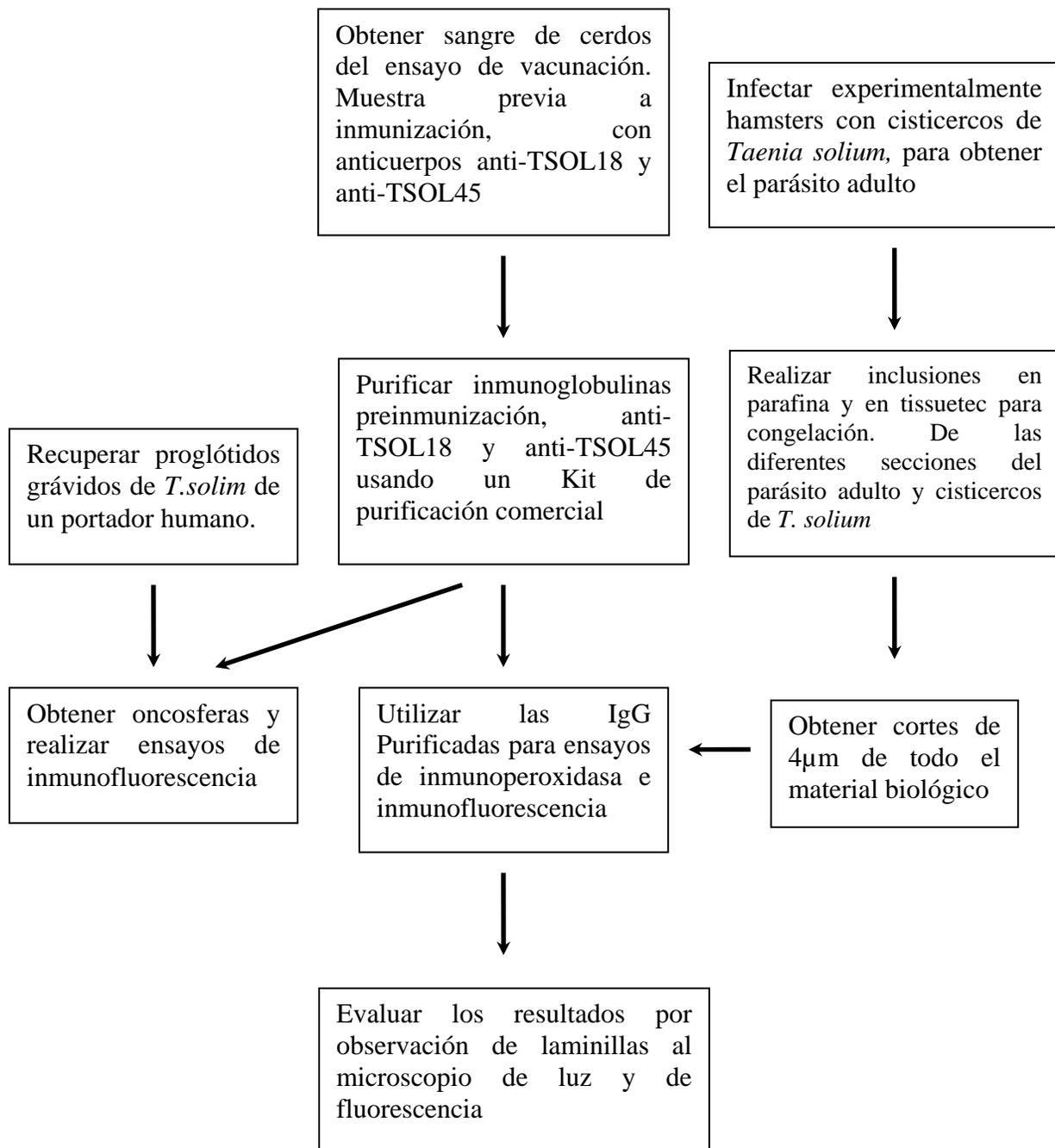
4. OBJETIVO

Identificar la expresión fenotípica de los antígenos protectores TSOL18 y TSOL45 en los tres estadios de desarrollo de *T. solium*.

5. HIPÓTESIS

Si los péptidos recombinantes TSOL18 y TSOL45 fueron obtenidos del estadio de oncosfera, es probable que únicamente se expresen en este estadio y no en el parásito adulto de *T.solium*.

6. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES



7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 Obtención de cisticercos y gusano adulto de *T.solium*

El Bioterio de la Dirección de Investigación del Hospital General “Dr. Manuel Gea González” proporcionó 4 hámsteres hembras de 23 semanas de edad con un peso entre 140g y 200g. Los roedores fueron alojados en una caja de policarbonato con viruta estéril de madera, se les proporcionó alimento comercial para roedores (laboratory rodent diet, PMI, México) y agua a libre acceso. Una semana antes de la infección, los animales se desparasitaron por vía oral con prazicuantel (Cesol, Merk, México) a una dosis de 30mg/kg, albendazol (Vermin-plus Streguer, México) a una dosis de 20mg/kg en dos tomas. Posteriormente se recuperaron cisticercos del músculo esquelético de un cerdo infectado, se lavaron con solución salina 0.15M, fosfatos 0.01M pH = 7.2 SSF (anexo 1) y se administraron por vía oral 3 cisticercos de *T. solium* a cada hámster, seguidamente se les proporcionó 200µl de SSF para facilitar la deglución de los cisticercos. Se dejaron pasar 30 días posteriores a la infección y se recuperaron tenias no grávidas del intestino de los hámsteres (Maravilla et al. 1998, Avila et al. 2006). Las tenias se lavaron con SSF y se observaron al microscopio para verificar el grado de madurez. Posteriormente se cortaron fragmentos de aproximadamente 1cm de longitud, cuidando abarcar escolex, cuello y proglótidos maduros o en proceso de madurez. El material biológico se fijó en SSF-formol al 4% (anexo2) durante dos días a temperatura ambiente.

Algunos cisticercos recuperados del cerdo infectado, se lavaron, cuidando de no romper la vesícula, para mantener la integridad del cisticerco, estos se lavaron SSF. Se fijaron en SSF-formol al 4% durante dos días a temperatura ambiente. También se obtuvieron proglótidos grávidos de *T.solium*, recuperados de un portador humano y se procesaron de la misma forma.

7.2 Obtención de oncosferas

Un proglótido grávido fresco se utilizó para la recuperación de los huevos de *T. solium*, el proglótido se cortó con tijeras en pedazos muy pequeños y se pasó a través de un tamiz con una apertura de malla de 80 micras, una vez liberados los huevos, se centrifugó a 1000rpm para eliminar el detritus de mayor peso que los huevos, posteriormente a la solución de huevos se le agregó hipoclorito de sodio al 0.6% para disgregar los bloques embriofóricos y liberar a las oncosferas, se incubó durante 25min, hasta que se obtuvo un porcentaje de eclosión aproximado del 70%. Las oncosferas se lavaron con SSF por centrifugación 3 veces a 1000rpm 5 minutos.

7.3 Inclusión en parafina y elaboración de cortes histológicos

El material biológico se colocó dentro de cartuchos de inclusión para parafina, se depositaron 3 segmentos del mismo fragmento del parásito en forma longitudinal, es decir 3 de escólex y cuello, 3 de proglótidos inmaduros, 3 de proglótidos maduros, tres cisticercos por cartucho. Después todo el material biológico se deshidrató en tres pases consecutivos en concentraciones crecientes de etanol al 50, 96 y 100% durante 30 minutos cada uno. Se realizaron tres pases durante 30 min cada uno en xilol, para aclarar los tejidos y se embebieron en parafina, previamente fundida, realizando tres pases durante 30-40 min cada uno, para asegurar que se evaporara el xilol y permitir la penetración de la parafina en el tejido. Una vez hechos los tres pases se realizó la inclusión definitiva, adicionando parafina fundida en los cartuchos y dejándola solidificar. Se realizaron cortes longitudinales en microtomo con un grosor de 4 μ m, se depositaron en portaobjetos previamente tratados con una solución de silano al

2% en acetona (anexo3), para evitar el desprendimiento del tejido en los tratamientos posteriores.

7.4 Purificación de inmunoglobulina a partir de los sueros de los cerdos.

Los sueros pre-inmunes e inmunes anti-TSOL18 y anti-TSOL45 se obtuvieron en el protocolo de inmunización del proyecto de vacunación en cisticercosis porcina (Flisser et al. 2004). La purificación de inmunoglobulina (IgG) de cerdo se realizó para sueros pre-inmunes, anti-TSOL18 y anti-TSOL45 con un estuche comercial (Montaje Antibody Purification Prosep-A, Millipore, EUA), que consta de una columna de afinidad de agarosa-proteína-A, amortiguador para lavar la columna y diluir la muestra en SSF, amortiguador de elución de IgG (Glicina-HCl 0.2 M pH 2.5) y amortiguador de neutralización de pH (Tris-HCl 1 M pH 9). El procedimiento se llevó a cabo, según las especificaciones del proveedor, de la siguiente manera: la columna se equilibró con 10ml de amortiguador de fosfatos (AF) pH 7.2 y se centrifugó a 500 x g durante 5 min. El suero se filtró a través de un filtro de 0.22µm para aclarar la muestra y eliminar detritos. Una vez filtrado el suero, se diluyó 1:1 con AF (10ml de suero + 10ml de amortiguador), esta mezcla se colocó dentro de la columna y se centrifugó a 150 x g durante 20 min, la columna se lavó tres veces con 20ml del amortiguador de fosfatos pH 7.2, se centrifugó durante 5 min a 500 x g para eliminar todas las proteínas que no se adsorbieran a la agarosa-proteína-A (proteínas que no fueran IgG). Las IgG adsorbidas a la agarosa-proteína-A se eluyeron de la columna adicionando 10ml del amortiguador de elución (glicina-HCl 0.2 M pH 2.5, centrifugando a 500 x g durante 5 min. Se tuvo especial cuidado de recibir las IgG puras en un tubo con el amortiguador de neutralización (Tris-HCl 1 M pH 9) para evitar su desnaturalización. Una vez obtenidas, las IgG se concentraron hasta aproximadamente de 1mg/ml, se dividieron en alícuotas y se almacenaron a -20°C hasta su uso.

7.5 Inmunoperoxidasa

Los cortes de 4µm de grosor colocados en portaobjetos se desparafinaron en estufa a 60°C, durante 30 minutos, posteriormente se realizaron dos pases en xilol de 10 minutos cada uno para eliminar el exceso de parafina, se sometieron a un proceso de hidratación con dos pases consecutivos en concentraciones decrecientes de etanol 100, 96 y 50%, se lavaron con agua corriente, se sumergieron en una solución de metanol-peróxido de Hidrógeno al 5% (anexo 4) para bloquear las peroxidases endógenas durante 30 min. Los cortes se pasaron rápidamente a etanol al 96% y se lavaron 4 veces con agua destilada. Se permeabilizó el tejido, sumergiendo los cortes en SSF-Triton X-100 al 2% (anexo 5) durante 10 minutos, después se lavaron 3 veces con SSF y se bloquearon los sitios inespecíficos por incubación con SSF-albúmina al 5% (anexo 6) durante 1h a temperatura ambiente en cámara húmeda. Se incubó el anticuerpo pre-inmune, IgG anti-TSOL18 o IgG anti-TSOL45, diluido 1:4000 en SSF-albúmina al 5% durante 1h a temperatura ambiente en cámara húmeda. Se lavó tres veces con SSF-Tween al 0.3% (anexo 7), se adicionó el anticuerpo secundario comercial anti-IgG de cerdo producido en cabra, acoplado a biotina (Santa Cruz, EUA) en dilución 1:200 en SSF durante 1h a temperatura ambiente en cámara húmeda, se lavó de la misma manera y se agregó la extravidina-peroxidasa comercial (Sigma, EUA) a una concentración de 20µg/ml en SSF, se incubó 1h a temperatura ambiente en cámara húmeda, se lavó de la misma manera pero ahora dos veces más con SSF. Finalmente se agregó el sustrato para peroxidasa el tetrahidrocloruro de 3-3-diaminobenzidina 0.6mg/ml en SSF (anexo 8), adicionando 6µl de peróxido de hidrógeno al 30%. Una vez agregada la solución a los cortes, se incubó 15 minutos a temperatura ambiente en cámara húmeda y se lavó 4 veces con agua corriente. Después de la inmunohistoquímica, los cortes se contrastaron con hematoxilina 5 segundos, seguido de 4 pases en agua corriente para eliminar el exceso de colorante, después un pase en agua-amoniaco como fijador, dos pases

más en agua destilada, un pase en xilol para aclarar y finalmente se montaron en resina para observarlos al microscopio óptico.

7.6 Inmunofluorescencia

De las tenias obtenidas del modelo experimental en hámster se cortaron fragmentos de aproximadamente 1cm de longitud, cuidando abarcar escolex, cuello, proglótidos inmaduros y proglótidos maduros. Este material se embebió debidamente alineado en medio para congelación de tejidos (Tissue Freezing Medium, Durham, NC. USA) y se congeló a -20°C para posteriormente realizar cortes en criostato de 4µm de grosor. Una vez que se obtuvieron los cortes, estos se fijaron con metanol y acetona, seguidamente se trataron para la recuperación antigénica con pronasa E al 0.1% en SSF (anexo 9) y se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente, después se lavaron 4 veces con agua destilada. Se permeabilizó el tejido, usando SSF-Triton X-100 al 0.2% en SSF durante 10 minutos, después se lavó 3 veces con SSF-Tween 0.03% y se bloquearon los sitios inespecíficos por incubación con SSF-albúmina al 5% durante 1h a temperatura ambiente en cámara húmeda. Se usaron anti-TSOL18, anti-TSOL45 y como control negativo IgG previas a inmunización, todos en dilución 1:10 en SSF-albúmina al 5%, y se incubaron a 4°C durante toda la noche en cámara húmeda. Posteriormente se lavó tres veces con SSF al 0.03%, se adicionó el anticuerpo secundario comercial anti-IgG de cerdo producido en cabra, acoplado a isotiocianato de fluoresceína (Santa Cruz, EUA) en dilución 1:100 en SSF durante 1h a 37°C en cámara húmeda, después se lavó con SSF y se contratiño con yoduro de propidio. Finalmente las preparaciones se montaron con medio especial para fluorescencia (Vectashield, vector laboratorios Inc. Burlingame, Cal USA) y se cubrieron con un cubreobjetos, sellando la preparación para su posterior observación al microscopio.

Las oncosferas, se fijaron con metanol-acetona, posteriormente se lavaron de la misma manera que las preparaciones de tejido y se sometieron al mismo procedimiento arriba señalado, desde la recuperación antigénica en adelante. Después de la contratinción con yoduro de propidio las oncosferas se dejaron en un volumen aproximado de 200µl y este de este volumen se depositaron varias gotas en portaobjetos, dejando secar las preparaciones al aire, a temperatura ambiente. Posteriormente las preparaciones se montaron de la misma manera que los tejidos.

8. RESULTADOS

8.1 Inmunoperoxidasa

8.1.1 Reconocimiento en escólex y cuello de *T. solium*

La observación de todas las preparaciones se llevó a cabo en un microscopio (Olympus BX 41 USA) y la toma de las fotografías con la cámara Olympus adaptada al mismo microscopio, con los objetivos de 10x, 40x y 100x. En las figuras 8a y 8b se muestra una preparación de escolelex-cuello de *T. solium* recuperada del modelo experimental de hámster, en la que se observa una zona clara delimitada que corresponde al tegumento del parásito, seguida de una zona subtegumentaria delimitada y teñida más intenso, toda la zona interna conforma el parénquima. Un mayor acercamiento de la misma preparación (8c y 8d), permite observar en la zona del escólex, una ventosa, parte del rostelo y los canales excretores longitudinales. Las figuras 8a, 8c corresponden a cortes incubados con IgG anti-TSOL18 y 8b y 8d a cortes revelados con IgG pre-inmunización (testigo). Puede observarse que no hay diferencias entre el testigo y el incubado con las IgG anti-TSOL18, ya que estas no reconocieron ninguna estructura del parásito. En las figuras 9a y 9c se muestran cortes similares a los de la figura 8 pero

Las oncosferas, se fijaron con metanol-acetona, posteriormente se lavaron de la misma manera que las preparaciones de tejido y se sometieron al mismo procedimiento arriba señalado, desde la recuperación antigénica en adelante. Después de la contratinción con yoduro de propidio las oncosferas se dejaron en un volumen aproximado de 200µl y este de este volumen se depositaron varias gotas en portaobjetos, dejando secar las preparaciones al aire, a temperatura ambiente. Posteriormente las preparaciones se montaron de la misma manera que los tejidos.

8. RESULTADOS

8.1 Inmunoperoxidasa

8.1.1 Reconocimiento en escólex y cuello de *T. solium*

La observación de todas las preparaciones se llevó a cabo en un microscopio (Olympus BX 41 USA) y la toma de las fotografías con la cámara Olympus adaptada al mismo microscopio, con los objetivos de 10x, 40x y 100x. En las figuras 8a y 8b se muestra una preparación de escole-x-cuello de *T. solium* recuperada del modelo experimental de hámster, en la que se observa una zona clara delimitada que corresponde al tegumento del parásito, seguida de una zona subtegumentaria delimitada y teñida más intenso, toda la zona interna conforma el parénquima. Un mayor acercamiento de la misma preparación (8c y 8d), permite observar en la zona del escólex, una ventosa, parte del rostelo y los canales excretores longitudinales. Las figuras 8a, 8c corresponden a cortes incubados con IgG anti-TSOL18 y 8b y 8d a cortes revelados con IgG pre-inmunización (testigo). Puede observarse que no hay diferencias entre el testigo y el incubado con las IgG anti-TSOL18, ya que estas no reconocieron ninguna estructura del parásito. En las figuras 9a y 9c se muestran cortes similares a los de la figura 8 pero

revelados con IgG anti-TSOL45. Con estos anticuerpos tampoco se observan diferencias entre el corte incubado con IgG anti TSOL45 (9a y 9c) y el testigo (9b y 9d).

8.1.2 Reconocimiento en proglótidos inmaduros de *T. solium*

En las figuras 10 y 11 se muestran preparaciones de proglótidos inmaduros de *T. solium* recuperada del modelo experimental de hámster, en la que se observan los canales excretores longitudinales y puede apreciarse un conjunto de células teñidas de una coloración más intensa, dispuestas de manera alternada. Este conjunto de células corresponde a los primordios de los órganos sexuales, conducto deferente y vagina, Las figuras 10a y 10c, corresponden a cortes incubados con IgG anti-TSOL18 y las 10a y 10c fueron incubados con anti-TSOL45, mientras que las 10b, 10d, 11b y 11d corresponden a cortes incubados con IgG pre-inmunización testigo. Se puede observar que no hay diferencias de reconocimiento entre los testigos y los cortes incubados con las IgG anti-TSOL18 o anti-TSOL45.

8.1.3 Reconocimiento en proglótidos maduros de *Taenia solium*.

En las figuras 12 y 13 se muestran proglótidos maduros de *T. solium* recuperada del modelo experimental de hámster, en los que se observan los canales excretores longitudinales y se puede apreciar un conjunto de células teñidas de una coloración mas intensa, en la parte central del corte, que corresponden a los túbulos seminíferos o testículos del parásito, también se observa una agrupación de células que se distribuyen hacia uno de los extremos del tejido, que corresponde a los ovarios, así como un cúmulo de células que se proyecta hacia un extremo lateral del tejido, conformando lo que muy probablemente sea el conducto deferente. Las figuras 12a y 12c, corresponden a

cortes incubados con IgG anti-TSOL18 y las 12b y 12d con IgG pre-inmunización. Se puede observar que no hay diferencias de reconocimiento entre el testigo y el corte incubado con IgG anti-TSOL18.

En las figuras 13a y 13c, que fueron reveladas con anti-TSOL45 tampoco hay diferencias entre el testigo y el experimental. Las figuras 13b y 13d muestran cortes incubados con IgG pre-inmunización.

8.1.4 Reconocimiento en cisticercos de *Taenia solium*.

En las figuras 14 y 15 se observan cortes con cisticercos recuperados de un cerdo infectado. Se puede observar el canal espiral, el escólex y las ventosas del parásito, así como los corpúsculos calcáreos que tienden a teñirse de un azul más intenso con la hematoxilina. Las figuras 14a y 14c corresponden a cortes incubados con IgG anti-TSOL18, las 15a y 15c fueron incubadas con anti-TSOL45, mientras que las 14b, 14d, 15b y 15d corresponden a cortes incubados con IgG pre-inmunización (testigo). Se puede observar que no hay diferencias de reconocimiento entre el testigo y el incubado con las IgG anti-TSOL18 o anti-TSOL45.

8.2 Inmunofluorescencia

Cuando se trabajaron por inmunoperoxidasa los cortes parafinados de proglótidos grávidos en donde ya había huevos del parásito los bloques embriofóricos que rodean a la oncosfera ocasionaban que la diaminobencidina se precipitara de manera inespecífica, no obstante el uso de varios bloqueadores y de varias concentraciones, adicionalmente al trabajar con las oncosferas del parásito con inmunoperoxidasa, la diaminobencidina se precipitaba con todo el detritus formando cristales que impedían una adecuada observación. Debido a esto, se decidió cambiar a la inmunofluorescencia.

8. 2. 1 Reconocimiento en oncosferas de *T. solium*

La observación de las preparaciones se llevó a cabo en un microscopio de fluorescencia Nikon (EUA) y la toma de las fotografías con la cámara Nikon adaptada al mismo microscopio.

En las imágenes 16a y 16b se observan oncosferas tratadas con anti-TSOL18 y anti-TSOL45 vistas con contraste de fases y filtro para yoduro de propidio con luz blanca. Pueden observarse los ganchos y la membrana oncosférica bien delimitada.

En las figuras 17a-17c se muestran oncosferas de *T. solium* tratadas con IgG preinmunes y contrateñidas con yoduro de propidio, la primera imagen fue obtenida con el filtro para yoduro de propidio, la segunda con el filtro para isotiocianato de fluoresceína (FITC) y la última corresponde a la co-localización obtenida con los dos filtros. Puede observarse la ausencia de reacción en la oncosfera.

Las figuras 17d-17f corresponden a oncosferas tratadas con IgG anti-TSOL18 contrateñidas con yoduro de propidio, el orden de las imágenes es igual a la de la IgG preinmunes. Es evidente la reacción positiva en la superficie de la oncosfera. Las figuras 17g-17i muestran oncosferas tratadas con anti-TSOL45, contrateñidas con yoduro de propidio y en el mismo orden que las anteriores. Resalta la reacción positiva en la superficie de la oncosfera.

8. 2. 1 Reconocimiento en escólex y cuello de *T. solium*

En las figuras 18, 20 y 22 se muestra una preparación de escólex y cuello de *T. solium* recuperada del modelo experimental de hámster. Las imágenes 18a-18c pertenecen a los cortes tratados con IgG preinmunes y contrateñidas con yoduro de propidio. La primera imagen (18a) se obtuvo con el filtro para contraste de

fases, la segunda con el filtro para el yoduro de propidio (18b) y la tercera para FITC (18c). Puede observarse el rostelo con sus ganchos y las ventosas.

Las cortes de las imágenes 20a-20c fueron tratados con IgG anti-TSOL18 y contrateñidos con yoduro de propidio, el orden de las imágenes corresponde a los mencionados anteriormente. Puede observarse que no hay reacción positiva en ninguna estructura del parásito. Las figuras 22a-22c corresponden a cortes incubados con IgG TSOL-45, contrateñidos con yoduro de propidio en el mismo. Puede observarse la ausencia de reacción, sin diferencias con los cortes tratados con IgG previas a inmunizaciones.

8. 2. 3 Reconocimiento en proglótidos de *T. solium*

En las figuras 19, 21 y 23 se muestran preparaciones de proglótidos inmaduros de *T. solium* recuperada del modelo experimental de hámster, en la que se observan los canales excretores longitudinales y un conjunto de células teñidas de una coloración roja intensa, dispuestas al centro y lo largo del estróbilo, este conjunto de células corresponde a los primordios de los órganos sexuales, conducto deferente y vagina. Las imágenes 19a-19c corresponden a cortes incubados con IgG preinmunes y contrateñidas con yoduro de propidio.

En las imágenes 21a-21c se muestran cortes tratados con IgG anti-TSOL18 y contrateñidos con yoduro de propidio. El orden de las imágenes es el mismo. Puede observarse que no hay reacción positiva y no hay diferencias con las incubadas con IgG preinmunes. Las figuras 23a-23c corresponden a cortes incubados con IgG anti-TSOL-45, contrateñidos con yoduro de propidio, en el mismo orden que las anteriores. Puede observarse la ausencia de reacción, sin diferencias con los cortes tratados con IgG preinmunes.

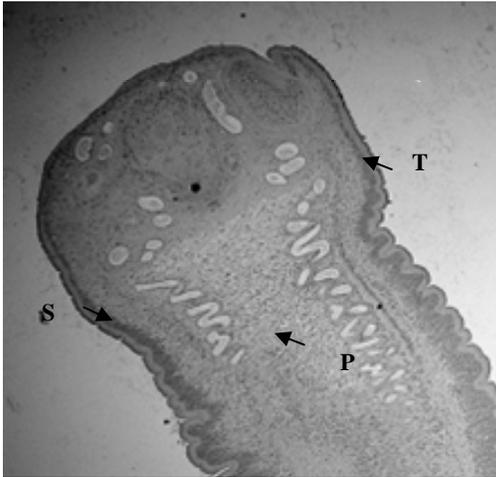


Fig 8a. Corte de escólex-cuello de *T.solium* revelado con IgG anti-TSOL18, contrateñida con hematoxilina. Se observa: T tegumento, S Subtegumento y P parenquima. Aumento 20x

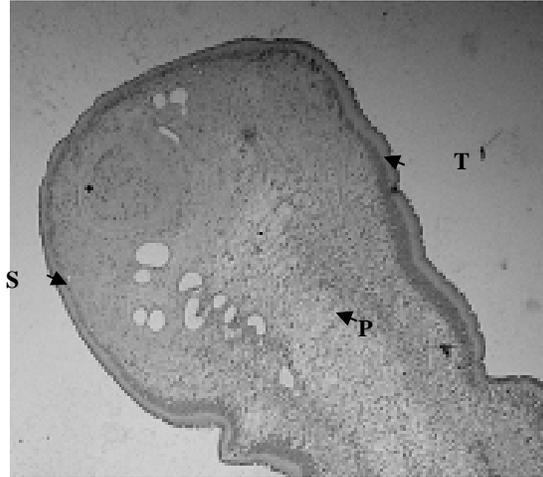


Fig 8b. Corte de escólex-cuello de *T.solium* revelado con IgG-preinmunes, contrateñida con hematoxilina. Se observa: T tegumento, S Subtegumento y P parenquima. Aumento 20x

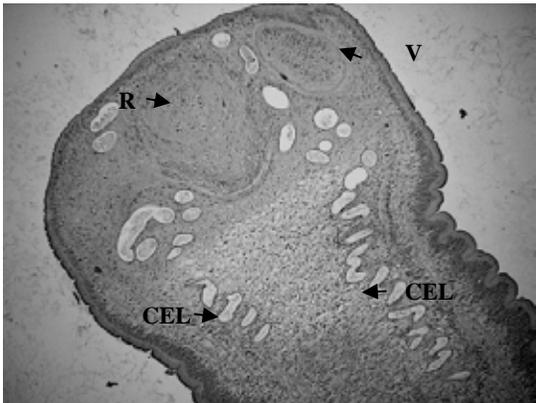


Fig 8c. Corte de escólex de *T.solium* revelada con anti-TSOL18, contrateñida con hematoxilina. Se observa: V ventosa, R roseto y CEL canales excretorios longitudinales. Aumento 20x

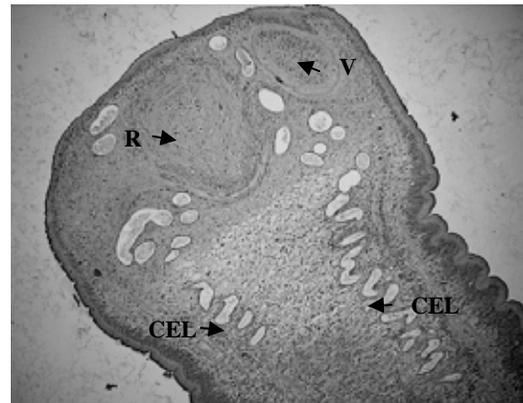


Fig 8d. Corte de escólex de *T.solium* revelada con IgG-pre-inmunización, contrateñida con hematoxilina. Se observa: V ventosa, R roseto y CEL canales excretorios longitudinales. Aumento 20x

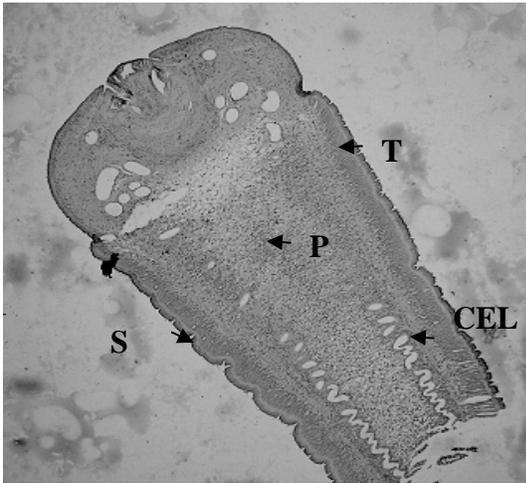


Fig 9a. Corte de escólex-cuello de *T.solium* revelado con IgGs anti-TSOL45, contrateñido con hematoxilina. Se observa: T tegumento, S Subtegumento, P parenquima y CEL canales excretores longitudinales. Aumento 10x

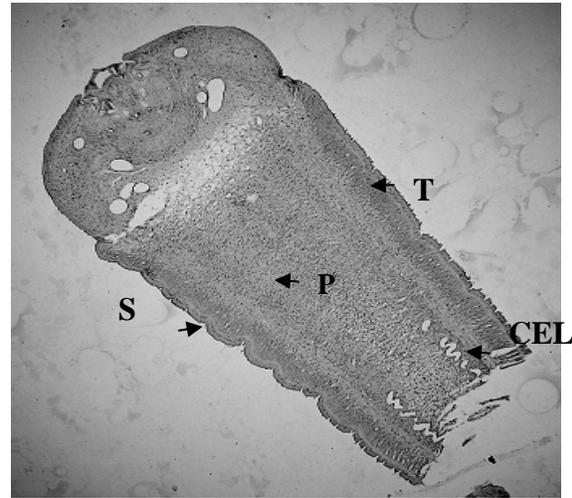


Fig 9b. Corte de escólex-cuello de *T.solium* revelado con IgGs pre-inmunes, contrateñido con hematoxilina. Se observa: T tegumento, S Subtegumento, P parenquima y CEL canales excretores longitudinales. Aumento 10x

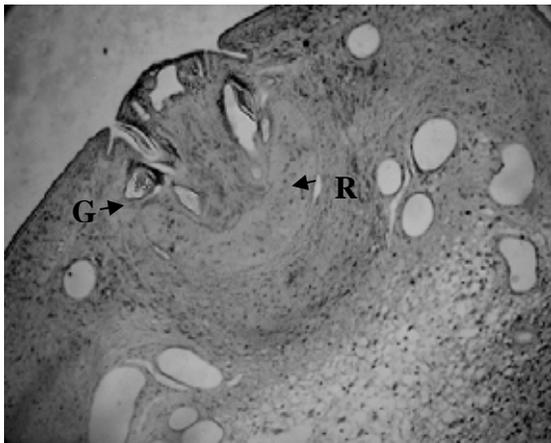


Fig 9c. Corte de escólex de *T.solium* revelado con IgGs anti-TSOL45, contrateñida con hematoxilina. Se observa: G ganchos y R rostelo. Aumento 40x

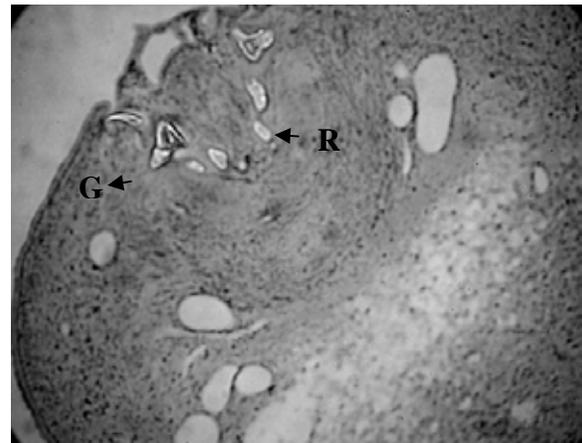


Fig 9d. Corte de escólex de *T.solium* revelado con IgGs pre-inmunes, contrateñida con hematoxilina. Se observa: G ganchos y R rostelo. Aumento 40x

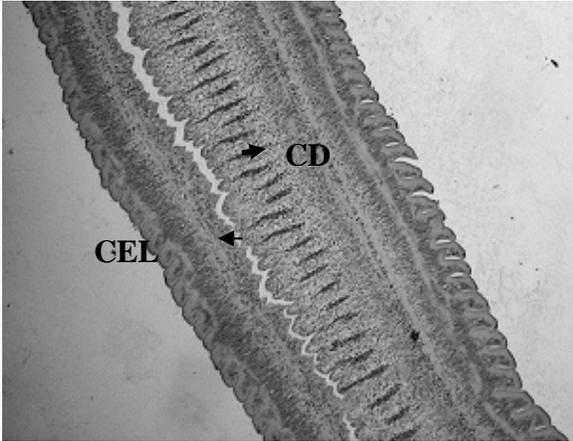


Fig 10a. Corte de proglótidos inmaduros de *T.solium* revelado con IgGs anti-TSOL18, contrateñida con hematoxilina. Se observa: CEL canal excretor longitudinal y CD conducto deferente. Aumento 10x

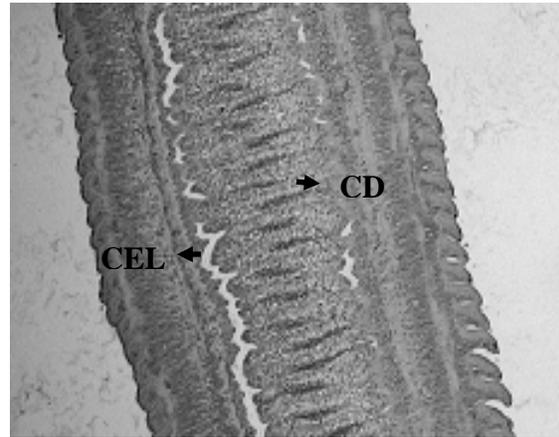


Fig 10b. Corte de proglótidos inmaduros de *T.solium* revelado con IgGs pre-inmunes, contrateñida con hematoxilina. Se observa: CEL canal excretor longitudinal y CD conducto deferente. Aumento 10x

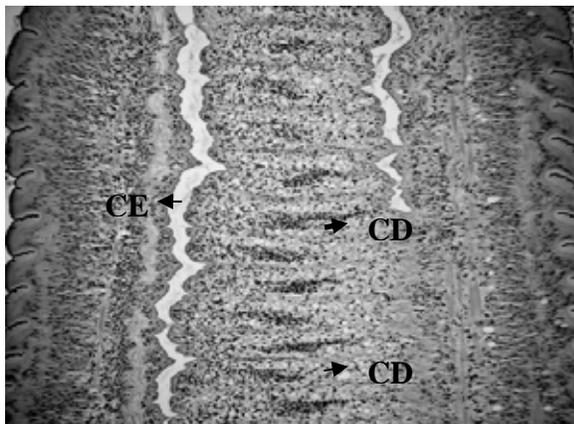


Fig 10c. Corte de proglótidos inmaduros de *T.solium* revelado con IgGs anti-TSOL18, contrateñida con hematoxilina. Se observa: CEL canal excretor longitudinal y CD conducto deferente. Aumento 40x

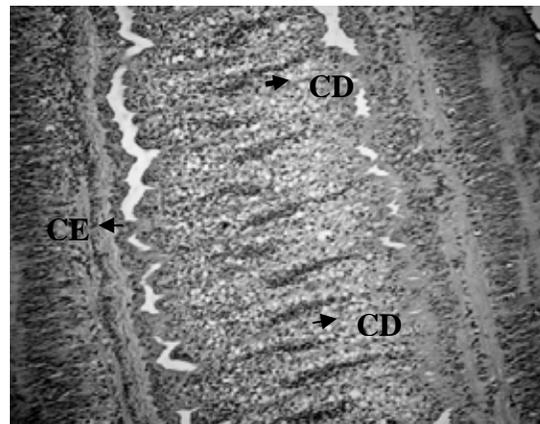


Fig 10d. Corte de proglótidos inmaduros de *T.solium* revelado con IgGs pre-inmunes, contrateñida con hematoxilina. Se observa: CEL canal excretor longitudinal y CD conducto deferente. Aumento 40x

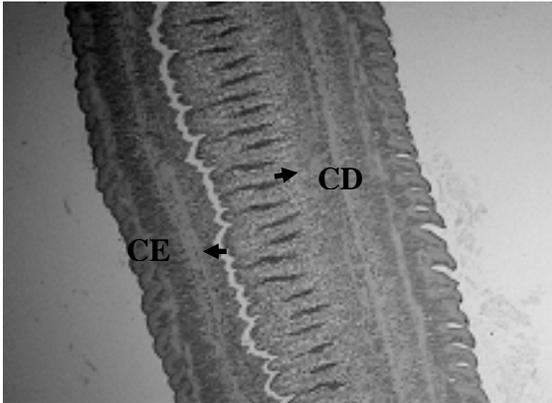


Fig 11a. Corte de proglótidos inmaduros de *T.solium* revelado con IgGs anti-TSOL45, contrateñida con hematoxilina. Se observa: CEL canal excretor longitudinal y CD conducto deferente. Aumento 10x

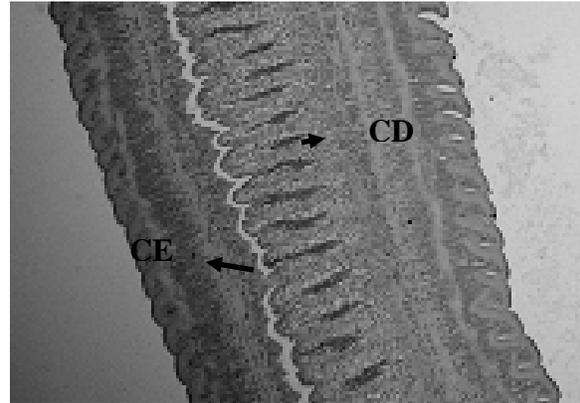


Fig 11b. Corte de proglótidos inmaduros de *T.solium* revelado con IgGs pre-inmunes, contrateñida con hematoxilina. Se observa: CEL canal excretor longitudinal y CD conducto deferente. Aumento 10x

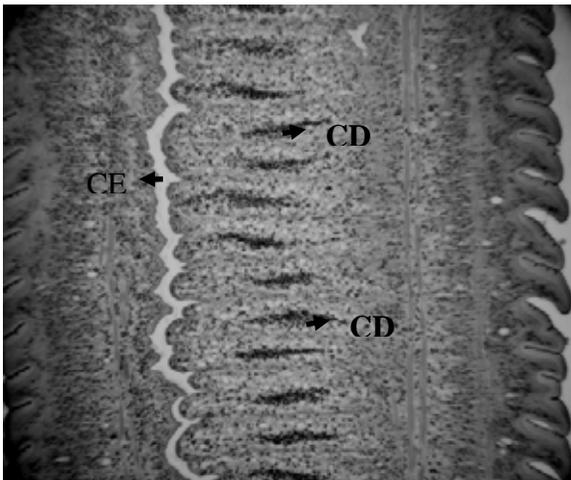


Fig 11c. Corte de proglótidos inmaduros de *T.solium* revelado con IgGs anti-TSOL45, contrateñida con hematoxilina. Se observa: CEL canal excretor longitudinal y CD conducto deferente. Aumento 40x

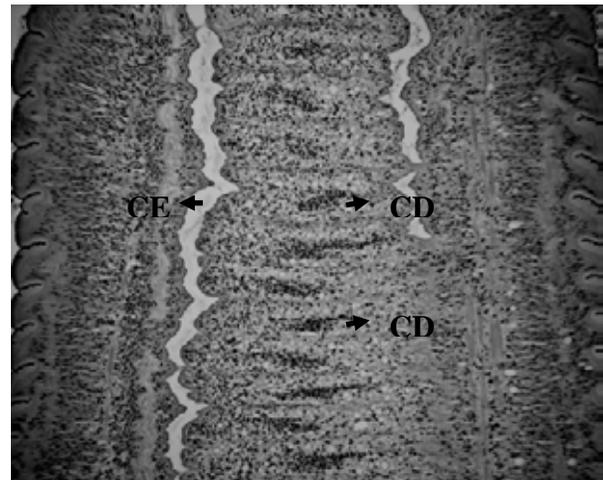


Fig 11d. Corte de proglótidos inmaduros de *T.solium* revelado con IgGs pre-inmunes, contrateñida con hematoxilina. Se observa: CEL canal excretor longitudinal y CD conducto deferente. Aumento 40x

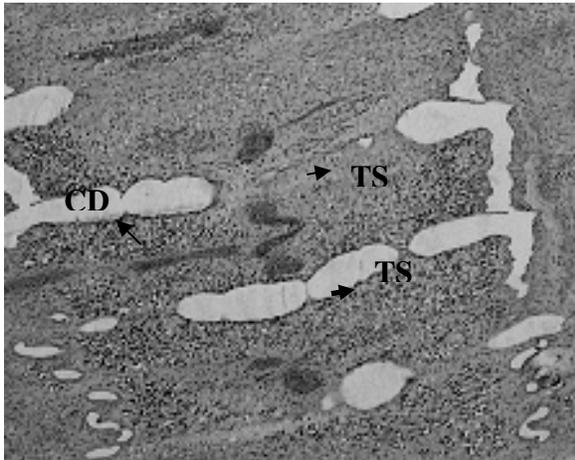


Fig 12a. Corte de proglótidos maduros de *T.solium* revelado con IgGs anti-TSOL18, contrateñida con hematoxilina. Se observa: TS túbulos seminíferos, CD conducto deferente. Aumento 20x

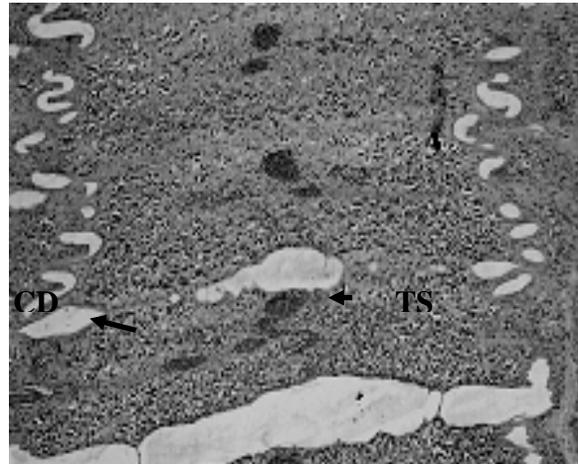


Fig 12b. Corte de proglótidos maduros de *T.solium* revelado con IgGs pre-inmunes, contrateñida con hematoxilina. Se observa: TS túbulos seminíferos, CD conducto deferente. Aumento 20x

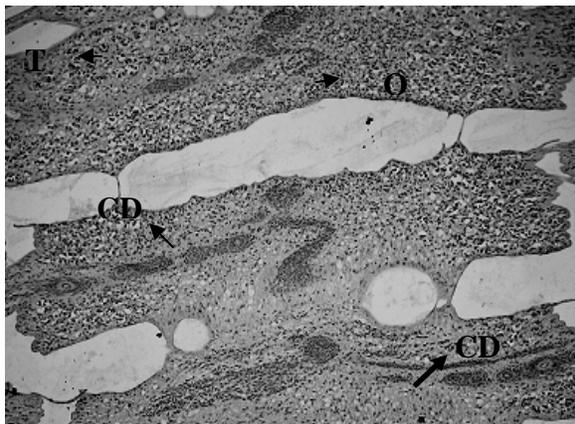


Fig 12c. Corte de proglótidos maduros de *T.solium* revelado con IgGs anti-TSOL18, contrateñida con hematoxilina. Se observa: TS túbulos seminíferos, CD conducto deferente y O varios. Aumento 40x

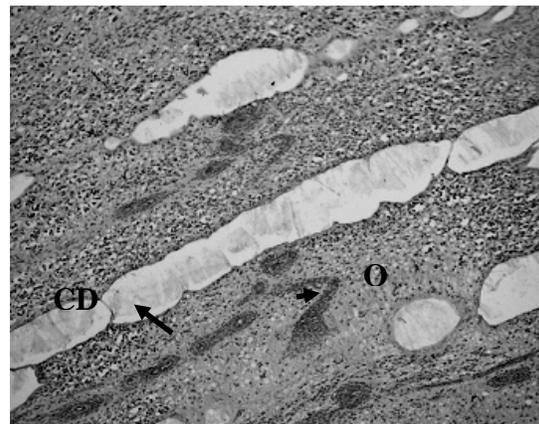


Fig 12d. Corte de proglótidos maduros de *T.solium* revelado con IgGs pre-inmunes, contrateñida con hematoxilina. Se observa: TS túbulos seminíferos, CD conducto deferente y ovarios. Aumento 40x

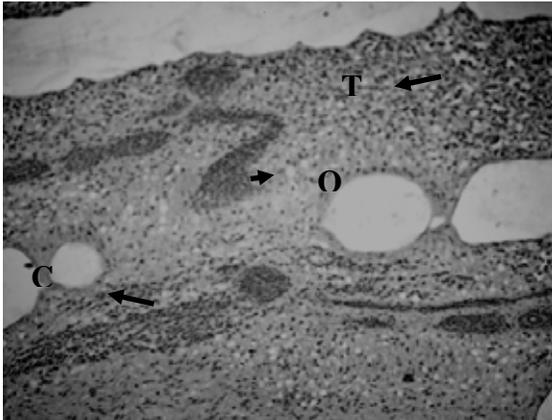


Fig 13a. Corte de proglótidos maduros de *T.solium* revelado con IgGs anti-TSOL45, contrateñida con hematoxilina. Se observa: TS túbulos seminíferos, CD conducto deferente y O ovarios. Aumento 40x

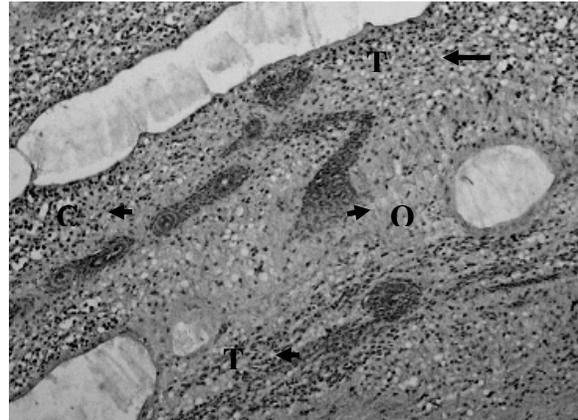


Fig 13b. Corte de proglótidos maduros de *T.solium* revelado con IgGs pre-inmunes, contrateñida con hematoxilina. Se observa: TS túbulos seminíferos, CD conducto deferente y O ovarios. Aumento 40x

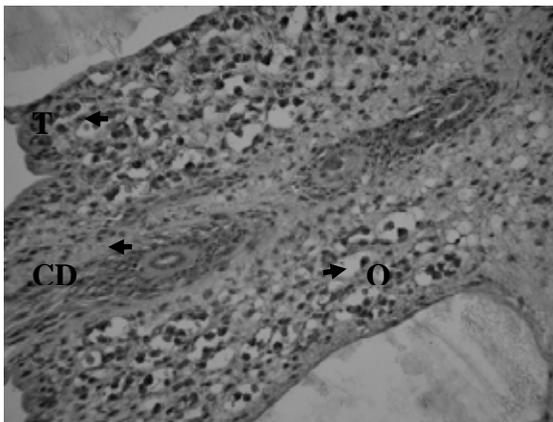


Fig 13c. Corte de proglótidos maduros de *T.solium* revelado con IgGs anti-TSOL45, contrateñida con hematoxilina. Se observa: TS túbulos seminíferos, CD conducto deferente y O ovarios. Aumento 40x

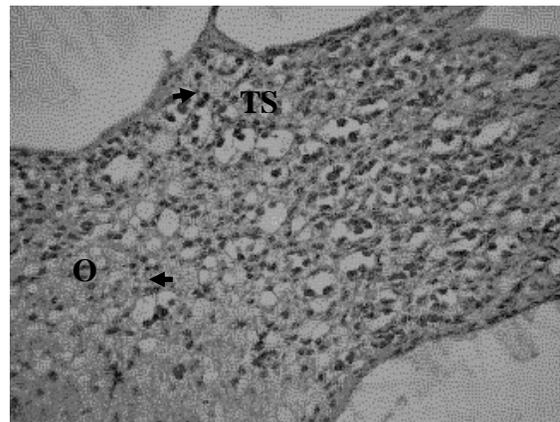


Fig 13d. Corte de proglótidos maduros de *T.solium* revelado con IgGs preinmunes, contrateñida con hematoxilina. Se observa: TS túbulos seminíferos y O ovarios. Aumento 40x

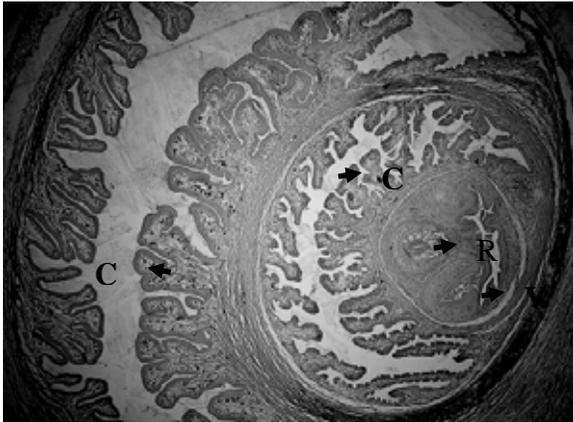


Fig 14a. Corte de cisticercos de *T.solium* revelado con IgGs anti-TSOL18, contrateñido con hematoxilina. Se observa: CE canal espiral, R rostellum, V ventosas y CC corpúsculos calcáreos. Aumento 10x

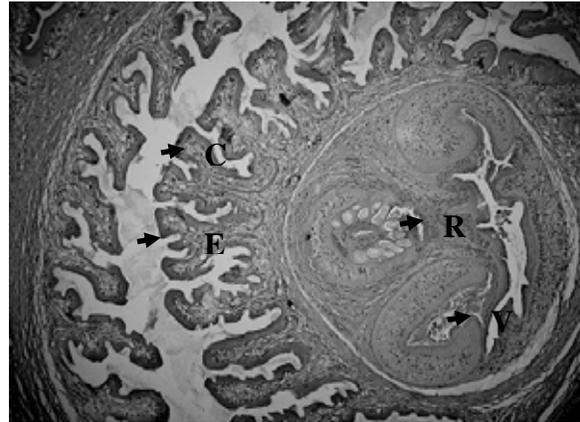


Fig 14b. Corte de cisticercos de *T.solium* revelado con IgGs pre-inmunes, contrateñido con hematoxilina. Se observa: CE canal espiral, R rostellum y V ventosas. Aumento 10x

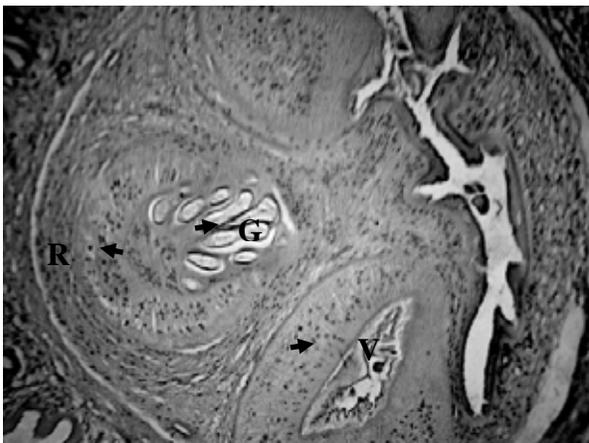


Fig 14c. Corte de cisticercos de *T.solium* revelado con IgGs anti-TSOL18, contrateñido con hematoxilina. Se observa: G Ganchos, R rostellum y V ventosas. Aumento 20x

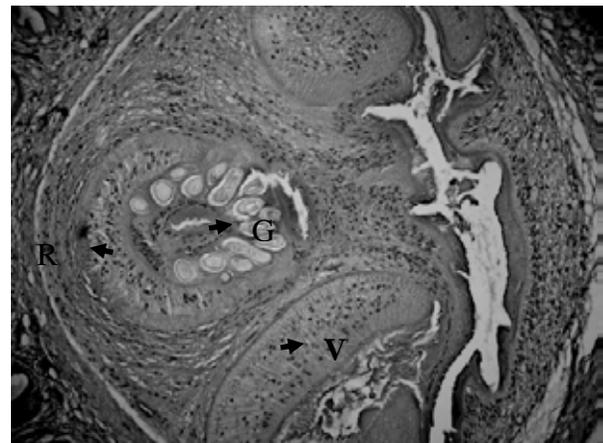


Fig 14d. Corte de cisticercos de *T.solium* revelado con IgGs pre-inmunes, contrateñido con hematoxilina. Se observa: G ganchos, R rostellum y V ventosas. Aumento 20x

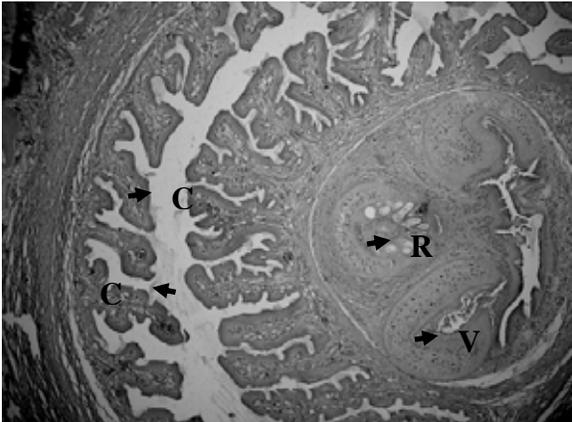


Fig 15a. Corte de cisticercos de *T.solium* revelado con IgGs anti-TSOL45, contrateñido con hematoxilina. Se observa: CC corpúsculos calcáreos, CE canal espiral, R rostelo y V ventosas. Aumento 10x

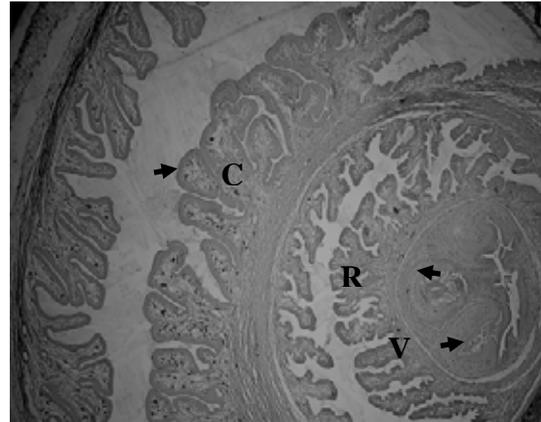


Fig 15b. Corte de cisticercos de *T.solium* revelado con IgGs pre-inmunes, contrateñido con hematoxilina. Se observa: CC corpúsculos calcáreos, CE canal espiral, R rostelo y V ventosas. Aumento 10x

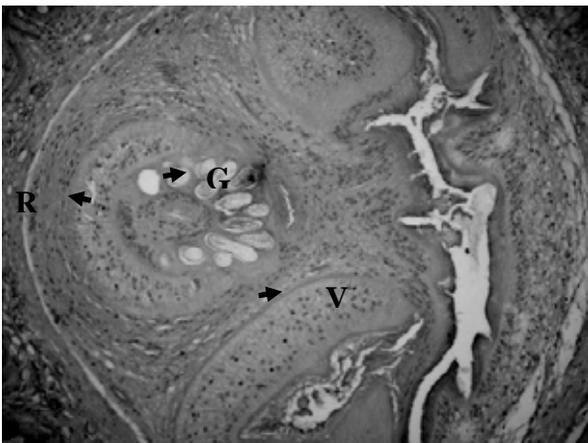


Fig 15c. Corte de cisticercos de *T.solium* revelado con IgGs anti-TSOL45, contrateñido con hematoxilina. Se observa: G ganchos, R rostelo y V ventosas. Aumento 20x

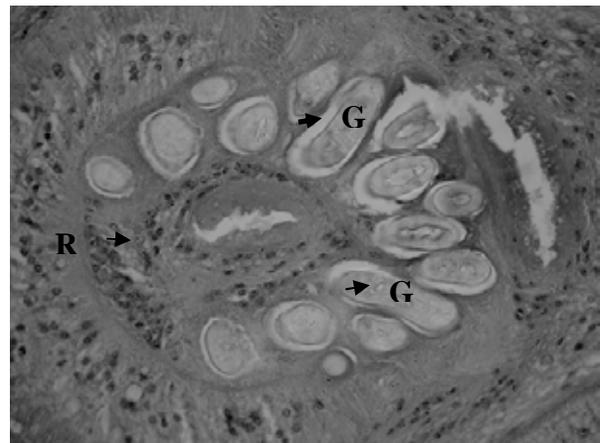


Fig 15d. Corte de cisticercos de *T.solium* revelado con IgGs pre-inmunes, contrateñido con hematoxilina. Se observa: G ganchos y R rostelo. Aumento 40x

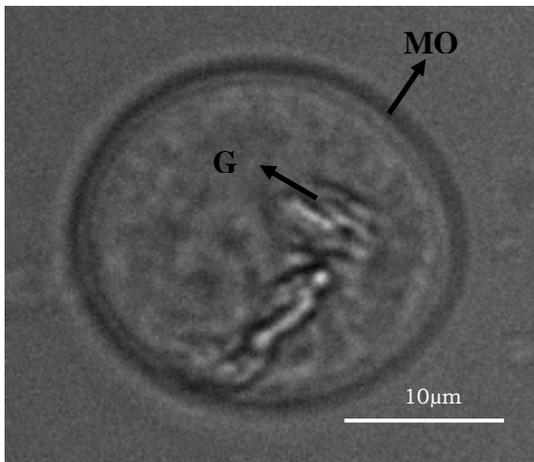


Fig 16a. Oncosfera de *T.solium* tratada con anti-TSOL18 observada con contraste de fases donde se observan los ganchos G y membrana oncosferal MO

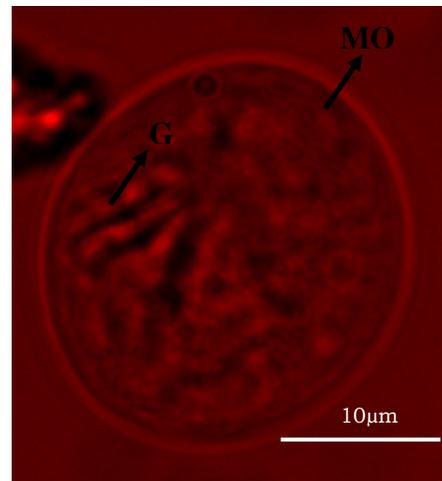


Fig 16b. Oncosfera de *T.solium* tratada con anti-TSOL45 observada con contraste de fases y filtro para yoduro de propidio donde se observan los ganchos G y membrana oncosferal MO

Reacción con IgG preinmunes

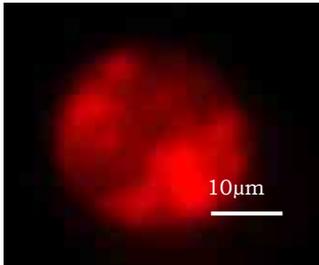


Fig 16a Oncosfera de *T.solium*. Filtro para yodo de propidio

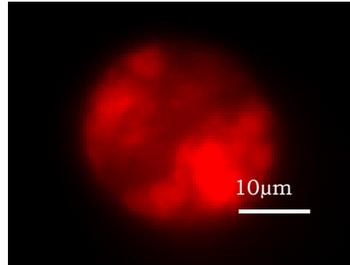


Fig 16b. Oncosfera de *T.solium*. Filtro para FITC

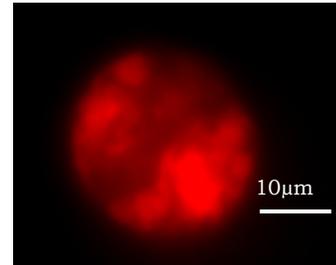


Fig 16c. Oncosfera de *T.solium*. Co-localización

Reacción con IgG anti-TSOL18

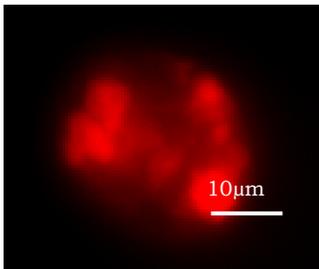


Fig 16d Oncosfera de *T.solium*. Filtro para yodo de propidio

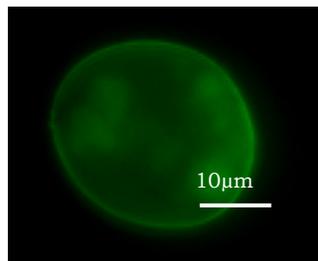


Fig. 16e Oncosfera de *T.solium*. Filtro para FITC

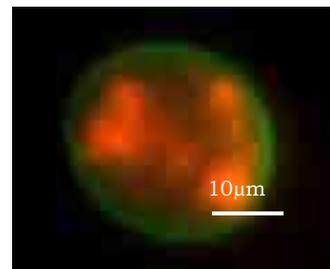


Fig 16f. Oncosfera de *T.solium*. Co-localización

Reacción con IgG anti-TSOL45

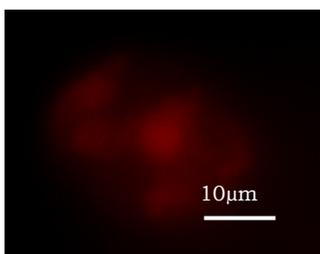


Fig 16g. Oncosfera de *T.solium*. Filtro para yodo de propidio

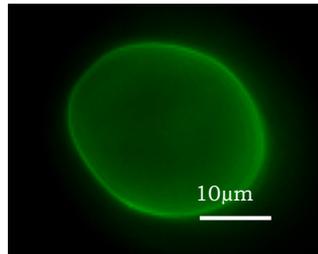


Fig 16h. Oncosfera de *T.solium*. Filtro para FITC

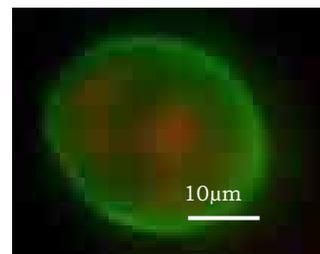


Fig 16i. Oncosfera de *T.solium*. Co-localización

RESULTADOS, IMAGENES



Fig 18. Escolex y cuello de *T.solium* revelados con IgG preinmunes. Filtros contraste de fases (a), Ioduro de propidio (b) e Isotiocianato de fluoresceína (c). Aumento 10x



Fig 19. Proglótidos de *T.solium* revelados con IgG preinmunes. Filtros contraste de fases (a), Ioduro de propidio (b) e Isotiocianato de fluoresceína (c). Aumento 10x



Fig 20. Escolex y cuello de *T.solium* revelados con IgG anti-TSOL18. Filtros contraste de fases (a), Ioduro de propidio (b) e Isotiocianato de fluoresceína (c). Aumento 10x

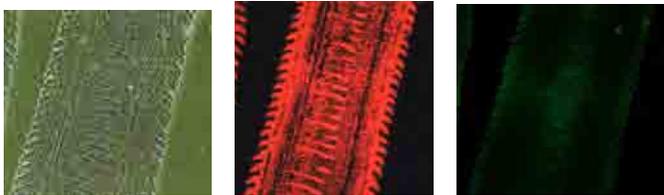


Fig 21. Proglótidos de *T.solium* revelados con IgG anti-TSOL18. Filtros contraste de fases (a), Ioduro de propidio (b) e Isotiocianato de fluoresceína (c). Aumento 10x



Fig 22. Escolex y cuello de *T.solium* revelados con IgG anti-TSOL45. Filtros contraste de fases (a), Ioduro de propidio (b) e Isotiocianato de fluoresceína (c). Aumento 10x

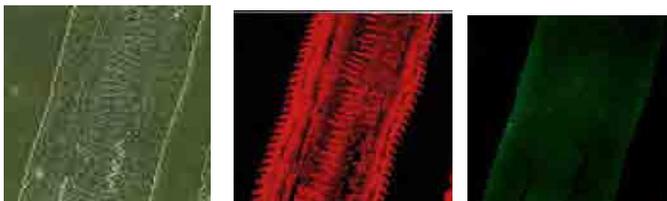


Fig 23. Proglótidos de *T.solium* revelados con IgG anti-TSOL45. Filtros contraste de fases (a), Ioduro de propidio (b) e Isotiocianato de fluoresceína (c). Aumento 10x

8.3 Resumen de resultados

En los cuadros 2 y 3 se resumen los resultados de la inmunoperoxidasa y la inmunofluorescencia de *T. solium* con las IgG anti-TSOL18 y anti-TSOL45. Puede observarse el número de ensayos realizados, número de cortes usados. Los péptidos TSOL 18 y el TSOL45 se localizan únicamente en la superficie de la oncosfera y no se encuentran en ningún otro estadio del parásito, lo que indica que son antígenos estadio-específico.

Cuadro 2. Inmunoperoxidasa de *Taenia solium*

	No de ensayos	No de cortes por ensayo	Reconocimiento anti-TSOL18	Reconocimiento anti-TSOL45
Escólex	5	6	Negativo	Negativo
Cuello	5	6	Negativo	Negativo
Proglótidos inmaduros	5	6	Negativo	Negativo
Proglótidos maduros	5	6	Negativo	Negativo
Cisticercos	5	6	Negativo	Negativo

Cuadro 3. Inmunofluorescencia de *Taenia solium*

	No de ensayos	No de cortes por ensayo o de oncosferas	Reconocimiento anti-TSOL18	Reconocimiento anti-TSOL45
Escólex	5	6	Negativo	Negativo
Cuello	5	6	Negativo	Negativo
Proglótidos inmaduros	5	6	Negativo	Negativo
Proglótidos maduros	5	6	Negativo	Negativo
Oncosferas	3	500	POSITIVO	POSITIVO
Cisticercos	5	6	Negativo	Negativo

9. DISCUSIÓN

La cisticercosis ocasionada por *T. solium* es una causa de enfermedad neurológica importante en muchos países de América Latina, Asia y África. Recientemente ha sido descrita como una enfermedad emergente en países desarrollados, a causa de la migración de personas procedentes de áreas en las que la enfermedad es endémica (Flisser et al. 2006). La interrupción de la transmisión de *Taenia solium* requiere de medidas combinadas incluyendo la vacunación de cerdos (Flisser y Lightowlers, 2001). Se han propuesto varias estrategias para el desarrollo de una vacuna para evitar la cisticercosis porcina, que van desde el uso de extractos crudos de antígenos parasitarios (Molinari et al. 1997) hasta péptidos recombinantes (Plancarte et al. 1999). Inicialmente se desarrollaron vacunas exitosas en contra de la cisticercosis debida a *Taenia ovis* (Johnson et al. 1989; Harrison et al. 1996) que causan infecciones en ovinos. Estas vacunas utilizan antígenos de la oncosfera, clonados a partir de cDNA y expresados en *Escherichia coli*. El grupo del Dr. Lightowlers de la Universidad de Melbourne en Australia, identificó genes de *Taenia solium* homólogos a los de *Taenia ovis* que codifican para antígenos protectores (Gauci et al. 2001, Gauci y Lightowlers 2003) llamados TSOL18 y TSOL45.

En 2004 publicamos los resultados de los ensayos de vacunación en cerdos con TSOL18 y TSOL45, se obtuvo un porcentaje de protección contra el establecimiento de cisticercos del 99% y 97% respectivamente. Estos porcentajes de protección son los más altos obtenidos para vacunación en cisticercosis porcina (Flisser et al. 2004). Al final del proceso de inmunización de los cerdos obtuvimos sangre, separamos los sueros y los almacenamos a -70 C para usar posteriormente. En la presente tesis se purificaron IgG de los sueros y se usaron en inmunoperoxidasa e inmunofluorescencia con el objeto de inmunolocalizar a los péptidos TSOL18 y TSOL45 en los estadios de desarrollo de *T. solium*.

Inicialmente se había planeado realizar únicamente inmunoperoxidasa, usando cortes parafinados de tejido de los tres estadios de desarrollo del parásito: huevo, cisticercos y gusano adulto, pero cuando se trabajaron los cortes de proglótidos grávidos, que ya contenían huevos del parásito, la diaminobencidina se precipitaba de manera inespecífica en los bloques embriofóricos, que rodean a la oncosfera. Estos bloques están unidos por una proteína cementante, lo que le confiere al huevo resistencia a las condiciones ambientales, una vez que este se encuentra fuera del proglótido. Esto hace que tengan una superficie muy adherente y ocasione que cualquier molécula se aglutine de manera inespecífica. Por esta razón se decidió cambiar a inmunofluorescencia, evaluando de nueva cuenta todo el parásito, no obstante los bloques embriofóricos poseen una alta autofluorescencia (Toledo et al. 1999), por ello se decidió trabajar con oncosferas del parásito, disgregando los bloques embriofóricos, eliminando así la interferencia y los problemas ocasionados por su presencia, de cualquier manera se sabía que TSOL18 y TSOL45 eran expresados en la oncosfera, pero no su localización precisa (Gauci et al. 2001, Gauci et al. 2003).

Los resultados de la inmunofluorescencia indirecta mostraron que los péptidos TSOL18 y TSOL45 se encuentran localizados en la superficie de la oncosfera y no reconocieron ninguna otra estructura en la cisticerco o el adulto de *T. solium*. Este hallazgo resalta aún más la importancia de la vacunación con estos péptidos estadio-específicos ya que el mecanismo de la inducción en la protección que producen (mayor del 90%), mediada por anticuerpos vía complemento está impidiendo que las oncosferas se establezcan y puedan progresar hasta cisticerco (Kingdom y col 2006), a diferencia de otras vacunas experimentales donde se ha observado que las oncosferas si se establecen hasta formar cisticerco, donde el principal mecanismo es de respuesta celular, aunque tienen un menor porcentaje de protección (Molinari JL 1997, Toledo A et al 1999).

Otra proteína relacionada con la oncosfera de *T. solium* que ha sido caracterizada recientemente es la llamada Tso31, la cual tiene 40% de identidad en aminoácidos con TSOL45 y 45W de *T. ovis*. Esta proteína también fue localizada en la superficie de la oncosfera, sin embargo su nivel de protección en vacunación contra cisticercosis porcina es inferior al porcentaje de TSOL18 y TSOL45 (Mayta et al. 2007).

La comparación entre secuencias de aminoácidos de varios grupos de proteínas oncosferales que producen altos grados de protección en vacunación, entre las que se encuentran las de *T. solium* y *T. ovis*, muestran un motivo conservado de fibronectina tipo III (FnIII), que fue inicialmente descrito por Bork y Doolittle (1993). El dominio FnIII es uno de los motivos más comunes en las proteínas modulares de animales y también se ha encontrado en proteínas de otros céstodos, plantas, levaduras y bacterias. Las proteínas que poseen este dominio son en su mayoría proteínas extracelulares, transmembranales o comúnmente llamadas proteínas ancladas en membrana (GPI), que participan en la comunicación célula-célula, receptores celulares para tirosin cinasas y receptores de citocinas. Sin embargo la TSOL18 y otras proteínas homologas como la EG95 y TSA18 tienen una sola copia de este dominio, mientras que en TSOL45 el splicing alternativo puede producir proteínas con 0, 1 ó 2 dominios de FnIII (Gauci y Lightowlers 2001).

El hecho de que TSOL18 y TSOL45 se expresen únicamente en el estadio de oncosfera y de manera particular en la superficie, concuerda con la alta protección en cisticercosis porcina inducida a través de la inmunización con estos péptidos, adicionalmente Kingdom y col (2006), demostraron recientemente en ensayos *in Vitro* la capacidad de los anticuerpos específicos para destruir oncosferas de *T. solium*. Este estudio demuestra que los anticuerpos específicos contra la oncosfera son el principal mecanismo en la protección de la vacuna en cisticercosis porcina (Kingdom et al. 2006). Así mismo Gauci y col (2006) demostraron por medio de RT-PCR y Southern blot

que TSOL18 se expresa únicamente en el estadio de oncosfera, adicionalmente en esta tesis se demuestra que también TSOL45 se está expresando únicamente en la oncosfera confirmando que TSOL18 y TSOL45 son antígenos estadio-específicos y por esta razón son el blanco ideal en la vacunación contra cisticercosis porcina.

10. ANEXOS

Anexo 1. Solución salina fosfatos SSF

Solución A

- Fosfato de sodio monobásico monohidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 + \text{H}_2\text{O}$) 0.01 M.....1.38 g.
- Cloruro de sodio (NaCl) 0.15 M.....8.77 g.

Aforar a 1L con agua destilada.

Solución B

- Fosfato de sodio dibásico dodecahidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 + 12\text{H}_2\text{O}$) 0.01 M.....4.30 g
- Cloruro de sodio (NaCl) 0.15 M.....10.52 g.

Aforar a 1.2 L con agua destilada.

Combinar la solución A con la B ajustar pH= 7.2 y esterilizar.

Anexo 2. SSF-formol al 4%

- Tomar 60ml de SSF, agregar 4ml de formol y aforar a 100ml.

Anexo 3. Silano al 2% en acetona

- Tomar 60ml de acetona, agregar 2ml de silano y aforar a 100ml con acetona.

- Persulfato de amonio al 10%, pesar 0.250g, aforar a 2.5ml y filtrar por membrana de 0.22 μ m.

Anexo 4. Metanol-peroxido de Hidrógeno al 5%

- Tomar 60ml de metanol, agregar 5ml de peroxido y aforar a 100ml

Anexo 5. SSF-Triton X-100 al 0.2%

- Tomar 60ml de SSF, agregar 0.2ml de triton X-100 y aforar a 100ml

Anexo 6. SSF-albúmina al 5%

- Tomar 60ml de SSF, agregar 5g de albúmina serica bovina, aforar a 100ml con SSF y filtrar con membrana de 0.22 μ m

Anexo 7. SSF-Tween al 0.3%

- Tomar 60ml de SSF, agregar 0.3ml de tween 20 y aforar a 100ml con SSF

Anexo 8. Tetrahidrocloruro de 3-3-diaminobenzidina (DAB) 0.6mg/ml en SSF

Solución stock

- Pesar 0.6g de DAB, disolver en 10ml de SSF y filtrar por membrana de 0.22 μ m

Solución de trabajo

- Tomar 2ml de SSF, adicionar 240 μ L de solución stock DAB, agregar 20 μ L de peróxido de hidrógeno y filtrar por membrana de 0.22 μ m

Anexo 9. Pronasa E al 0.1% en SSF

- Pesar 0.1g de pronasa E, aforar a 100ml con SSF y filtrar por membrana de 0.22 μ m

11. BIBLIOGRAFÍA

- Avila G, Teran N, Aguilar-Vega L, Maravilla P, Mata-Miranda P, Flisser A. Laboratory animal models for human *Taenia solium*. *Parasitol Int.* 2006; 55 Suppl: S99-S103.
- Berman JD, Beaver PC, Cheever AW, Quindlen EA. Cysticercus of 60-milliter volume in human brain. *Am J Trop Med Hyg.* 1981; 30: 616-619.
- Bork P and Doolittle RF. Fibronectin type III modules in the receptor phosphatase CD45 and tapeworm antigens. 1993. *Protein Sci*; 2 : 1185-1187.
- Cornford EM, Cornford ME, Wright EM, Bruckner DA, Sampogna S, Hirayama BA. Human cerebral cysticercosis: immunolocalization of a sodium-dependent glucose cotransporter (SGLT) in larval and adult tapeworms. *J Parasitol.* 2001; 87:510-521.
- Fleury A, Morales J, Bobes RJ, et al. An epidemiological study of familial neurocysticercosis in an endemic Mexican community. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2006; Jun:100:551-558.
- Flisser A, Gauci CG, Zoli A, et al. Induction of Protection against Porcine Cysticercosis by Vaccination with Recombinant Oncosphere Antigens. *Infec Immun* 2004; 72: 5292-5297.

- Flisser A, Lightowers MW. Vaccination against *Taenia solium* cysticercosis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2001; 96: 353-356.
- Flisser A, Plancarte A, Avila G. Application of diagnosis methods for cysticercosis and taeniosis to epidemiological studies. In Garcia H, Martinez M. *Tenia solium: Taeniasis/Cisticercosis*. Edit Universo, Lima, Perú. 1999:39-50.
- Flisser A, Sarti E, Lightowers M, Schantz P. Neurocysticercosis: regional status, epidemiology, impact and control measures in the Americas. *Acta Trop*. 2003; 87: 43-51.
- Flisser A, Vargas P, Laclette JP. *Taenia solium*: Un parásito cosmopolita. *Inv y Ciencia*. 2006. Mayo: 24-33.
- Flisser A, Vazquez-Mendoza A, Martinez-Ocana J, Gomez-Colin E, Leyva RS, Medina-Santillan R. Short report: evaluation of a self-detection tool for tapeworm carriers for use in public health. *Am J Trop Med Hyg*. 2005; 72: 510-512.
- Flisser A. Epidemiological studies of taeniosis in Latin America. In: Craig P, Pawlowski Z. (Eds). *Cestote Zoonoses: Echinococcosis and Cisticercosis, an Emergent and Global Problem*, 341. IOS Press, Nato Science Series. Amsterdam. 2002:3-11.
- Flisser A. Neurocysticercosis and epilepsy in developing countries. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2001; 70: 707-708.

- Garcia HH, Gilman RH, Gonzalez AE, et al. Epidemiología de la cisticercosis en Perú. En García HH, Martínez SM. Eds Teniasis/cisticercosis por *T. solium*. Editorial Universo SA, Lima, Perú. 1996: 313-326.
- Gauci CG and Lightowlers MW. Alternative splicing and sequence diversity of transcripts from the oncosphere stage of *Taenia solium* with homology to the 45w antigen of *Taenia ovis*. Mol Biol Parasitol. 2001; 12: 173-181.
- Gauci CG, Flisser A, Lightowlers MW. A *Taenia solium* oncosphere protein homologous to host-protective *Taenia ovis* and *Taenia saginata* 18 KDa antigens. Int J Parasitol. 2001; 28: 757-760.
- Gauci CG, Lightowlers MW. Molecular cloning of genes encoding oncosphere proteins reveals conservation of modular protein structure in cestode antigens. Mol Biochem Parasitol. 2003; 127:193-198.
- Gauci CG, Verastegui, Gilman RH and Marshall W Lightowlers. *Taenia solium* and *Taenia ovis*: stage-specific expression of the vaccine antigen genes, TSOL18, TSOL16 and homologues, in oncospheres. Exp Parasitol. 2006 ;113:272-5.
- Harlow S, Lane D. Antibodies: A laboratory manual, Elsevier, Amsterdam. 1989.
- Harrison GB, Health DD, Dempster RP, et al. Identification and cDNA cloning of two novel low molecular weight host-protective antigens from *Taenia ovis* oncospheres. Int J Parasitol. 1996; 26: 195-204.

- Harrison GB, Health DD, Dempster RP, Lawrence SB, Lightowlers MW, Rickard MD. Identification of host-protective antigens from *Taenia ovis* oncospheres. *Int J Parasitol.* 1993; 23: 41-50.
- Hira PR, Francis I, Abdela NA, et al. Cysticercosis: imported and autochthonous infections in Kuwait. 2004. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 98, 233-239.
- Jimenez L, Fernandez-Velasco DA, Willms K, Landa A. A comparative study of biochemical and immunological properties of triosephosphate isomerase from *Taenia solium* and *Sus scrofa*. *J Parasitol.* 2003; 89: 209-14.
- Kingdom CT, Gauci CG, Rolfe RA et al. In vitro oncosphere-killing assays to determine immunity to the larvae of *Taenia pisiformis*, *Tenia ovis*, *Taenia saginata* and *Taenia solium*. 2006. *J Parasitol* ; 92: 273.281.
- Laclette JP, Ornelas Y, Merchant MT, Willms K.. Ultrastructure of the surrounding envelopes of *Taenia solium* eggs, In Flisser A, Willms K, Laclette JP, Larralde C, Ridaura C, Beltrán F. 1982 (eds): *Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives*, New York: Academic Press;375-387.
- Lightowlers MW, Gauci CG, Chow C, et al. Molecular and genetic characterisation of the host-protective oncosphere antigens of taeniid cestode parasites *Int J Parasitol.* 2003; 30; 33: 1207-1217.

- Lightowlers MW, Mitchell GF, Bowtell DD, Anders RF, Rickard MD. Immunization against *Taenia taeniaeformis* in mice: studies on the characterization of antigens from oncospheres. *Int J Parasitol.* Jun.1984; 14: 321-333.
- Lightowlers MW, Rickard MD, Mitchell GF. Immunization against *Taenia taeniaeformis* in mice: identification of oncospherical antigens in polyacrylamide gels by Western blotting and enzyme immunoassay. *Int J Parasitol.* 1986 ;16:297-306.
- Lightowlers MW. Vaccines against cysticercosis and hydatidosis: foundations in taeniid cestode immunology. *Parasitol Int.* 2006; 55 Suppl: S39-S43.
- Lumsden RD, Hildreth MB.. The Fine Structure of Adult Tapeworms. In *Biology of the eucestoda vol 1.* pp 237-267. 1983. Academic Press, New York and London.
- Maravilla P, Avila G, Cabrera V, Aguilar L, Flisser A. Comparative development of *Taenia solium* in experimental models. *J. Parasitol.*1998. Oct;84:882-886.
- Mayta H, Hancock k, Levine MZ, et al. Characterization of a novel *Taenia solium* oncosphere antigen. 2007 *Mol Biochem Parasitol* 156: 154-161.
- Mendlovic F, Carrillo-Farga J, Torres J, Lacleste JP, Flisser A. Differential expression of calreticulin in developmental stages of *Taenia solium*. *J Parasitol.* 2006. Aug;92(4):789-95.

- Mettrick DF. The intestine as an environment for *Hymenolepis diminuta*. In *Biology of the Tapeworm, Hymenolepis diminuta*, Araid HP. 1980 ed, pp.281-356. Academic Press, New York and London.
- Molinari JL, Rodriguez D, Tato P, Soto R, Arechavaleta F, Solano S.. Field trial for reducing porcine *Taenia solium* cysticercosis in Mexico by systematic vaccination of pigs. *Vet Parasitol*. 1997; 69: 55-63.
- Nash TE, Neva FA. Recent advances in the diagnosis and treatment of cerebral cysticercosis. *N Engl J Med*. 1984; 311: 1492-1496.
- Permin A, Yelifari L, Bloch P, et al. Parasites in cross-bred pigs in the upper east region of Ghana. *Vet Parasitol* 1999; 87: 63-71.
- Plancarte A, Flisser A, Gauci CG, Lightowlers MW. Vaccination against *Taenia solium* cysticercosis in pigs using native and recombinant oncosphere antigens. *Int J Parasitol*. 1999; 29: 643-647.
- Preux PM, Avode G, Bouteille BM, et al. Cysticercosis and neurocysticercosis in Africa: curren status. *Neurological Infections and Epidemiology*. 1996; 1: 63-68.
- Rabiela MT, Hornelas Y, Garcia-Allan C, Rodriguez-del-Rosal E, Flisser A.. Evagination of *Taenia solium* cysticerci: a histologic and electron microscopy study: *Arch Med Res*. 2000; 31: 605-607.

- Rabiela MT, Rivas A, Castillo S, Cancino F. Anatomopathological aspects of human brain cysticercosis, In Flisser A, Willms K, Laclette JP, Larralde C, Ridaura C, Beltrán F (eds): Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives, New York: Academic Press. 1982 179-200.
- Rabiela MT, Rivas A, Flisser A. Morphological types of *Taenia solium* cysticerci. Parasitol Today. 1989; 5: 357-359.
- Roman G, Sotelo J, Del Brutto O, et al. A proposal to declare neurocysticercosis an international reportable disease. Bull WHO. 2000; 78: 399-406.
- Sarti E, Flisser A, Schantz PM, et al. Development and evaluation of a health education intervention against *Taenia solium* in a rural community in Mexico. Am J Trop Med Hyg. 1997; 56:127-132.
- Sarti E, Schantz PM, Avila G, Ambrosio J, Medina-Santillan R, Flisser A.. Mass treatment against human taeniasis for the control of cysticercosis: a population-based intervention study. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2000; 94: 85-89.
- Schantz PM, Moore AC, Munoz JL, et al. Neurocysticercosis in an Orthodox Jewish community in New York City. N Engl J Med.1992; 3;327:692-695.
- Sciutto E, Aluja A, Fragoso G, Rodarte LF, et al. Immunization of pigs against *Taenia solium* cysticercosis: factors related to effective protection. Vet Parasitol. 1995; 60:53-67.

- Simanjuntak GM, Margono SS, Okamoto M, et al. Taeniasis/cisticercosis in Indonesia as an emerging disease. *Parasitology Today* 1997; 13: 321-322.
- Smyth JD, Mc Manus DP. *The physiology and biochemistry of cestodes..* Cambridge University Press. 1989; 5-10.
- Sotelo J, Del Brutto OH. Brain cysticercosis *Arch Med Res.* 2000; 31: 3-14.
- Thakur LC, Anand KS. Childhood neurocysticercosis in South India. *Indian J Pediatrics.*1991; 58: 815-819.
- Toledo A, Larralde C, Fragoso G. et al. Towards a *Taenia solium* cisticercosis vaccine: an epitope shared by *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* protects mice against experimental cysticercosis. *Inf ec Immun* 1999; 2522-2530.
- Ubelaker JE. The Morphology, Development and Evolution of Tapeworm larvae. In *Biology of the eucestoda* Academic Press, New York and London. 983. pp 237-267.
- Wadia N, Desai S, Bhatt M. Disseminated cysticercosis. New observations, including CT scan findings and experience with treatment by praziquantel. *Brain.* 1988; 111: 597-614.

BIBLIOGRAFÍA

Wandra T, Subahar R, Simanjuntak GM, et al. Resurgence of epileptic seizures and burns associated with cisticercosis in Assologaima, Jayawijaya, Irian Jaya, Indonesia, 1991-95. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2000; 94: 46-50.

Willingham AL, Engels D. Control of *Taenia solium* cysticercosis/taeniosis. *Adv Parasitol.* 2006; 61: 509-66.

Yoshino K. On the evacuation of eggs from detached gravid proglottids of *Taenia solium* and on the structure of its eggs. *Taiwan Igakkai Zasshi.* 1934; 33: 47-58.