



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN

EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE CELULAR
A LA VACUNACIÓN ORAL CON CALRETICULINA
RECOMBINANTE DE *Taenia solium* EN EL MODELO
DE TENIOSIS EXPERIMENTAL

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA:
KARINA RUIZ TOVAR

ASESORES:
Dr. SALVADOR FONSECA CORONADO
Dra. ANA FLISSER STEINBRUCH



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.

Este trabajo fue realizado en el Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México con el apoyo del Proyecto PAPIIT IN220007-2 y del Programa de Formación e Incorporación de Profesores de Carrera en Facultades y Escuelas para el Fortalecimiento de la Investigación.

AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIAS.

A mis papás; por que todos sus esfuerzos y sacrificios tienen una recompensa y sin ustedes no lo hubiese logrado, mis logros también son suyos.

Chava, sin ti y sin tu apoyo tal vez esto no hubiera sido posible y porque vamos por más. Gracias por estar a mi lado, por compartir tu vida conmigo y sobre todo por aguantarme. Te amo y también te admiro.

A mis hermanos Mariel, Irma y Miguel, a mi tío Moy y a mis abuelitas, por que estuvieron siempre conmigo... los quiero.

A mis mejores amigos: Bere, Diana, Miguel y José Luis, porque nunca me faltó su apoyo y estuvieron conmigo en los buenos y en lo malos momentos.

Por brindarme tu apoyo, pero sobre todo tu amistad y quiero que sepas que cuentas conmigo. Gracias Raque.

Le agradezco infinitamente a la Dra. Ana Flisser por haberme permitido trabajar con su equipo y en su laboratorio para la realización de este trabajo.

Al Dr. Marco Vega y al MVZ Angel Martínez por el gran apoyo que me brindaron en la revisión de esta tesis. Mil gracias.

ÍNDICE

	Página
Índice de figuras	i
Índice de tablas	iv
Abreviaturas	vi
Resumen	vii
1 INTRODUCCIÓN	1
1.1 Generalidades: Teniosis/Cisticercosis	1
1.2 Aspectos clínicos de la enfermedad	1
1.3 <i>Taenia solium</i>	2
1.3.1 El parásito adulto	2
1.3.2 El huevo	3
1.3.3 Fase larvaria	3
1.3.4 Ciclo biológico	4
1.4 Diagnóstico	5
1.5 Tratamiento	6
1.6 Distribución geográfica	6
1.7 Situación en México	6
2 Antecedentes	7
2.1 Respuesta inmune en teniosis/cisticercosis	7
2.1.1 Respuesta inmune humoral	7
2.1.2 Respuesta inmune celular	8
2.1.3 Evasión del sistema inmune	10
2.2 Vacunas contra teniosis o cisticercosis	10
2.3 Modelo experimental	12

	Página
2.4 La Calreticulina como candidato a vacuna en teniosis	13
2.4.1 La Calreticulina recombinante de <i>T. solium</i> (TsCRTr)	14
2.5 La citometria de flujo (CF) en la evaluación de la respuesta inmune celular	16
2.5.1 Análisis de la proliferación celular mediante CF.	17
2.5.2 Medición de marcadores de identidad y activación en hámster	17
3 Justificación	18
4 Hipótesis	18
5 Objetivos	19
5.1 Objetivo general	19
5.2 Objetivos particulares	19
6 Plan general de trabajo	20
7 Materiales y métodos	22
7.1 CF para identificación de anticuerpos de reactividad cruzada	22
7.2 Tratamiento e Inmunización	23
7.3 Infección con cisticercos de <i>T. solium</i>	24
7.4 Evaluación del desarrollo de tenias en intestino delgado	24
7.5 Obtención de células de bazo y GLM	25

	Página
7.6 Purificación de células mononucleares por gradiente de densidad con Ficoll-Hypaque	25
7.7 Tinción con CFSE y cultivo celular	25
7.8 Activación antígeno-específica con TsCRTLr	26
7.9 Tinción de marcadores de identidad y activación celular y lectura en el citómetro de flujo	27
7.10 Análisis estadístico	27
8 Resultados	28
8.1 Búsqueda de anticuerpos de reactividad cruzada	28
8.2 Evaluación del desarrollo de tenias en intestino delgado de hámster tras la vacunación con TsCRTLr	33
8.3 Evaluación de la proliferación celular	36
8.4 Evaluación de marcadores de identidad	48
8.5 Evaluación de marcadores de activación celular	51
9 Discusión	54
10 Conclusiones	69
11 Perspectivas	70
12 Referencias	71

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Escólex de <i>Taenia solium</i> .	2
2	Huevo de <i>Taenia sp.</i>	3
3	Cisticercos celulosos de <i>T. solium</i> .	4
4	Ciclo de vida de <i>Taenia solium</i> .	5
5	Plásmido recombinante pET 23-a-CRT para TsCRTr.	15
6	Plan de trabajo.	21
7	Procedimiento de inmunización de los hámsteres.	24
8	Análisis de citometría de flujo de CMN de sangre periférica.	32
9	Gráfica dot plot de la identificación de moléculas de activación marcadas con anticuerpos anti-CD25 biotina-estreptavidina-FITC y anti-CD69 PerCP de ratón en células de bazo de hámster.	32
10	Gráfica de barras del porcentaje de recuperación de tenias adultas del intestino de hámsteres no vacunados y vacunados con los diferentes inmunógenos.	35

Figura		Página
11	Gráfica de barras de la longitud de las tenias adultas recuperadas del intestino delgado de hámsteres no vacunados y vacunados con los diferentes inmunógenos.	35
12	Recuperación de tenias de hámsteres vacunados y no vacunados con TsCRTr	36
13	Gráficas Dot-plot de tamaño contra granularidad de células de bazo y de GLM de hámsteres vacunados con TsCRTr y estimulados <i>in vitro</i> con los diferentes agentes inmunógenos señalados.	38
14	Gráfica de barras de los porcentajes de activación de células de bazo de los cinco hámsteres inmunizados con TsCRT.	40
15	Gráfica de barras de los porcentajes de activación de células de GLM de los cinco hámsteres inmunizados con TsCRT.	40
16	Análisis de proliferación de células mononucleares de bazo de un hámster vacunado con TsCRTr y otro no vacunado.	43
17	Análisis de proliferación de células mononucleares de GLM de un hámster vacunado con TsCRTr y otro no vacunado.	43
18	Valores promedio de proliferación (VPP) de células de bazo de hámsteres vacunados con TsCRTr, TsCRTr+P, TC y VV y no vacunados, activados <i>in vitro</i> con diferentes estímulos.	46

Figura		Página
19	Valores promedio de proliferación (VPP) de células de GLM de hámsteres vacunados con TsCRTr, TsCRTr+P, TC y VV y no vacunados, activados <i>in vitro</i> con diferentes estímulos.	47
20	Análisis de CF para identificación y análisis de proliferación de la población CD4+ de células obtenidas de bazo y de GLM de un hámster vacunado con TsCRTr y estimuladas con TsCRTr <i>in vitro</i> .	50
21	Gráficas de puntos que muestran el porcentaje de expresión de moléculas CD25, CD69 y la coexpresión de ambas en células de bazo y GLM de un hámster inmunizado con TsCRTr y estimulado <i>in vitro</i> con este mismo antígeno.	52

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Página
1	Anticuerpos anti-moléculas de ratón (R) y humano (H) probados en busca de reactividad cruzada anti-hámster.	29
2	Resultados de la búsqueda de tenias adultas en intestino delgado de los hámsteres.	34
3	Valores de los % de activación de las células de bazo de los hámsteres inmunizados con TsCRTr en respuesta a estímulos in Vitro.	39
4	Valores de los % de activación de las células de GLM de los hámsteres inmunizados con TsCRTr en respuesta a estímulos in Vitro.	39
5	Porcentaje de proliferación de células de bazo en respuesta al estímulo <i>in vitro</i> .	44
6	Porcentaje de proliferación de células de GLM en respuesta al estímulo <i>in vitro</i> .	45
7	Porcentajes de células CD4+ de bazo identificadas con el anticuerpo anti-CD4 PE de reactividad cruzada y porcentajes de proliferación medidos por incorporación de CFSE por citometría de flujo, en hámsteres vacunados con TsCRTr, en respuesta al estímulo <i>in vitro</i> con TsCRTr y sin estimular.	49

Tabla**Página**

8	Porcentajes de células CD4+ de GLM identificadas con el anticuerpo anti-CD4 PE de reactividad cruzada y porcentajes de proliferación medidos por incorporación de CFSE por citometría de flujo, en hámsteres vacunados con TsCRTr, en respuesta al estímulo <i>in vitro</i> con TsCRTr y sin estimular.	49
9	Porcentaje de células de bazo con marcadores de activación temprana (CD69), tardía (CD25) y con ambos en hámsteres vacunados con TsCRTr y estimulados <i>in vitro</i> con el mismo antígeno.	53
10	Porcentaje de células de GLM con marcadores de activación temprana (CD69), tardía (CD25) y con ambos en hámsteres control y vacunados con TsCRTr y estimulados <i>in vitro</i> con el mismo antígeno.	53

ABREVIATURAS

α -	Anti-
APC	Alofococianina
BL-21	Cepa BL-21 de <i>E. coli</i>
CF	Citometría de flujo
CFSE	Del inglés <i>Carboxy-fluorescein-succinimidyl-ester</i>
CMN	Células mononucleares
CPS	Coproparasitoscópicos
CRT	Calreticulina
dpi	Días post-infección
ELISA	Del inglés <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FSC	Del inglés <i>Forward scatter</i> . Hace referencia al tamaño
GALT	Del inglés <i>Gut-Associated Lymphoid Tissue</i>
GLM	Ganglios linfáticos mesentéricos
LPS	Lipopolisacárido
NCC	Neurocisticercosis
S-IgA	Inmunoglobulina A secretora
PBA	Buffer de fosfatos-azida de sodio
PBS	Solución buffer de fosfatos
PE	Ficoeritrina
PerCP	Peridin-clorofil proteína
PHA	Fitohemaglutinina
PP	Placas de Peyer
SFB	Suero fetal bovino
SP	Sangre periférica
SSC	Del inglés <i>Side scatter</i> . Hace referencia a la granularidad.
TC	Toxina colérica
TsCRT	Calreticulina de <i>T. solium</i>
TsCRT _r	Calreticulina recombinante de <i>T. solium</i>
VPP	Valor promedio de proliferación
V.V.	Vector vacío

RESUMEN

La calreticulina recombinante de *T. solium* (TsCRTr) es un candidato como vacuna contra la teniosis en humanos. El desarrollo de teniosis experimental en hámster ha permitido realizar investigaciones en aspectos inmunológicos de la relación hospedero-parásito, sin embargo, hasta el momento no existen anticuerpos comerciales contra moléculas de hámster. El objetivo de éste trabajo fue la evaluación de la respuesta inmune protectora de células de bazo y ganglios linfáticos mesentéricos tras la vacunación con TsCRTr mediante la identificación de anticuerpos de reactividad cruzada y su utilización en conjunto con otras técnicas, para establecer la activación y proliferación de las células mononucleares antígeno-específicas. Para este propósito, se utilizaron hámsteres hembras de 8 meses de edad que se desparasitaron por vía oral. Se formaron 5 grupos de 10 hámsteres cada uno, los cuales se trataron con PBS; con Toxina Colérica (TC); con TsCRTr; con TsCRTr y TC; y con Bacterias BL-21 hasta un total de 4 inmunizaciones y con intervalo de 8 días entre una y otra. 15 días después de la cuarta inmunización, los hámsteres fueron retados con 4 cisticercos de *T. solium* por vía oral. Los animales se sacrificaron 15 días post-infección, se obtuvieron y purificaron las células y se les realizó tinción con CFSE y activación in vitro con TsCRTr. 120h después se analizó la proliferación y se hizo tinción de identidad (CD4) y activación (CD25 y CD69) por citometría de flujo.

Se identificaron tres anticuerpos anti-ratón de reactividad cruzada: anti-CD4-PE, anti-CD25-Biotina y anti-CD69-PerCP. Por tinción con CFSE y con marcadores de identidad se demostró proliferación en respuesta a la activación con TsCRTr tanto en células mononucleares como en linfocitos T CD4+, estos resultados correlacionaron con una aparente disminución en la cantidad de tenias adultas encontradas en el intestino de los hámsteres del grupo vacunado.

No existen publicaciones respecto a la posibilidad de proteger contra la teniosis humana, este es el primer ensayo de vacunación en contra del estadio adulto de *T. solium* en el que se demuestra que existe un componente de respuesta celular específica protectora en el modelo experimental de hámster contra *T. solium* tras la vacunación con TsCRTr por lo que puede ser considerado como candidato a vacuna contra teniosis.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 GENERALIDADES: TENIOSIS/CISTICERCOSIS

La teniosis es una enfermedad producida por los helmintos de la familia *Taenidae* en su fase adulta. Existen dos especies que afectan a los humanos: *Taenia solium* y *Taenia saginata*; la teniosis se debe al establecimiento del parásito en el intestino delgado del hospedero (Becerril-Flores, 2005).

La cisticercosis es la enfermedad causada por el establecimiento del metacéstodo (larva o cisticerco) de *T. solium* en músculo (cisticercosis muscular), ojo (cisticercosis ocular) o sistema nervioso central (neurocisticercosis, NCC), siendo esta última la forma más frecuente de la infección (Becerril-Flores, 2005).

1.2 ASPECTOS CLÍNICOS DE LA ENFERMEDAD.

Teniosis: La mayoría de los portadores de la tenia adulta son asintomáticos. La principal manifestación es la expulsión de proglótidos; cuando se presentan síntomas, estos son: insomnio, diarrea, náuseas, pérdida del apetito, pérdida de peso y trastornos abdominales (Becerril-Flores, 2005).

NCC: Es una enfermedad compleja cuyas manifestaciones principales dependen del número, estadio y lugar anatómico donde se encuentran albergados los parásitos, así como del grado de la reacción inflamatoria inducida y las condiciones del hospedero. La sintomatología consiste en crisis convulsivas en el 70% de los casos, hipertensión endocraneal, alteraciones del estado mental y otros síntomas neurológicos menos frecuentes, la expresión clínica es polimórfica y va desde asintomático hasta constituir una enfermedad incapacitante y en ocasiones mortal (Becerril-Flores, 2005).

1.3 *Taenia solium*

1.3.1 El parásito adulto.

T. solium pertenece a la subclase *Eucestoda*, el orden *Cyclophyllidea* y a la familia *Taeniidae*. En su forma adulta, la “solitaria” (nombre común que se le da a la tenia) presenta un cuerpo largo y aplanado cuya longitud puede superar los dos metros. Está provista de un tegumento o epitelio que le permite absorber los nutrientes del medio, ya que carece de un tubo digestivo interno. El escólex, simula la cabeza del parásito y en realidad es la estructura que le permite adherirse a la mucosa intestinal del hospedero por medio de una doble corona de ganchos y cuatro ventosas (figura 1). El estróbilo o propiamente el cuerpo se encuentra formado por segmentos o proglótidos que arrancan de una región germinal situada en la parte inferior del escólex. Los segmentos más cercanos al cuello son inmaduros, sin órganos sexuales desarrollados y van mostrando un grado creciente de desarrollo y diferenciación a medida que se alejan del escólex, cada proglótido maduro posee órganos genitales masculinos y femeninos. Los proglótidos más alejados del escólex muestran un útero “grávido” ramificado, lleno de huevos (~ 50.000 en cada uno), cada proglótido mide entre 0,5 y 2cm; los grávidos son liberados espontáneamente por el hospedero con las heces. Conforme se van expulsando proglótidos grávidos, van gestándose otros nuevos en el cuello (Becerril-Flores, 2005; Flisser, Vargas-Parada, Laclette, 2006).



Fig. 1 Escólex de *Taenia solium*.

1.3.2 El huevo.

Los huevos de *T. solium* están formados por una oncosfera rodeada por dos capas de quitina que la protegen. El embrióforo constituye la principal estructura de protección de los embriones para sobrevivir en el medio, y en el interior posee tres pares de ganchos; por esto último es que reciben la denominación de embrión hexacanto (figura 2). El huevo de *T. solium* es impermeable y muy resistente, lo que posibilita la supervivencia en un ambiente desfavorable. Cuando los huevos son ingeridos por el hospedero intermediario, el embrióforo se desbarata de inmediato y libera las oncosferas (Flisser, Vargas-Parada, Laclette, 2006).



Fig. 2 Huevo de *Taenia* sp.

1.3.3 Fase larvaria.

El cisticerco es la fase larvaria de *T. solium*. Es una vesícula ovalada y translúcida, llena de líquido, de 0.5 a 2cm de diámetro y dotada de un pequeño escólex en su interior. El cisticerco está formado por dos cámaras; una pequeña, que incluye el escólex y el cuello y la segunda, más grande, se conforma por el fluido vesicular y la pared. El tipo celuloso es la forma más común de cisticercos, mide entre 0.5 y 2 cm y presenta una forma ovoide (figura 3) (Flisser, Vargas-Parada, Laclette, 2006).

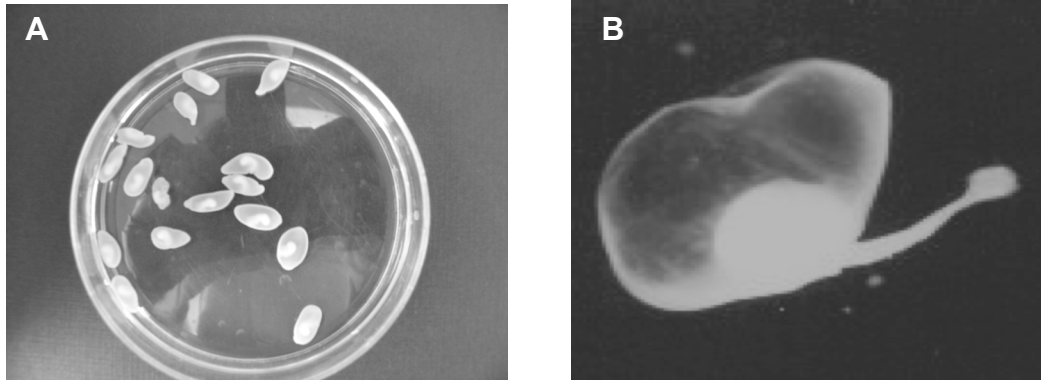


Fig. 3 Cisticercos celulosos de *T. solium*: A. Cisticercos no evaginados recién extraídos en nuestro laboratorio a partir de músculo de un cerdo infectado. B. Cisticercos evaginando en medio de bilis en donde se puede observar el escólex.

1.3.4 Ciclo biológico.

T. solium alterna entre dos hospederos: el ser humano como hospedero definitivo y el cerdo como principal hospedero intermediario (figura 4). En su fase adulta, el platelminto habita en el intestino delgado del ser humano y su presencia ocasiona la teniosis. La tenia produce miles de huevos que son eliminados dentro de proglótidos grávidos en las heces de personas infectadas, el cerdo se infecta al ingerir estos desechos contaminados. Cada huevo puede convertirse en un cisticercos y de esta manera se ocasiona la cisticercosis porcina. El ciclo culmina cuando el hombre consume carne de cerdo infectada con cisticercos viables. Los cisticercos evaginan y se fijan en las paredes del intestino humano donde maduran hasta convertirse en gusanos adultos. La convivencia con un teniásico y la falta de higiene pueden favorecer la ingestión de huevos, desarrollándose así la cisticercosis humana (Flisser, Pérez-Tamayo, 2006).

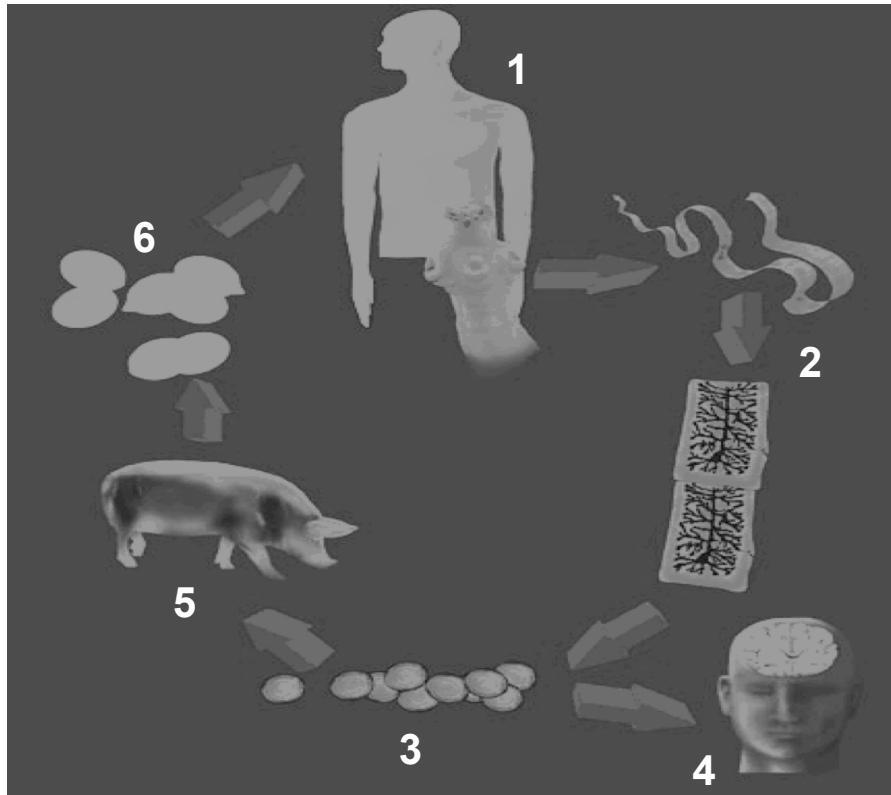


Fig. 4 Ciclo de vida de *T. solium*. Hospedero definitivo (1); eliminación de proglótidos grávidos (2); liberación de huevos al medio ambiente (3); ingestión de huevos por el hombre (cisticercosis humana) (4), o por los hospederos intermediarios (cerdos) (cisticercosis porcina) (5); ingestión de cisticercos por el hospedero definitivo (teniosis) (6).

1.4 DIAGNÓSTICO.

Hasta el decenio pasado el diagnóstico de la teniosis se basaba en estudios coproparasitológicos (CPS). En la década de los 90's se desarrolló un ELISA para la detección de coproantígenos usando anticuerpos policlonales de conejos contra un extracto total de *T. solium* adulta. Se considera que los estudios CPS tienen una sensibilidad de 50 a 60%, mientras que la del ELISA es de 41%. Ante esto, se diseñó una prueba diagnóstica de Western blot de glicoproteínas específicas de *T. solium*, la cual tiene una alta sensibilidad (93%) para detectar anticuerpos tanto en suero como en fluido cerebro-espinal y es la que se usa actualmente en México como apoyo en los casos en los que el diagnóstico imagenológico no es concluyente (Proaño-Narvaez y col., 2002).

1.5 TRATAMIENTO

El tratamiento de la teniosis consiste en el uso de fármacos cestocidas, el prazicuantel presenta una eficacia del 95% y la niclosamida del 85%, por lo que generalmente van acompañados de la toma de una purga salina para facilitar la eliminación del parásito (Pawlowski, Allan, Sarti, 2005; Flisser, Pérez-Tamayo, 2006).

1.6 DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA.

Este parásito es endémico en la mayoría de los países de África, Asia, América Central y Sudamérica aunque con la emigración y el turismo se ha difundido su presencia en países como Estados Unidos, Canadá, Inglaterra, Portugal, España y Australia (Becerril-Flores, 2005).

1.7 SITUACIÓN EN MÉXICO.

La frecuencia de infecciones por *T. solium* informada en México proviene de dos fuentes: la primera de ellas se refiere a las publicaciones científicas, donde las frecuencias varían de 0.2 a 3.4%. La segunda proviene de las estadísticas oficiales, donde, de 1986 a 1990, se notificaron alrededor de 13 000 casos anuales. A partir de 1991 la notificación ha sido menor, con alrededor de 8 000 casos anuales por *Taenia sp* y a la fecha el número de casos se ha visto disminuido notablemente (Sarti y Vedantam, 2003).

El Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica ha reportado un descenso en el número de casos en los últimos años, así, en 1999 se informaron un total de 920 casos, en 2002 se identificaron 570 y en 2007 un total de 325 casos confirmados. Por otro lado, la frecuencia de la cisticercosis porcina en rastros de México varía de 0.004% hasta 12%; sin embargo, estas cifras pueden aumentar si se considera que 35% de la producción porcina es sacrificada sin inspección (www.dgepi.salud.gob.mx/boletin/2008/sem1/index.htm; consulta del 28/02/08).

2. ANTECEDENTES

2.1 RESPUESTA INMUNE EN TENIOSIS/CISTICERCOSIS.

La mayor efectividad del sistema inmune de mucosas se encuentra en el tracto gastrointestinal (GI), representado por el GALT (por sus siglas en inglés *Gut-Associated Lymphoid Tissue*), el cual se encuentra asociado a sitios como las placas de Peyer, el apéndice y los nódulos linfáticos, estos sitios están rodeados por una región en la que se registra actividad celular, mayoritariamente de linfocitos, que incluye del 20-40% de células B y del 40 al 60% de células T aunque también es posible encontrar macrófagos ($\approx 10\%$), eosinófilos ($\approx 5\%$) y células cebadas ($\approx 1-3\%$). La mayoría de las células T son $CD3^+ CD4^+ CD8^-$ y llevan a cabo funciones cooperadoras aunque la tercera parte de esta población presenta un patrón $CD3^+ CD4^- CD8^+$ y presenta actividad citotóxica, en tanto que las células B llevan a cabo la producción de altas concentraciones de IgA, en forma de IgA secretora (S-IgA), lo anterior ha sido demostrado también para las glándulas mamarias, salivales, lagrimales, bazo y ganglios linfáticos. La S-IgA constituye más del 80% del total de los anticuerpos producidos en tejidos asociados a mucosas, lo que la convierte en la principal efectora de la respuesta inmune local (Craig y Cebra, 1971; Mc Ghee y col., 1992).

La respuesta inmune contra teniosis y cisticercosis involucra la participación de los mecanismos innatos y adaptativos, de estos últimos se ha demostrado una actividad tanto de respuesta humoral como celular (Becerril-Flores, 2005).

2.1.1 Respuesta inmune humoral.

Tanto en la teniosis como en la cisticercosis humana es posible detectar inmunoglobulinas, lo que habla de una respuesta activa de células B. Se han detectado inmunoglobulinas contra cisticercos en suero sanguíneo y en el líquido cefalorraquídeo de pacientes infectados lo que implica que algunos de los

antígenos inmunodominantes del parásito son capaces de ganar acceso a la circulación. La presencia de IgG, indica que la enfermedad constituye un proceso crónico y de larga evolución, la respuesta inmune humoral opera con mayor intensidad en casos sintomáticos que en población abierta. Existe una correlación entre los anticuerpos del hospedero y el estadio de los parásitos: los anticuerpos abundan en pacientes cuyos cisticercos están vivos o en proceso de destrucción, pero se encuentran disminuidos en presencia de parásitos calcificados (Flisser, Vargas-Parada, Laclette P, 2006).

El estudio de la respuesta inmune humoral local contra el parásito en el hospedero definitivo es difícil por lo complicado de la obtención de muestras, se han desarrollado algunos sistemas diagnósticos (principalmente contra cisticercosis) para la medición de IgA en muestras de saliva con diferentes grados de sensibilidad y especificidad, no obstante, los modelos experimentales han permitido conocer que se produce una gran cantidad de IgA en respuesta a la infección por helmintos, lo que puede ser extrapolado al hospedero definitivo, por ejemplo, se ha demostrado que en perros infectados con *Echinococcus granulosus*, *E. multicoloris* o con *T. ovis* se detectan anticuerpos IgG séricos e IgA en saliva a las dos semanas post-infección mientras que en otro experimento se evaluó la respuesta inmune a la primo-infección con *Strongyloides ratti* en su hospedero natural, la rata. En este caso se detectaron anticuerpos contra el parásito de tipo IgG1, IgG2a e IgG2b en suero y en tejido intestinal, IgE en suero y sobre todo IgA en grandes concentraciones en secreción intestinal en muestras de animales infectados (Jenkins y Rickard, 1986; Bueno y col., 2000; Ávila y col., 2006; Wilkes y col., 2007).

2.1.2 Respuesta inmune celular.

Los datos más abundantes acerca de la respuesta de linfocitos en este padecimiento se refieren a NCC, en la cual se ha encontrado que los pacientes presentan una amplia gama de manifestaciones que van desde casos

asintomáticos hasta casos letales con graves afecciones cerebrales, lo anterior sugiere una participación fundamental de la respuesta inmune celular en el control de la infección; se ha encontrado que en pacientes asintomáticos se presentan cisticercos calcificados y una respuesta inmune predominante de tipo Th2, con producción de citocinas como IL-4, IL-5 e IL-13 que contribuyen a una buena respuesta humoral. Además, las células mononucleares obtenidas de sangre periférica de estos pacientes y estimuladas específicamente *in vitro*, muestran una alta producción de IL-12, lo cual sugiere una respuesta citotóxica que lleva a la muerte del cisticerco y por consiguiente a su calcificación. En los pacientes sintomáticos que presentan cisticercos vesiculares, coloidales, calcificados o mezclas de estos estados, se ha identificado una respuesta celular específica disminuida (quizás por efecto de los mecanismos de evasión del parásito), pero con un elevado nivel de IgG específica (Chavarria y col., 2006).

Aunado a lo anterior, se han identificado diferencias en los perfiles de respuesta celular entre pacientes en la fase inflamatoria y en la fase no inflamatoria de la NCC, tanto en líquido cefalorraquídeo como en sangre periférica. En células obtenidas de estos casos, estimuladas *ex vivo* con un extracto total de *T. solium*, se encontró un alto porcentaje de células CD19+ y CD56+ en ambos grupos de pacientes, sin embargo, los que se encuentran en fase inflamatoria presentan un mayor número de células CD8+ y un perfil de citocinas IL-4 e IL-12, en tanto que en la fase no inflamatoria se presenta producción predominante de IL-6, IL-10 e IL-12 (Chavarria y col., 2006).

Con respecto a la respuesta inmune celular local en el caso concreto de teniosis, su estudio en humanos es complicado y existen muy pocos trabajos, por lo que el uso de los modelos experimentales es de vital importancia para el conocimiento de la relación hospedero-parásito.

2.1.3 Evasión del sistema inmune.

Para sobrevivir a una respuesta inmune activa, el parásito ha desarrollado diversos mecanismos de evasión y depresión de la misma como son el establecimiento en sitios inmunológicamente privilegiados (ojo, cerebro), el enmascaramiento de la membrana vesicular con inmunoglobulinas y proteínas del complemento del hospedero y el recambio de tegumento, así como la producción de moléculas que suprimen o desvían la respuesta inmunitaria como es el caso de *Taenia taeniaeformis* que evade al sistema del complemento mediante la producción de proteasas y otros productos de secreción como el “factor metacétodo” que inhiben tanto la respuesta celular como la humoral (Davis y Hammerberg, 1990; Trap y Boireau, 2000; Restrepo y col., 2001)

2.2 VACUNAS CONTRA TENIOSIS O CISTICERCOSIS.

El control de *T. solium* es un tema de interés global que ha sido sujeto a debate y asimismo ha dado pie al desarrollo de nuevas tecnologías para simplificar su diagnóstico, tratamiento y prevención. En la actualidad existen vacunas que han sido desarrolladas para brindar protección al hospedero intermediario con la esperanza de interrumpir la transmisión del parásito al hospedero definitivo, logrando en buena medida el control de la cisticercosis porcina, sin embargo, se siguen presentado casos de teniosis y neurocisticercosis humanas (Cruz-Revilla y col., 2006).

Por lo anterior, es que se busca una vacuna para detener al estadio adulto en el hospedero definitivo y de esta manera interrumpir el ciclo biológico del parásito. Uno de los primeros intentos exitosos para producir una vacuna antihelmíntica oral recombinante fue descrita en la década de los 80`s, ésta vacuna fue desarrollada usando un antígeno recombinante (To45W) para la protección de ovejas contra la fase larvaria de *Taenia ovis* y aunque la vacuna resultó muy efectiva, dejó de ser comercializada por la falta de mercado. Hasta el momento existen varios

candidatos como probables inmunógenos, entre ellos tenemos a una proteína denominada TSOL18/HP6-Tsol cuya función es la adhesión del parásito y puede participar en los procesos de invasión; a la proteína TEG-Tsag de *T. saginata* la cual forma parte del citoesqueleto, tiene actividad en la función tegumentaria y provee buenas respuestas de anticuerpos por lo que es candidato a vacuna en cisticercosis bovina, además, por presentar una alta homología con la proteína de *T. solium*, no se descarta su potencial uso como vacuna en humanos (Mulcahy y col., 2004; González y col. 2007; Parkhouse, y col., 2008).

De igual manera se han identificado secuencias en las bibliotecas genómicas de cDNA que codifican para proteínas vitales para el establecimiento del parásito. Algunas de estas proteínas ya han sido caracterizadas molecular y funcionalmente como es el caso de la proteína sec14Tsol, y la familia de genes de adhesión de Taenia (TAF) que se sugiere son importantes en los mecanismos de invasión del parásito, y de las cuales se infiere un potencial uso como candidatos a vacunas (González y col., 2007; Montero y col., 2007).

Una factor importante para el desarrollo de una vacuna efectiva contra la teniosis es que deberá ser una formulación oral, ya que la infección por este parasito se inicia por la invasión a mucosas, entonces, una vacuna que sea administrada por esta vía es el mejor camino para inducir una respuesta inmune protectora eficiente, sin embargo, se sabe que cuando se lleva a cabo una administración oral, se necesitan dosis mayores de antígeno que cuando se administra por vía sistémica (Senior, 2001).

Se ha probado que la respuesta a la inmunización por vía oral es baja, ya que por lo general los antígenos administrados son destruidos debido a las condiciones del estómago (presencia de ácidos, enzimas, etc.) y no alcanzan al sistema inmune en el intestino y los que lo logran son sólo parcialmente absorbidos en el intestino debido a sus, generalmente, elevados pesos moleculares. Sin embargo, se insiste en intentar generar vacunas orales ya que confieren múltiples ventajas, como un

mejor costo-beneficio, no necesitan personal capacitado para su administración y la gente prefiere tomar una vacuna a que le sea administrada mediante una inyección.

En muchos estudios se ha comprobado que el uso de algunas sustancias puede funcionar como adyuvante y promover por varios mecanismos tanto la respuesta inmune sistémica como la de mucosas. Algunos de estos compuestos son la toxina colérica (TC), el ricino, la hemaglutinina del virus de la influenza y otros que pueden facilitar la producción de anticuerpos en secreciones y en suero de sujetos inmunizados por vía oral (Elson, 1989; McGhee y col., 1992; de Vos y Dick, 1993).

Para proteger al material inmunogénico del pH ácido y de las condiciones proteolíticas del estómago, la administración oral de antígenos, además de combinarse con un adyuvante, se acompaña de soluciones que modifiquen el pH tales como el bicarbonato de sodio y en la actualidad se busca que el mismo material “protector” del antígeno funcione como adyuvante, los ejemplos más representativos los encontramos en el empaquetamiento de pequeñas cantidades del antígeno en cápsulas de materiales lipídicos solos (liposomas) o adicionados con sales biliares (bilosomas), que son solubles sólo a pH alcalino por lo que liberan su contenido hasta llegar al intestino delgado (McGhee y col., 1992; Senior, 2001).

2.3 MODELO EXPERIMENTAL

Una opción para el estudio de la teniosis es el desarrollo de *T. solium* en modelos experimentales y el más comúnmente usado es el hámster debido a su alta susceptibilidad a la infección por este parásito, a que las tenias desarrolladas no maduran sexualmente y por lo tanto los ejemplares recuperados no representan un riesgo para la salud del operador y porque son animales de fácil manejo. Como modelo experimental ha sido utilizado para desarrollar una prueba de diagnóstico para teniosis, para determinar parámetros de crecimiento del parásito y para

identificar los componentes de la respuesta inflamatoria en la mucosa intestinal y de la respuesta inmune humoral (Allan y col., 1990; Merchant y col., 1998; Ávila y col., 2002, 2003, 2006).

No existen datos publicados de las proporciones de subpoblaciones celulares de linfocitos T en el hámster, debido principalmente a la falta de reactivos para identificar las moléculas de identidad que los pueden caracterizar. Este trabajo forma parte de un proyecto en el que se busca identificar a los componentes de la respuesta inmune celular en el modelo experimental.

2.4 LA CALRETICULINA COMO CANDIDATO A VACUNA EN TENIOSIS

En el laboratorio de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina de la UNAM, el grupo de la Dra. Ana Flisser, además del desarrollo de modelos experimentales de teniosis en roedores, ha identificado y caracterizado a la calreticulina TsCRT_r como proteína funcional de *T. solium*. La calreticulina (CRT) es una proteína multifuncional que reside en el retículo endoplásmico, es reguladora de la homeostasis de Ca²⁺ y actúa como chaperona. Es una proteína ubicua y altamente conservada a nivel de su organización genómica y secuencia de aminoácidos, lo que denota su importancia fundamental en los sistemas biológicos y le confiere la capacidad de poder responder a estímulos extracelulares y coordinar las respuestas celulares (Nakhasi y col., 1998; Mendlovic y col., 2004, 2006).

La CRT de *T. solium* está presente en células subtegumentarias y musculares del cisticerco y del adulto, también se le ha localizado en otros sitios celulares donde participa en diversos procesos como la adhesión celular y se expresa durante la embriogénesis, lo que la convierte en un candidato a vacuna contra teniosis ya que una respuesta inmune en su contra interferiría con la viabilidad del parásito y evitaría su desarrollo.

Esta posibilidad se apoya en la demostración de que una CRT de *Schistosoma* es uno de los antígenos inmunodominantes en la vacuna oral desarrollada en su contra, la cual confiere la mayor protección en modelos experimentales de esquistosomosis y es capaz de estimular linfocitos B y T *in vitro*.

Además de su amplia distribución en humanos, se han identificado homólogos de CRT en diversos parásitos. En estudios de inmunolocalización, utilizando anticuerpos específicos anti TsCRTr se demostró que esta proteína se expresa diferencialmente en los estadios del ciclo de vida de *T. solium*. En pacientes con tripanosomiasis, esquistosomosis y oncocercosis, así como con enfermedades autoinmunes, se ha informado sobre la presencia de anticuerpos anti CRT (Rokeach, Zimmerman y Unnasch, 1994; Eggleton y col., 2000; Marcelain y col., 2000; Naglaa y col., 2000; Mendlovic y col., 2006).

2.4.1 La TsCRTr

Como se mencionó, en el laboratorio de la Dra. Flisser se logró aislar el cDNA que codifica para la TsCRT y se ha logrado producir esta proteína en un sistema de expresión de *E. coli* para obtener una proteína recombinante funcional, esta funcionalidad fue demostrada por su capacidad de unir Ca^{2+} *in vitro* (Mendlovic y col., 2004).

Para la producción de la TsCRTr se utiliza un plásmido recombinante (pET 23-a-CRT) con resistencia a ampicilina que contiene el fragmento de cDNA que codifica para la TsCRTr (fig. 5)

Para la expresión de la TsCRTr se transforman bacterias BL21 con el plásmido, para la extracción, el producto del cultivo se lava con Tris-HCl y sacarosa para lisar las bacterias y extraer las proteínas solubles. El precipitado con proteínas de membrana se sonica en presencia de inhibidores de proteasas con el fin de extraer las proteínas unidas a la membrana que es donde se encuentra la TsCRTr.

Finalmente, para purificar la TsCRTr se realiza una precipitación por punto isoeléctrico y se analiza el precipitado por SDS-PAGE. Esta proteína purificada es la que se utiliza como vacuna (Mendlovic y col., 2004; Flisser, 2007).

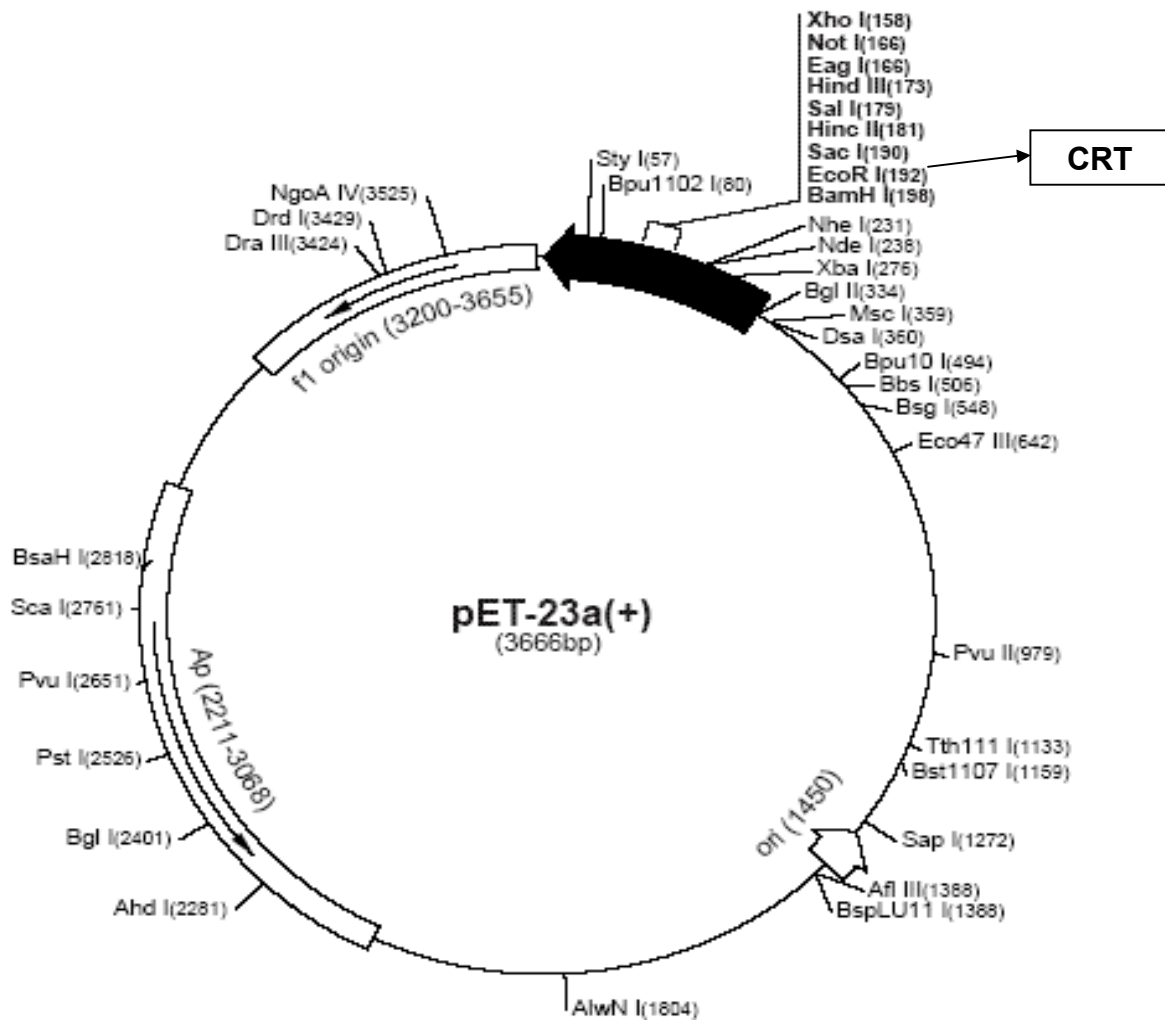


Fig. 5. Plásmido recombinante pET 23-a-CRT para TsCRTr.

2.5 LA CITOMETRIA DE FLUJO (CF) EN LA EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE CELULAR

La CF es una técnica de análisis celular multiparamétrica cuyo fundamento se basa en hacer pasar una suspensión de partículas (generalmente células), alineadas de una en una, frente a un haz de láser focalizado. El impacto de cada célula con el rayo de luz produce señales que corresponden a diferentes parámetros de la célula y que son recogidos por distintos detectores; estos convierten dichas señales eléctricas en señales electrónicas que posteriormente son digitalizadas y visualizadas en forma de gráficas en una pantalla, lo que permite la medida simultánea de varios parámetros en una misma célula. Estos parámetros son:

- Parámetros relacionados con características intrínsecas de la célula, como su tamaño y la complejidad de su núcleo y citoplasma.
- Parámetros relacionados con moléculas de membrana o intracelulares específicas de cada linaje celular, para lo cual se utiliza como herramienta a sustancias fluorescentes (fluorocromos) acopladas a anticuerpos específicos para dichas moléculas.

Por lo tanto, la CF es capaz de identificar una célula por medio de sus características antigénicas y/o por sus características morfológicas de tamaño y complejidad. La CF es una técnica sencilla que se aplica en la rutina diaria de muchos laboratorios clínicos y de investigación, capaz de proporcionar resultados de forma rápida que pueden ser aplicables al diagnóstico. La principal característica de la CF es que puede ofrecer información simultánea de varios parámetros de cada una de las células analizadas y la relación entre los parámetros de una célula y los de otra célula también analizada (Domínguez, 2007).

2.5.1 Análisis de proliferación celular mediante CF.

Uno de los principales parámetros a evaluar en la respuesta inmune a una vacuna, es su capacidad de inducir una proliferación celular específica. El diacetato de carboxifluorescein-succinimidil-éster (CFSE) es el mejor reactivo-colorante utilizado para el análisis de la proliferación celular por CF. El CFSE es un colorante intracelular que se une también a las proteínas de la superficie de la célula por reacción con la lisina y algunos otros grupos amino. Cuando las células se dividen, el CFSE contenido en ellas se distribuye equitativamente entre las dos células hijas, las cuales emiten ahora solo la mitad de fluorescencia que sus antecesoras lo que permite seguir cada una de las divisiones celulares que se lleven a cabo. (Hodgkins, Lee y Lyons, 1996).

El CFSE se ha utilizado para el análisis de la proliferación de linfocitos T en humanos y otras especies en respuesta a diversos estímulos (ACTG, 2004; Potter y Wener, 2005; Asquith y col., 2006; Wang y col., 2007).

2.5.2 Medición de marcadores de identidad y activación en hámster.

El desarrollo de teniosis experimental en hámster ha permitido realizar investigaciones en aspectos inmunológicos de la relación hospedero-parásito, sin embargo, hasta el momento no existen trabajos que involucren el uso de anticuerpos para la evaluación de marcadores de identidad y de activación celular en hámster ya que éstos no se encuentran actualmente disponibles en forma comercial.

3. JUSTIFICACIÓN

La teniosis y la cisticercosis humanas causadas por *T. solium* son consideradas un problema de salud pública en países endémicos donde su persistencia es promovida por deficiencias culturales, socioeconómicas y sanitarias. Hasta el momento no se cuenta con una vacuna que proteja contra la teniosis y una manera eficiente de prevenir el desarrollo de la fase adulta puede ser por vacunación; por ello, en este proyecto se hace una evaluación primaria de la respuesta inmune celular, utilizando como candidato a vacuna a la TsCRTr en el modelo experimental de hámster, para evaluar su capacidad inmunogénica.

4. HIPÓTESIS

La vacunación oral de hámsteres con TsCRTr da lugar a la activación de una respuesta inmune celular que interfiere con el desarrollo de la fase adulta de *T. solium* en el modelo de teniosis experimental.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL.

Determinar si en el modelo de teniosis experimental en hámster se induce protección contra el parásito tras la vacunación oral con TsCRTr, mediante la evaluación de proliferación antígeno-específica de células de bazo y ganglios linfáticos mesentéricos.

5.2 OBJETIVOS PARTICULARES.

1. Identificar anticuerpos de reactividad cruzada contra moléculas de identidad y de activación celular en hámster.
2. Establecer la metodología para el establecimiento de cultivos celulares de bazo y ganglios linfáticos mesentéricos de hámster.
3. Evaluar si existe proliferación celular específica en respuesta a la activación con TsCRTr en células mononucleares (CMN) de bazo y ganglios linfáticos mesentéricos (GLM) inmunizados con esta vacuna, tras el reto con cisticercos de *T. solium*.
4. Determinar activación de subpoblaciones de linfocitos mediante proliferación y determinación de moléculas de activación en CMN y GLM.
5. Determinar el grado de protección inducido mediante la correlación entre el desarrollo de fases adultas de *T. solium* en intestino y la respuesta celular obtenida contra la TsCRTr.

6. PLAN GENERAL DE TRABAJO

Debido a que actualmente no existen anticuerpos comerciales disponibles contra moléculas de identidad y de activación en hámster, el primer paso fue buscar anticuerpos de reactividad cruzada los cuales fueron evaluados por CF en CMN de sangre periférica y bazo de hámsteres.

Para la evaluación de la respuesta inmune celular se inmunizaron hámsteres hembras de 8 meses de edad con TsCRTr sola o utilizando como adyuvante toxina colérica, como controles se utilizaron hámsteres inmunizados con *E. coli* BL-21 sin la proteína recombinante y animales tratados con PBS. Una vez concluido el esquema de inmunización, los hámsteres se infectaron con 4 cisticercos c/u por vía oral; a los 12 días post-infección se sacrificaron, se disectó el intestino y se observó la presencia o ausencia de tenias, simultáneamente se obtuvieron las células de bazo y GLM. Con las células obtenidas se establecieron los cultivos y se activó con TsCRTr *in vitro*, a los 5 días post-activación se evaluó proliferación celular y la expresión de marcadores de activación en CMN y en células CD4+.

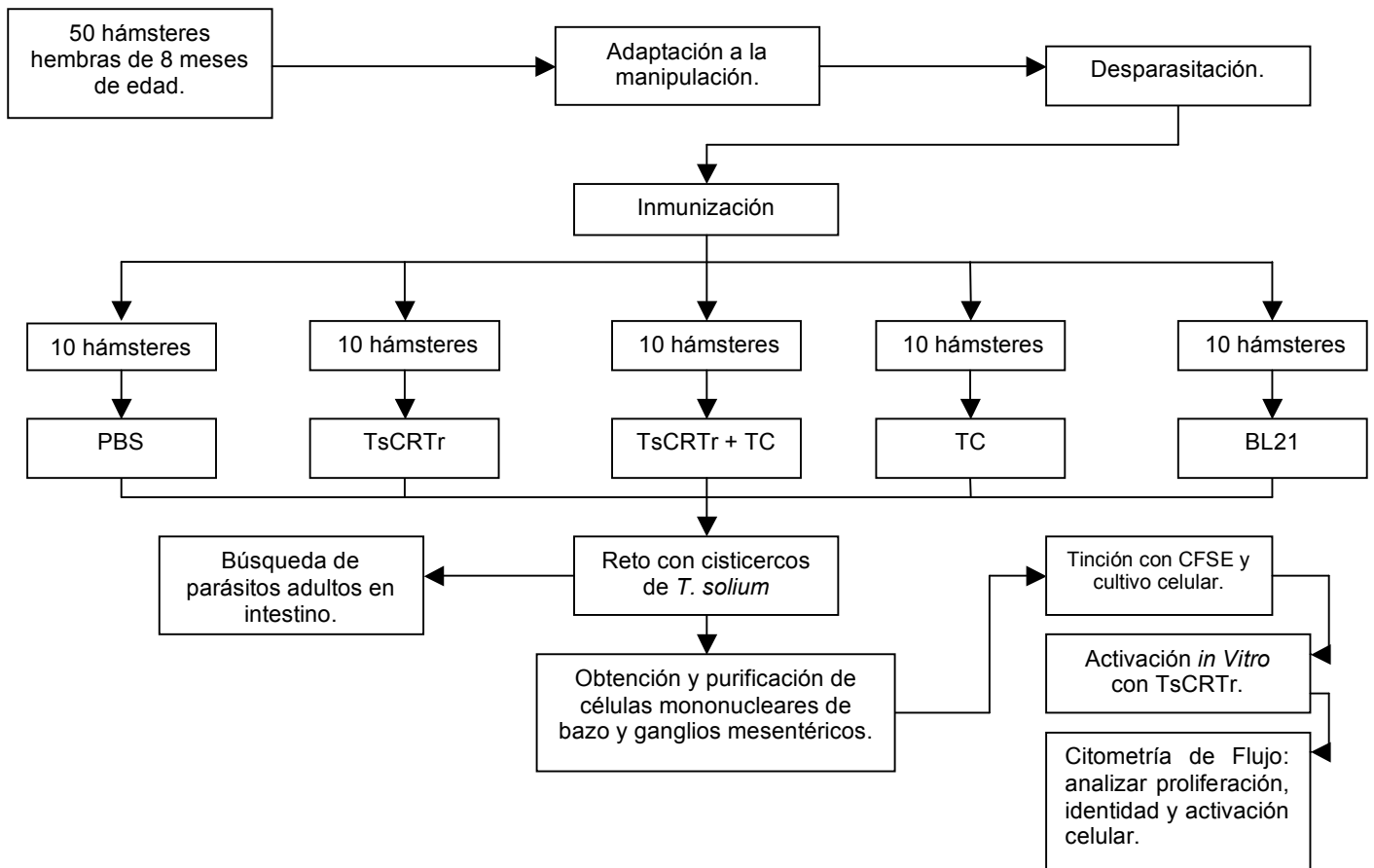


Fig. 6. Plan de trabajo.

7. MATERIALES Y MÉTODOS.

7.1 CF PARA IDENTIFICACIÓN DE ANTICUERPOS DE REACTIVIDAD CRUZADA.

Se recurrió a los laboratorios de inmunología de la Facultad de Medicina y el Instituto de Investigaciones Biomédicas (UNAM), de Investigación del Centro Médico Nacional Siglo XXI (IMSS), de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas y CINVESTAV (IPN) y del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (SSA), para obtener un total de 36 anticuerpos anti-moléculas de activación e identidad celular de humano y ratón para ser probados contra moléculas de hámster.

Se obtuvo sangre periférica de hámsteres (obtenidos del bioterio de la Facultad de Medicina de la UNAM) por punción retroorbital y células de bazo, de las cuales se purificaron las CMN por gradiente de densidad con solución de Ficoll-Hypaque. Las células obtenidas fueron lavadas 2 veces con medio RPMI (Invitrogen, New York, USA) adicionado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (Invitrogen) y centrifugadas a 300 x g por 10min, fueron resuspendidas en el mismo medio y colocadas a razón de 1×10^6 células en tubos para citómetro, a cada uno de los cuales se les adicionó un anticuerpo de prueba diferente o los anticuerpos testigos de isotipo, se incubaron a 37°C por 15 min, se centrifugaron a 300 x g durante 10 min, se lavaron con PBS-azida de sodio (Sigma-Aldrich St. Louis M. USA) al 0.1% (PBA), se decantó el sobrenadante y a las células del sedimento se les adicionó solución fijadora (PBS-paraformaldehído al 1%) y se procedió a su lectura en el citómetro de flujo FACSort de Becton-Dickinson y su análisis en el programa Cell-Quest Pro versión 3.3.

Para identificar moléculas de activación, se cultivaron células a razón de 1×10^6 cels/pozo en placas de 24 pozos con un ml. de RPMI (con 10% de SFB), se les adicionaron los mitógenos fitohemaglutinina (PHA) con 20 y 200 μ l y concanavalina A (Con A) (Invitrogen) a 1 y 10 μ g/ μ l; a las 18 horas se procedió a realizar la tinción

con los anticuerpos correspondientes y a su lectura en el citómetro de flujo. En ambos casos para los ajustes del equipo se usaron células sin tinción y los testigos de isotipo.

7.2 TRATAMIENTO E INMUNIZACIÓN.

Los hámsteres se desparasitaron por vía oral con cánula una semana antes de la infección con 20 mg/kg de metronidazol durante cinco días, 50 mg/kg de mebendazol durante tres días y con una dosis única de 30 mg/kg de praziquantel (100 µg por animal).

Se formaron 5 grupos homogéneos de hámsteres para llevar a cabo la inmunización:

- 1) TsCRTr (100 µg por animal) con TC (10 µg por animal).
- 2) TsCRTr.
- 3) Bacterias control (*E. coli* BL21) no transformadas y procesadas con el mismo protocolo que las bacterias transformadas con TsCRT (100 µg por animal).
- 4) TC (10 µg por animal).
- 5) Vehículo (PBS con bicarbonato de sodio 0.2 M).

El procedimiento de administración se realizó por vía oral con una sonda gástrica, la cual fue introducida por la boca del hámster hasta llegar al estómago, el inmunógeno o el PBS según fuera el caso, se administró por la sonda con ayuda de una jeringa (figura 7). Se dieron un total de cuatro dosis de inmunización a cada animal con diferencia de una semana entre una y otra.

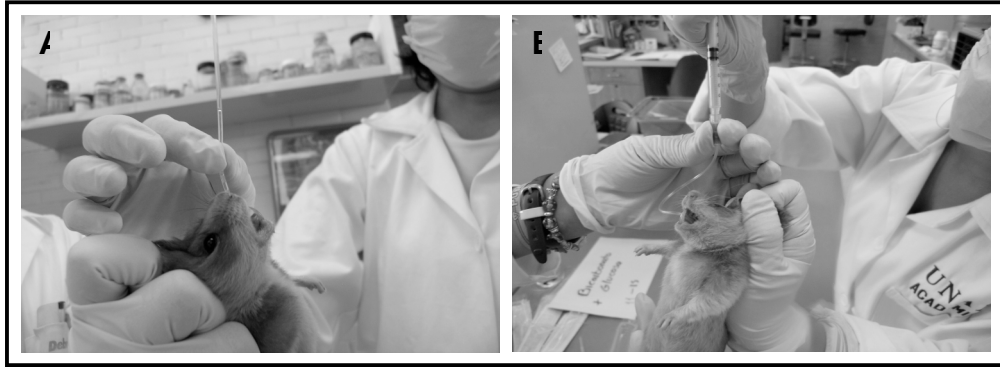


Fig. 7. Procedimiento de inmunización de los hámsteres. A. Introducción de la sonda gástrica. B. Administración del agente inmunógeno a través de la sonda.

7.3 INFECCIÓN CON CISTICERCOS DE *T. solium*

Quince días después de la última inmunización los hámsteres fueron retados con 4 cisticercos de *T. solium* cada uno por vía oral, los cuales se extrajeron del músculo esquelético de cerdos infectados, además, 20 cisticercos fueron probados para determinar su viabilidad mediante la prueba de evaginación *in vitro* utilizando bilis de cerdo al 25% en medio RPMI (Rabiela y col., 2000).

7.4 EVALUACIÓN DEL DESARROLLO DE TENIAS EN INTESTINO DELGADO.

Los animales fueron sacrificados a los 12 días post infección (dpi), se obtuvo el intestino delgado, se colocó en una caja de Petri grande con PBS y se abrió a todo lo largo. Con la ayuda de un microscopio estereoscópico se buscaron las tenias. En los animales donde se encontraron, se lavaron con PBS, se midieron, se registró el número de céstodos encontrados y se evaluaron sus características morfológicas.

7.5 OBTENCIÓN DE CÉLULAS DE BAZO Y GLM.

Para los estudios de proliferación celular y de identificación de marcadores de identidad, se decidió únicamente trabajar con 5 hámsteres de cada grupo ya que el manejo simultáneo de un gran número de cultivos no era factible. De los animales seleccionados, se obtuvieron por separado el bazo y los GLM en condiciones de esterilidad, fueron colocados en un saco de tela de organza y ésta a su vez en una caja de petri con medio RPMI adicionado con 10% de SFB y 10% de antibiótico/antimicótico (penicilina (10000 UI)-estreptomicina(10000 μ g)-anfotericina B (25 μ g), (Invitrogen) en donde los órganos fueron disgregados suavemente con el émbolo de una jeringa.

7.6 PURIFICACIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEARES (CMN) POR GRADIENTE DE DENSIDAD CON FICOLL-HYPAQUE.

El medio de cultivo con la suspensión celular fue colocado con una pipeta en un tubo que contenía 3 ml de solución de Ficoll-Hypaque y se sometió a centrifugación a 2250 x g durante 15 min. Transcurrido ese tiempo, se separaron las células mononucleares (CMN), fueron sometidas a dos lavados con medio RPMI adicionado con 1% de antibiótico/antimicótico a 37°C y centrifugadas a 1600 x g por 10 min para eliminar residuos de solución de Ficoll-Hypaque, se decantaron y resuspendieron en RPMI adicionado con 10% SFB y con 1% de antibiótico/antimicótico y se incubaron a 37°C (células purificadas).

7.7 TINCIÓN CON CFSE Y CULTIVO CELULAR.

Una vez purificadas, las células de bazo y de GLM fueron teñidas con azul de Tripán y contadas en cámara de Neubauer para obtener el número de células purificadas por ml de suspensión y su viabilidad, las células se centrifugaron, se eliminó el medio y se resuspendieron en PBS con 1% de albúmina sérica bovina a razón de 1×10^6 células/ml, se homogenizó la suspensión para eliminar cualquier

agregado. Se adicionaron 2 μ l de CFSE 10 μ M por cada ml de suspensión celular y se incubó a 37°C durante 10 min, después se adicionaron 20 ml de medio RPMI frío y se incubó por 5 min en frío. Trascurrido este tiempo se centrifugó a 400 x g por 5 min, se hizo un lavado con medio RPMI a 37°C y se procedió a colocar 1×10^6 células/ml/pozo en placas cultivo de 24 pozos con medio RPMI adicionado con 10% de SFB y 1% de antibiótico/antimicótico para evitar su contaminación y se incubaron a 37°C.

7.8 ACTIVACIÓN ANTÍGENO-ESPECÍFICA CON TsCRTr.

Las células purificadas de bazo y de GLM de cada animal (1×10^6 células), fueron sometidas a una activación *in vitro* siguiendo el siguiente sistema:

POZO	ESTÍMULO
1	Sin activación (control negativo)
2	PHA (200 μ l, extracto no cuantificado Gibco BRL) (control positivo)
3	TsCRTr (10 μ g) + polimixina (10 μ l a 1 μ g/ μ l) (SIGMA)
4	TsCRTr (10 μ g)
5	BL21 + polimixina (10 μ l a 1 μ g/ μ l)
6	BL21

Después de la activación las células fueron incubadas por 5 días a 37°C en atmósfera de 5% de CO₂.

Se utilizó un sistema sin adición y otro con adición de polimixina para inhibir el probable efecto de contaminación por Lipopolisacárido (LPS) que pudiera llevar la TsCRTr con la que se realizó el estímulo *in vitro*.

7.9 TINCIÓN DE MARCADORES DE IDENTIDAD Y ACTIVACIÓN CELULAR Y LECTURA EN EL CITÓMETRO DE FLUJO.

Se tomó el total de células estimuladas del cultivo y se centrifugaron a 400 x g por 10 min, se decantaron y se lavaron con PBA, decantando nuevamente y adicionando 10 µL del anticuerpo conjugado anti-CD25-biotina. Se dejó incubar por 20 min a 37°C y se realizó un lavado con PBA, se adicionaron 10 µL de los anticuerpos anti-CD4-PE y anti-CD69-PerCP y 10 µL de estreptavidina-Alexa fluor 750 y se incubó nuevamente por 20 min a 37°C. Se hicieron dos lavados con PBA y las células ya marcadas con los anticuerpos, se resuspendieron en un volumen de 350 µL de solución fijadora (PBS-paraformaldehído al 1%). Se procedió a leer las muestras en un citómetro de flujo CyAN de Dako Cytomation y los resultados se analizaron utilizando el programa Summit, Dako Cytomation versión 4.2.

7.10 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

El análisis estadístico fue hecho mediante la prueba t de Student utilizando el programa SPSS versión 10.0.

8. RESULTADOS

8.1 BÚSQUEDA DE ANTICUERPOS DE REACTIVIDAD CRUZADA.

El primer paso en este proyecto fue buscar anticuerpos anti-moléculas de identidad y de activación contra hámster, ya que hasta el momento no existe ningún reactivo comercial para ello. Se analizaron por CF un total de 36 anticuerpos de diferentes especies contra moléculas de identidad y de activación en células de bazo y sangre periférica de hámster de los cuales tres (todos contra moléculas de ratón) respondieron positivamente a la reacción; uno contra el marcador de identidad de linfocitos T cooperadores (α -CD4 PE), y dos contra marcadores de activación, temprana (α -CD69 PerCP) y tardía (α -CD25 biotina). En la tabla 1 se muestran las marcas comerciales y las clonas de estos anticuerpos, así como todos los anticuerpos que fueron probados en busca de reactividad cruzada y que dieron resultado negativo.

En la figura 8 se muestra una gráfica de tamaño vs granularidad en la que se encuentra seleccionada la región correspondiente a los linfocitos y a partir de la cual se generó una gráfica *dot plot* para la búsqueda de marcadores de identidad y de activación, en ésta última se muestran los porcentajes de células identificadas con el anticuerpo anti-CD4 PE anti-ratón, este proceso se llevó a cabo en células de sangre periférica (SP) de hámster, las cuales se estimularon *in vitro* con fitohemaglutinina (PHA) y concanavalina A a diferentes concentraciones. Se observó que el mejor activador policlonal fue la PHA (200 μ l) ya que con esta cantidad fue posible identificar a los marcadores de activación CD25 y CD69 (figura 9); este resultado no solo nos permitió identificar a estos marcadores, sino también establecer a la PHA como control positivo de activación en los experimentos de proliferación celular, los cuales se leyeron en el citómetro de flujo FACSsort de Becton.Dickinson 18 horas después de la estimulación.

Tabla 1. Anticuerpos anti-moléculas de ratón (R) y humano (H) probados en busca de reactividad cruzada anti-hámster. Se resaltan en sombreado los anticuerpos positivos.

ANTICUERPO	MARCA Y DILUCIÓN	CLONA (ISOTIPO)	RESULTADO
α -CD20 H PE	BD (1:100)	L27 (Ms IgG ₂ b)	X
α -CD32 H FITC	BD (1:100)		X
α -CD54 H FITC	INMUNOTECH (1:100)	84H10	X
α -H2-D ^d R PE	BD PHARMINGEN (1:100)	34-2-12 (Ms IgG ₂ a)	X
α -Thy-1 PE	HIBRIDOMA 10 μ l	-----	X
α - CD25 R PerCP Cy5	BD (1:200)	PC61 (Rat IgG ₁)	X
α - CD25 R BIOTINA	PHARMINGEN (1:200)	7D4 (Rat IgG ₁)	si
α - CD69 R BIOTINA	PHARMINGEN (1:100)	H1.2F3 (ArHam IgG ₁ I3)	X
α -CD69 R PerCP	PHARMINGEN (1:200)	H1.2F3 (ArHam IgG ₁ I3)	si
α -CD69 R Cy7 FITC	BD BIOSCIENCES (1:100)	H1.2F3 (ArHam IgG ₁ I3)	X
α -B220 R PE	HIBRIDOMA 10 μ l	-----	X
α -M3-84 R PE	HIBRIDOMA 10 μ l	-----	X
α -NK R FITC	HIBRIDOMA 10 μ l	-----	X
α -CD45 R PerCP	PHARMINGEN (1:100)	RA3-6B2 (Rat IgG ₂ a)	X

Tabla 1 (cont). Anticuerpos anti-moléculas de ratón (R) y humano (H) probados en busca de reactividad cruzada anti-hámster. Se resaltan en sombreado los anticuerpos

ANTICUERPO	MARCA	CLONA (ISOTIPO)	RESULTADO
α -CD3e R APC	PHARMINGEN (1:100)	145-2C11 (ArHam IgG ₁)	X
α -CD3 R FITC	BD-PHARMINGEN (1:100)	17A2 (Rat IgG ₂ b)	X
α -CD3 H FITC	DIATEC (10 μ l)	UCTH-1 (Ms IgG ₁)	X
α -CD3 H PE	BD (10 μ l)	UCTH-1 (Ms IgG ₁)	X
α -CD3 H APC x 750	PHARMINGEN (10 μ l)	UCTH-1 (Ms IgG ₁)	X
α -CD4 R FITC	PHARMINGEN (1:200)	GK1.5 (Rat IgG ₂ b)	X
α -CD4 R PE	PHARMINGEN (1:200)	H129.19 (Rat IgG ₂ a)	si
α -CD4 H PE	BD-PHARMINGEN (5 μ l)	RPA-T4 (Ms IgG ₁)	x
α -CD8 R PE Cy5	PHARMINGEN (1:200)	53-6.7 (Rat IgG ₂ a)	X
α -CD8a R PE	SEROTEC (1:200)	KT15 (Ms IgG ₂ a)	X
α -CD8 H PE	BD (5 μ l)	HIT8a (Ms IgG ₁)	X
α -CD8 R FITC	BD (1:200)	53-6.7 (Rat IgG ₂ a)	X

Tabla 1 (cont). Anticuerpos anti-moléculas de ratón (R) y humano (H) probados en busca de reactividad cruzada anti-hámster. Se resaltan en sombreado los anticuerpos

ANTICUERPO	MARCA	CLONA (ISOTIPO)	RESULTADO
α -CD8 H PE-Cy7	PHARMINGEN (5 μ l)	53-6.7 (Rat IgG _{2a})	X
α -CD8a R APC Ly-2	eBIOSCIENCE (1:200)	53-6.7 (Rat IgG _{2a})	X
α -CD8 R APC-Cy7	BD-PHARMINGEN (1:100)	53-6.7 (Rat IgG _{2a})	X
α -CD8 R PE Cy5	BD-PHARMINGEN (1:100)	53-6.7 (Rat IgG _{2a})	X
α -CD19 R PE ID3	PHARMINGEN (1:100)	1D3 (Rat IgG _{2a})	X
α -CD19 R FITC	BD-PHARMINGEN (1:100)	1D3 (Rat IgG _{2a})	X
α -CD19 R APC	BD (1:100)	1D3 (Rat IgG _{2a})	X
α -CD19 H FITC	DIATEC (5 μ l)	AE1 (Ms IgG ₁)	X
α -CD19 H FITC	BD BIOSCIENCES (5 μ l)	4G7 (Ms IgG ₁)	X
α -CD19 H FITC	SEROTEC (5 μ l)	LT9 (Ms IgG ₁)	X

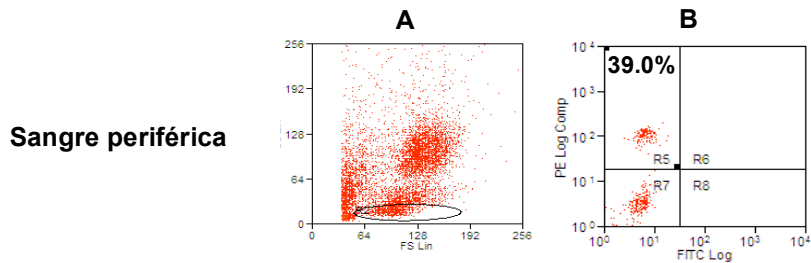


Fig. 8. Análisis por CF de CMN de sangre periférica. (A) Gráfica de tamaño vs granularidad en la que se encuentra seleccionada la región de los linfocitos (R2) y a partir de la cual se obtuvo una gráfica dot-plot (B) donde se observa el porcentaje de la población de células CD4+ (R5) identificados con el anticuerpo de reactividad cruzada anti-ratón acoplado a ficoeritrina (PE).

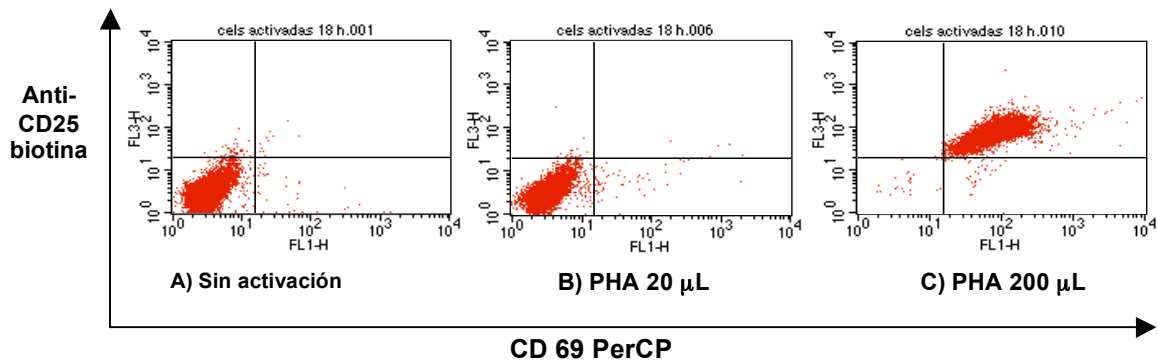


Fig. 9. Gráfica dot-plot de la identificación de moléculas de activación marcadas con anticuerpos anti-CD25 biotina-estreptavidina-FITC y anti-CD69 PerCP de ratón en células de bazo de hámster. (A) Células sin activación, (B) Células activadas con 20 µl de PHA, (C) Células activadas con 200 µl de PHA

8.2 EVALUACIÓN DEL DESARROLLO DE TENIAS EN INTESTINO DELGADO DE HÁMSTER TRAS LA VACUNACIÓN CON TsCRTr.

Una vez identificados los reactivos, se procedió a realizar las inmunizaciones con TsCRTr y el reto con cisticercos viables para evaluar la respuesta inmune celular a la vacunación. Quince días después del reto con cisticercos (los cuales presentaron una viabilidad del 100% en la prueba de evaginación en bilis al 25% en RPMI, datos no mostrados), se realizó el sacrificio de los animales y se procedió a la obtención de las células de bazo y GLM. Simultáneamente, el grupo de laboratorio procedió a la búsqueda de tenias adultas en el intestino delgado, en los casos en que eran encontradas, se contaron, se midieron, se observó el sitio de anclaje en el intestino y se tomaron muestras de suero para medir niveles de anticuerpos y de tejido para identificar marcadores *in situ*.

El grupo que participa en el proyecto realizó un análisis para determinar los porcentajes de recuperación de parásitos en grupos de 10 animales como una medida del grado de protección conferido por la vacunación con TsCRTr (tabla 2), para establecer una correlación entre las observaciones macroscópicas y los porcentajes de activación y proliferación obtenidos. El efecto de la vacunación con TsCRTr dio como resultado un menor número de tenias recuperadas en los grupos de hámsteres vacunados tanto con adyuvante como sin adyuvante con respecto a los grupos no inmunizados, tratado únicamente con adyuvante y tratado con bacterias BL-21 sin transformar (denominado vector vacío (V.V)) (figura 10).

Una observación muy importante es que las tenias recuperadas de los grupos inmunizados presentaron un tamaño menor y con localización más alejada del estómago que en los otros grupos de animales (inmunizados con TC, V.V y diluyente), (figuras 11 y 12).

Tabla 2. Resultados de la búsqueda de tenias adultas en intestino delgado de los hámsteres.

Vacunación	# Animales	# de tenias recuperadas por hámster	# de tenias $P \pm DS$	Longitud tenias (mm) $P \pm DS$	Localización (cm) $P \pm DS$	% Recup.
TsCRT + TC	10	2,2,2,2,2,2,2,2,4	2.2 ± 0.66	$6.1 \pm 12.2^*$	$9,38 \pm 2,16$	55
TsCRT	10	0,1,1,2,2,2,2,3,3,3	1.9 ± 0.99	2.1 ± 0.45	$9,16 \pm 2,24$	47.5
TC	10	1,2,2,2,3,3,3,3,4,4	2.7 ± 0.94	$4.6 \pm 7.36^*$	$7,26 \pm 1,37$	67.5
Bacterias sin trans. (V.V)	10	0,3,3,3,3,4,4,4,4,4	3.2 ± 1.22	$5.9 \pm 11.5^*$	$7,36 \pm 1,64$	80
Diluyente	10	1,1,3,3,3,3,4,4,4,4	3.0 ± 1.15	$11.7 \pm 25.9^*$	$7,48 \pm 2,57$	75

Localización: Indica la localización de la primera tenia encontrada y es la distancia en el intestino delgado entre ésta y el estómago.

% Recuperación: Porcentaje de tenias recuperadas en los hámsteres después de infectarlos con 4 cisticercos.

P: Promedio.

DS: Desviación estándar.

*. Indica que dada la variación, no son resultados estadísticamente significativos.

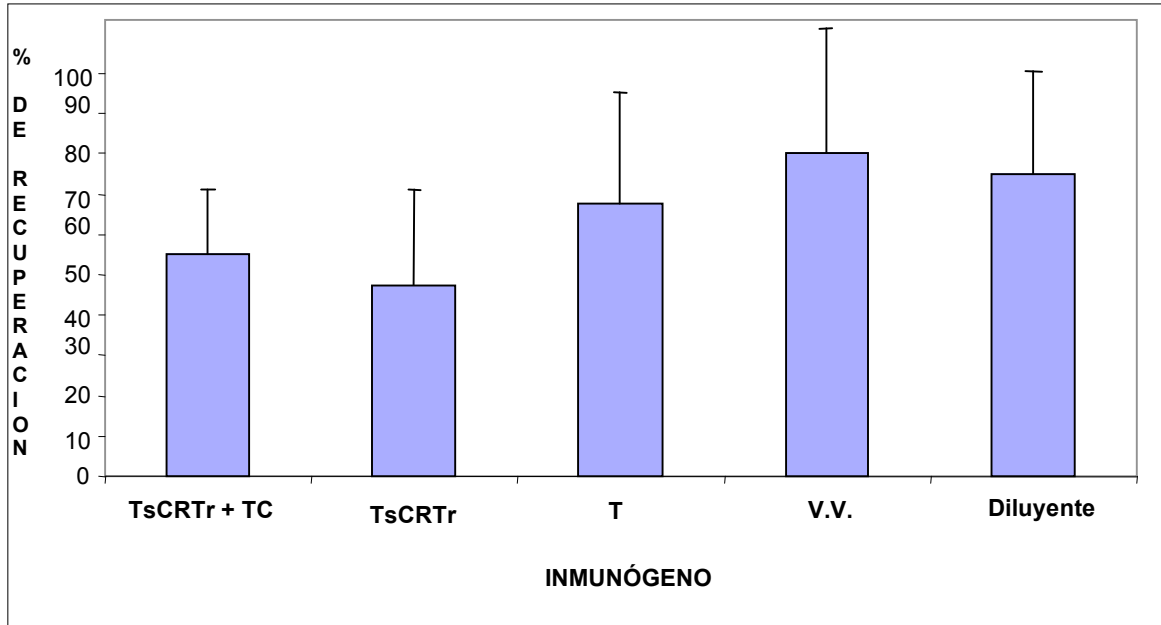


Fig. 10. Gráfica de barras de los porcentajes de recuperación de tenias adultas del intestino delgado de hámsteres no vacunados (PBS) y vacunados con los diferentes inmunógenos.

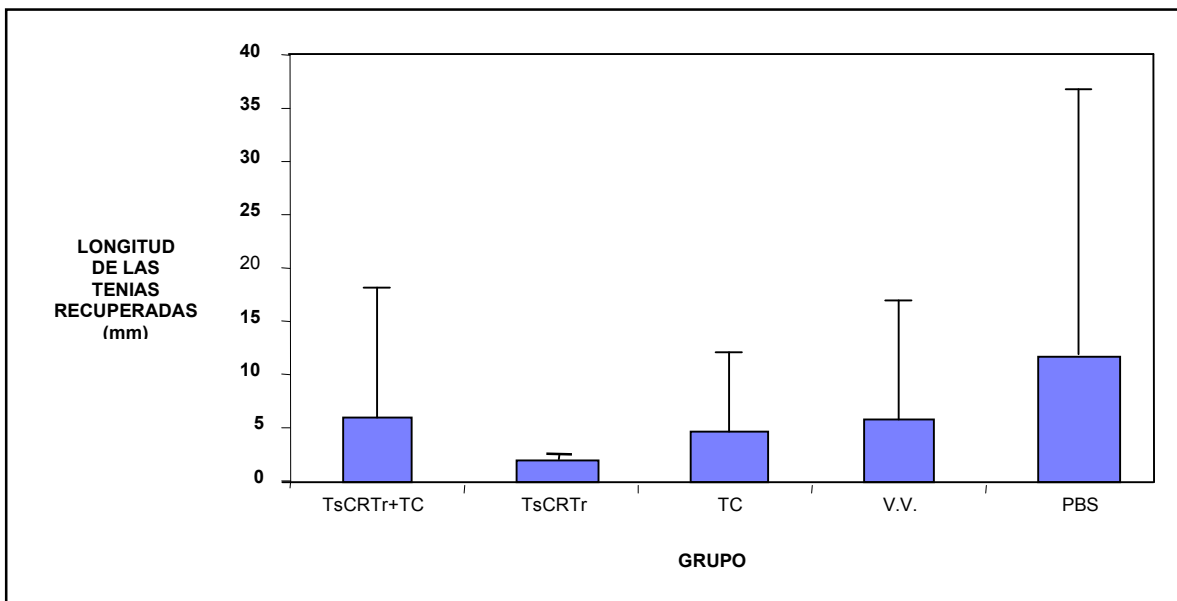


Fig. 11. Gráfica de barras en la que se observa la longitud de las tenias adultas recuperadas del intestino delgado de hámsteres no vacunados (PBS) y vacunados con los diferentes inmunógenos.

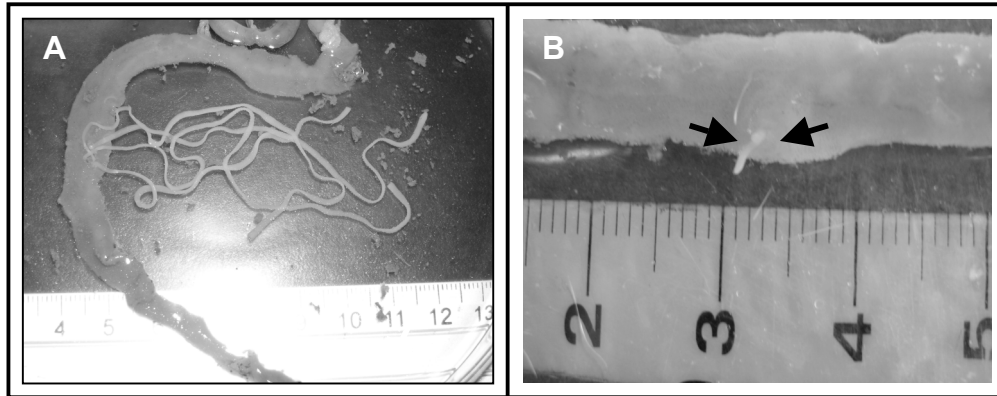


Fig. 12. Recuperación de tenias de hámsteres vacunados y no vacunados con TsCRTr. (A) Intestino de un hámster no vacunado (se le administró PBS) y en el que se encontraron cuatro tenias adultas que alcanzaron más de 11 cm de longitud; (B) Segmento del intestino de un hámster vacunado con TsCRTr y que presenta anclada una tenia poco desarrollada, el tamaño alcanzado por ésta no fue mayor de 0.5 cm.

8.3 EVALUACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR.

Para el análisis de la proliferación celular se realizaron tinciones directas con CFSE a las CMN obtenidas de bazo y de GLM de hámsteres vacunados (TsCRTr, TsCRTr + TC, TC y BL21) y no vacunados (PBS) inmediatamente después de ser purificadas; 24 horas después (para permitir la adaptación al cultivo y la estabilización de las membranas) fueron sometidas a una activación antígeno-específica *in vitro* con diferentes estímulos inmunogénicos (PHA, TsCRTr, V.V, V.V + polimixina y TsCRTr + polimixina); 5 días después, las células fueron teñidas con los anticuerpos contra moléculas de identidad y activación celular y se realizó el análisis de las células en un citómetro de flujo CyAN (Dako Cytomation) empleando el programa Summyt 4.2.

Para el análisis de la población celular en el citómetro de flujo se obtuvieron gráficas de puntos (*dot-plot*), en las que se evaluó el tamaño (FSC) contra la granularidad celular (SSC) (figura 13) y se procedió a marcar la región en donde se concentran los linfocitos tanto en estado basal como en proliferación (R11). En

la figura representativa, se observan en la columna de la izquierda, gráficos de células de bazo y en la de la derecha de GLM obtenidas del hámster número 4, el cual fue inmunizado con TsCRTr y retado con cisticercos, se presentan los porcentajes de células en la región

Tanto en células de bazo como de GLM se observa un incremento en el número y tamaño de las células (20.6% y 28.64% respectivamente) con el activador policlonal PHA, en tanto que en las que no recibieron ningún estímulo *in vitro*, no se observa este efecto, (2.04% y 1.40% respectivamente); la activación antígeno-específica con TsCRTr sin polimixina permite observar un porcentaje de 3.96% y 8.78% respectivamente, en tanto que la activación con TsCRTr más polimixina dio índices menores que en el caso anterior, del 2.63% y 4.23%; la activación con V.V. solo o con polimixina no dio lugar a un incremento de tamaño y número de células (menos del 2.04% en todos los casos).

En las tablas 3 y 4 se muestran los valores obtenidos de cada hámster analizado y el promedio \pm la DS, a partir de estos, se realizó el análisis comparativo para evaluar el incremento de tamaño y número de células de la población señalada, como un indicador de activación antígeno-específica a los diferentes estímulos *in vitro*. En la figura 14 se observa que en células de bazo existió una respuesta de aumento de tamaño celular (referido como % de activación en el eje de las ordenadas) estadísticamente significativo ($p=0.002$) entre el grupo estimulado con TsCRTr con respecto al no estimulado. Sin embargo, esta respuesta no fue significativa entre el grupo estimulado con TsCRTr más polimixina y el grupo no estimulado ($p=0.1$). En los GLM (figura 15), la respuesta de aumento de tamaño celular al estímulo con TsCRTr sola ($p=0.001$) o con polimixina ($p=0.001$) fue mayor y estadísticamente significativo con respecto a las células no estimuladas. Los porcentajes de activación en las células estimuladas con V.V y V.V+polimixina son similares a los de las células sin estímulo.

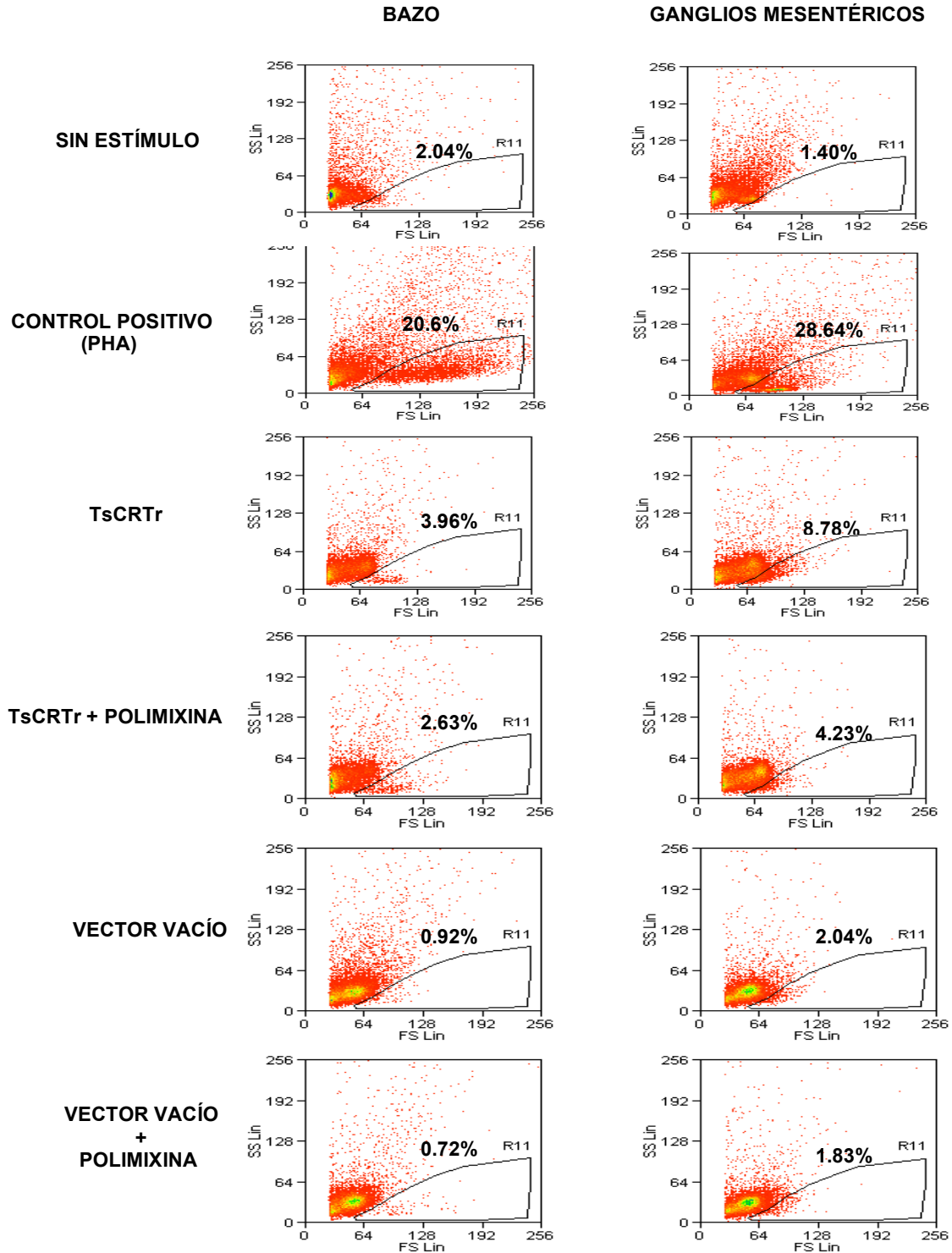


Fig. 13. Gráficas Dot-plot de tamaño contra granularidad de células de bazo y de GLM de hámsteres vacunados con TsCRTr y estimulados *in vitro* con los diferentes agentes inmunógenos señalados. R11 indica la región de células que presentan aumento de tamaño, con sus porcentajes en cada caso.

Tabla 3. Valores de los % de activación de las células de bazo de los hámsteres inmunizados con TsCRTr en respuesta a estímulos in Vitro.

HÁMSTER	% DE ACTIVACIÓN IN VITRO					
	PHA	SIN ESTÍMULO	TsCRTr +P	TsCRTr	V.V + P	V.V
1	29.16	1.02	2.42	3.01	0.46	1.12
2	32.50	2.35	1.65	2.76	0.92	0.76
3	19.20	1.85	1.98	3.78	0.23	0.57
4	20.60	2.04	2.63	3.96	0.72	0.92
5	13.30	0.84	2.72	4.39	0.82	0.98
Promedio	22.95	1.62	2.28	3.58	0.63	0.87
+/- D. S.	7.78	0.65	0.45	0.68	0.28	0.21

Tabla 4. Valores de los % de activación de las células de GLM de los hámsteres inmunizados con TsCRTr en respuesta a estímulos in Vitro.

HÁMSTER	% DE ACTIVACIÓN IN VITRO					
	PHA	SIN ESTÍMULO	TsCRTr +P	TsCRTr	V.V + P	V.V
1	31.62	1.78	4.63	9.92	1.46	1.36
2	24.91	1.82	6.41	8.86	1.92	2.24
3	37.56	2.01	5.15	7.28	2.02	1.92
4	27.83	0.92	4.23	8.78	1.83	2.04
5	21.28	1.27	4.30	8.66	1.62	1.74
Promedio	28.64	1.4	4.92	8.70	1.77	1.86
D. S.	6.26	0.48	0.89	0.94	0.23	0.33

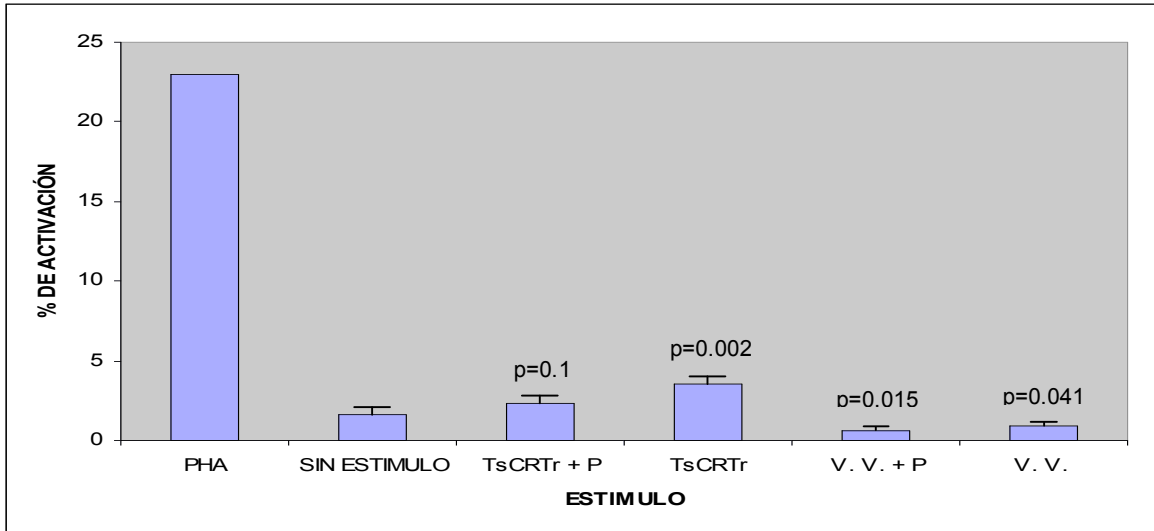


Fig. 14. Gráfica de barras de los porcentajes de activación de células de bazo de cinco hámsteres inmunizados con TsCRT, la estimulación *in vitro* con TsCRT indujo una activación de CMN estadísticamente significativa ($p=0.002$) con respecto a las no estimuladas. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba t de Student.

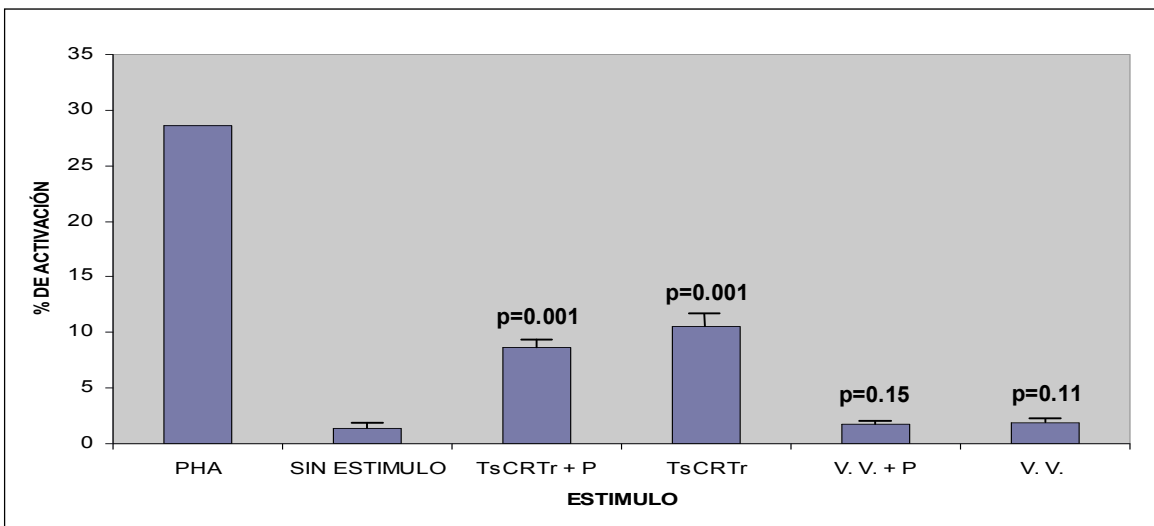


Fig. 15. Gráfica de barras de los porcentajes de activación de células de GLM de cinco hámsteres inmunizados con TsCRT, la estimulación *in vitro* con TsCRT indujo una activación de CMN estadísticamente significativa con respecto a las no estimuladas. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba t de Student.

Para ver si la TsCRTr da lugar a la activación específica y proliferación celular, se realizaron tinciones con CFSE y se analizaron por CF tanto las células de bazo como las de GLM comparando los ciclos de proliferación inducidos y los porcentajes de células en proliferación entre los grupos de hámsteres que fueron tratados. A partir de la región R11 en el *dot plot* de la figura 13, se hicieron histogramas en los que se analizó el porcentaje de CMN que proliferaron. En las figuras 16 y 17 se muestran histogramas representativos de los porcentajes de proliferación celular y del número de ciclos celulares inducidos en células de bazo y de GLM respectivamente, de un hámster no inmunizado y estimuladas *in vitro* con PHA, con TsCRTr o no estimulados, comparado con un hámster inmunizado y estimulado *in vitro* bajo las mismas condiciones; en este ejemplo se puede observar que existe una mayor proliferación celular en el hámster vacunado y estimulado *in vitro* con TsCRTr (14.6 % en bazo y 17.2% en GLM), con respecto al hámster no vacunado y posteriormente estimulado también con la TsCRTr *in vitro* (5.2% en bazo y 6.1% en GLM). Al comparar el porcentaje de proliferación del hámster vacunado pero sin ningún estímulo *in vitro* se observa también una menor cantidad de células en proliferación (4.4% y 12.8%, respectivamente).

Utilizando este mismo modelo de comparación, al incluir todos los hámsteres de cada grupo (tabla 5) observamos que en células de bazo existió una diferencia estadísticamente significativa ($p=0.013$) entre los valores promedio de proliferación (VPP) entre el grupo vacunado y estimulado con TsCRTr (VPP= 9.22%) comparando contra el grupo no vacunado y estimulado con TsCRTr (VPP= 2.9%). De igual manera hay una diferencia ($p=0.025$) dentro de este grupo vacunado al comparar entre las células estimuladas (VPP=9.22) y las no estimuladas (VPP= 2.64%). En los GLM (tabla 6) se observa que no hubo diferencia significativa ($p=0.111$) entre los VPP del grupo vacunado y estimulado con TsCRTr (VPP= 10%) comparando contra el grupo no vacunado y estimulado con TsCRTr (VPP= 5%), lo mismo se detectó entre el sistema de células no estimulado y el estimulado dentro del mismo donde tampoco existió una diferencia significativa ($p=0.197$).

El análisis de células de bazo del grupo vacunado con TsCRTr y estimulado *in vitro* con TsCRTr+P (VPP= 6.4%) comparado contra el grupo no vacunado y estimulado con TsCRTr+P (VPP= 2.78%) no presenta diferencia significativa ($p=0.079$), tampoco la hay ($p=0.073$) dentro del grupo vacunado al comparar entre las células estimuladas y las no estimuladas (VPP= 2.64%). Este mismo comportamiento se puede observar en células de GLM con $p=0.114$ y $p=0.521$, respectivamente. En las figuras 18 y 19 se esquematizan los VPP de cada uno de los grupos tanto vacunados como no vacunados y estimulados *in vitro*; se señala con un rombo donde existe diferencia estadísticamente significativa comparando el grupo no vacunado contra los grupos vacunados y estimulados como se señala en cada caso y con un asterisco cuando existe diferencia significativa comparando la estimulación *in vitro* contra las células no estimuladas dentro del mismo grupo con una $p \leq 0.05$.

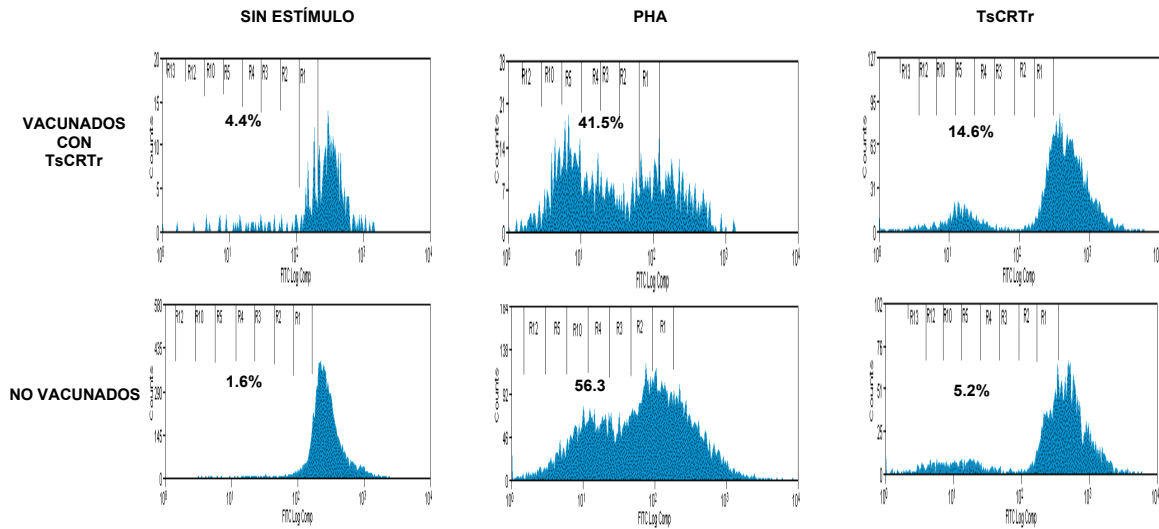


Fig. 16. Análisis de proliferación de células mononucleares de bazo de un hámster vacunado con TsCRTr y otro no vacunado, ambos grupos fueron estimulados *in vitro* con PHA y con TsCRTr, las células fueron identificadas por incorporación del colorante CFSE.

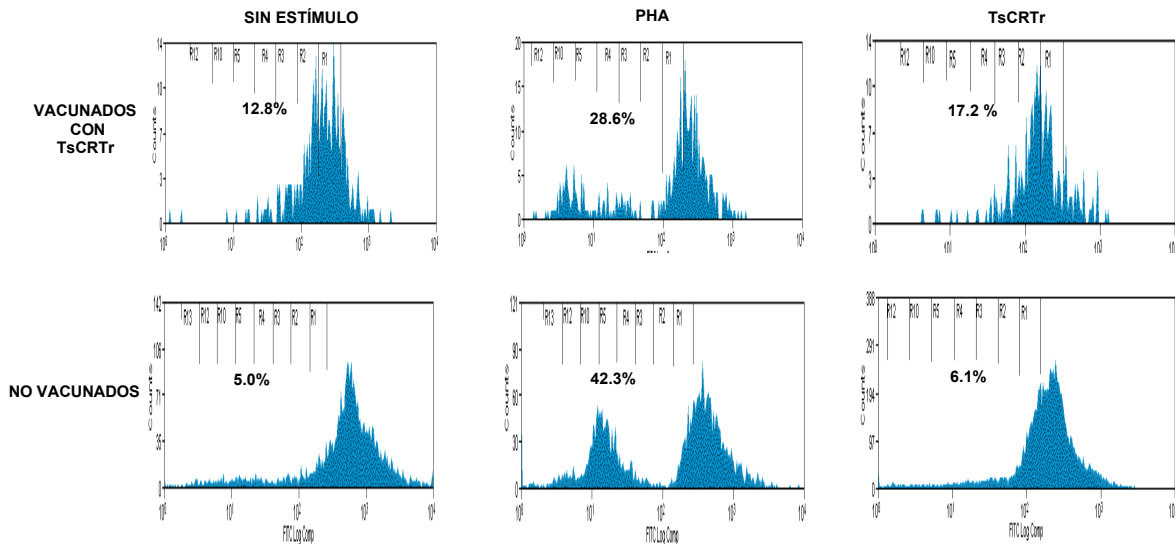


Fig. 17. Análisis de proliferación de células mononucleares de GLM de un hámster vacunado con TsCRTr y otro no vacunado, ambos grupos fueron estimulados *in vitro* con PHA y con TsCRTr, las células fueron identificadas por incorporación del colorante CFSE.

Tabla 5. Porcentaje de proliferación de células de bazo en respuesta al estímulo *in vitro*.

INMUNÓGENO	HÁMSTER	PROLIFERACIÓN CELULAR (%) AL ESTÍMULO IN VITRO:					
		PHA	S/E	TsCRTr	TsCRTr+P	V. V.	V.V.+P
PBS (CONTROL)	1	56.3	1.6	5.2	4.8	4.9	3.9
	2	62.5	1.2	2.9	2.3	5.9	3.8
	3	56.9	0.4	1.3	0.5	2.1	1.4
	4	42.7	2.4	4.3	4.0	5.4	3.8
	5	49.3	3.7	0.9	2.3	1.34	1.1
	Promedio (+/- DS)	53.5 (7.6)	1.9 (1.2)	2.9 (1.8)	2.78 (1.67)	3.92 (2.0)	2.8 (1.4)
TsCRTr	1	41.5	4.4	14.6	9.2	12.3	7.1
	2	48.1	0.3	2.1	1.3	6.1	5.4
	3	57.7	3.2	6.7	4.8	3.2	2.7
	4	64.3	1.2	9.5	6.2	7.8	0.1
	5	71.4	4.1	13.2	10.5	14.3	9.9
	Promedio (+/- DS)	56.6 (12.0)	2.64 (1.8)	9.22 (5.0)	6.4 (3.6)	8.74 (4.5)	5.0 (3.8)
TsCRTr+TC	1	59.2	4.9	15.3	10.7	12.8	5.1
	2	65.3	5.3	8.5	8.0	8.9	11.9
	3	70.2	3.6	4.2	3.9	9.6	6.3
	4	51.9	1.2	6.7	4.1	10.2	8.3
	5	49.6	0.5	11.9	5.5	8.6	2.1
	Promedio (+/- DS)	59.24 (8.7)	3.1 (2.1)	9.32 (4.3)	6.1 (3.2)	10.0 (1.7)	6.7 (3.6)
TC	1	50.9	3.4	7.4	6.8	9.3	2.0
	2	38.1	7.9	6.3	5.1	7.2	6.4
	3	45.3	4.2	4.2	3.8	5.9	4.5
	4	57.9	0	1.6	3.8	13.6	10.6
	5	48.6	2.1	0.8	1.4	4.8	2.5
	Promedio (+/- DS)	48.2 (7.3)	3.34 (2.6)	4.06 (2.8)	4.18 (1.9)	8.16 (3.4)	5.2 (3.5)
VECTOR VACÍO	1	62.1	2.8	5.2	4.6	12.9	9.7
	2	67.9	1.4	4.2	3.2	6.9	5.2
	3	73.1	0.5	0.9	1.6	9.7	6.4
	4	48.4	2.9	3.1	2.8	16.3	12.7
	5	64.5	7.9	6.9	4.8	7.5	4.8
	Promedio (+/- DS)	63.2 (9.2)	3.1 (2.8)	3.88 (2.0)	3.44 (1.3)	10.66 (3.9)	7.76 (3.4)

Tabla 6. Porcentaje de proliferación de células de GLM en respuesta al estímulo *in vitro*.

INMUNÓGENO	HÁMSTER	PROLIFERACIÓN CELULAR (%) AL ESTÍMULO IN VITRO:					
		PHA	S/E	TsCRTr	TsCRTr+P	V. V.	V.V.+P
PBS (CONTROL)	1	42.3	5.0	6.1	4.6	7.2	6.0
	2	56.3	2.1	7.6	3.9	8.1	7.4
	3	48.1	0.4	4.2	4.8	5.9	3.0
	4	54.0	5.2	1.5	0.9	4.2	3.1
	5	39.2	3.8	5.8	4.6	7.4	5.8
	Promedio (+/- DS)	47.9 (7.3)	3.3 (2.0)	5.0 (2.3)	3.7 (1.6)	6.6 (1.5)	5.1 (1.9)
TsCRTr	1	28.6	12.8	17.2	13.5	22.4	17.6
	2	56.2	1.3	2.6	4.9	12.7	9.1
	3	48.6	2.7	8.4	4.8	5.6	1.3
	4	52.7	4.2	14.3	9.2	11.9	10.5
	5	47.3	6.1	7.6	3.8	6.9	0.7
	Promedio (+/- DS)	46.7 (10.7)	5.4 (4.5)	10.0 (5.7)	7.2 (4.1)	11.9 (6.6)	7.8 (7.0)
TsCRTr+TC	1	62.8	6.5	14.2	7.4	14.7	3.2
	2	47.5	4.3	7.8	5.4	9.2	6.6
	3	27.6	0.4	0.9	0.7	2.7	1.5
	4	39.7	2.1	8.3	4.3	7.1	5.7
	5	56.3	5.4	9.7	6.8	12.3	9.3
	Promedio (+/- DS)	46.8 (13.8)	3.74 (2.5)	8.2 (4.8)	4.9 (2.6)	9.2 (4.6)	5.26 (3.0)
TC	1	37.5	2.1	6.7	4.6	9.7	6.9
	2	49.2	0.2	5.3	4.8	4.6	3.2
	3	53.8	0.0	3.1	2.3	3.8	4.3
	4	56.7	4.5	8.6	6.7	10.5	7.4
	5	43.1	8.5	12.4	9.5	16.9	11.9
	Promedio (+/- DS)	48.1 (7.8)	3.1 (3.5)	7.2 (3.5)	5.6 (2.7)	9.1 (5.3)	6.7 (3.4)
VECTOR VACÍO	1	58.3	2.8	5.9	4.2	2.1	0
	2	53.1	3.1	7.4	3.8	4.8	1.6
	3	49.7	1.5	6.3	4.6	17.4	15.3
	4	43.6	0.6	4.8	2.1	8.4	7.3
	5	52.2	0.2	9.7	5.7	6.7	3.8
	Promedio (+/- DS)	51.4 (5.3)	1.6 (1.3)	6.8 (1.8)	4.1 (1.3)	7.9 (5.8)	5.6 (6.1)

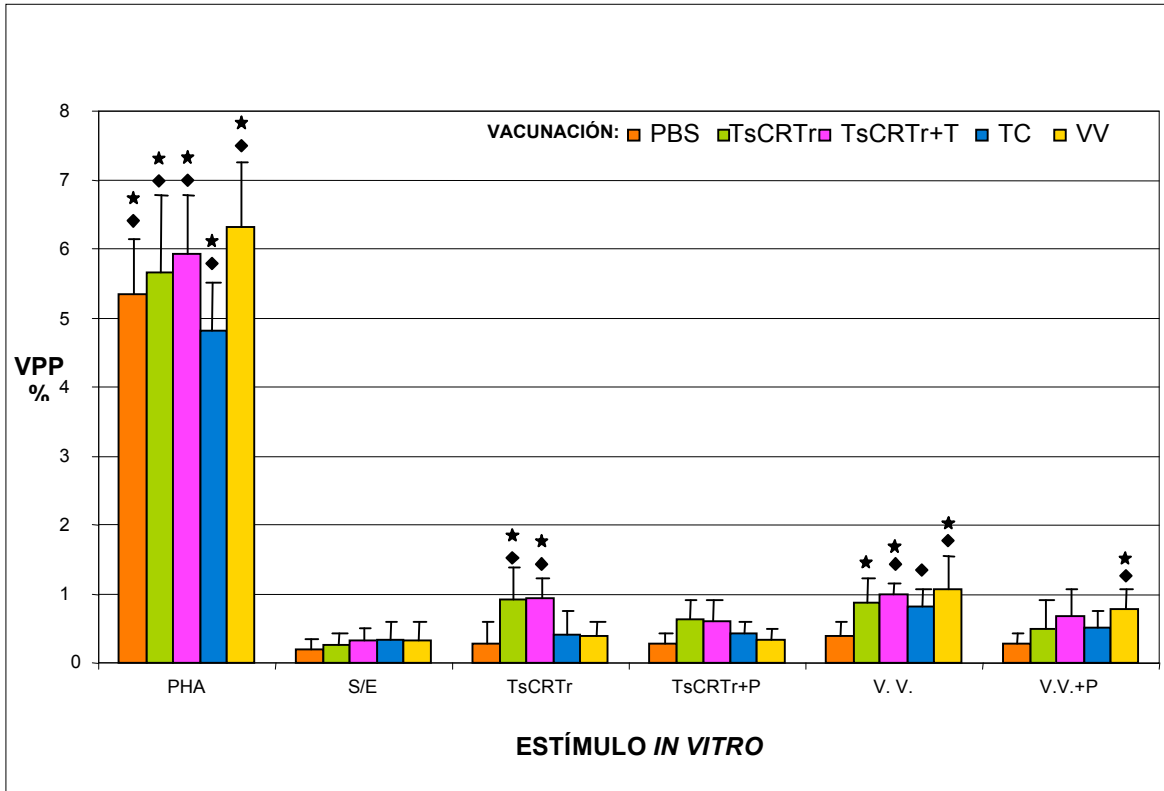


Fig. 18. Valores promedio de proliferación (VPP) de células de bazo de hámsteres vacunados con TsCRT, TsCRT+P, TC y VV y no vacunados, activados *in vitro* con diferentes estímulos. El análisis estadístico se llevó a cabo con la prueba t de Student con una $p \leq 0.05$; se señala con un rombo donde existe diferencia estadísticamente significativa comparando el grupo no vacunado contra los grupos vacunados y estimulados como se señala en cada caso y con un asterisco cuando existe diferencia significativa comparando la estimulación *in vitro* contra las células no estimuladas dentro del mismo grupo.

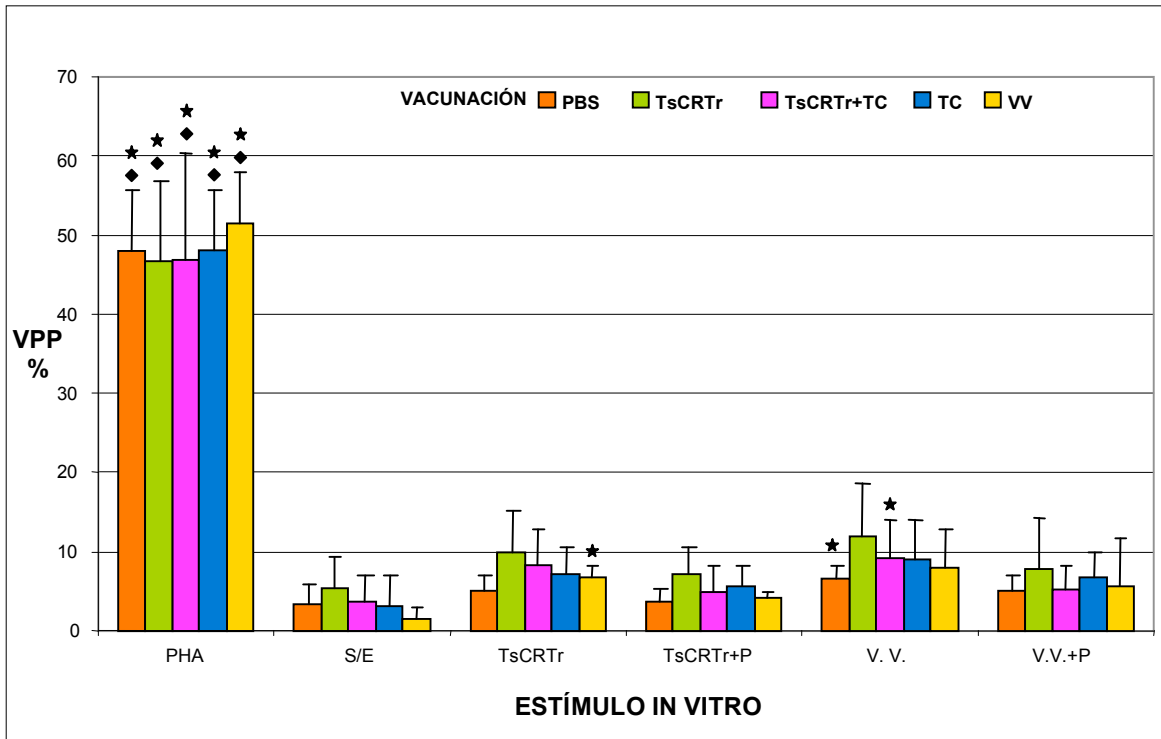


Fig. 19. Valores promedio de proliferación (VPP) de células de GLM de hámsteres vacunados con TsCRTr, TsCRTr+P, TC y VV y no vacunados, activados *in vitro* con diferentes estímulos. El análisis estadístico se llevó a cabo con la prueba t de Student con una $p \leq 0.05$; se señala con un rombo donde existe diferencia estadísticamente significativa comparando el grupo no vacunado contra los grupos vacunados y estimulados como se señala en cada caso y con un asterisco cuando existe diferencia significativa comparando la estimulación *in vitro* contra las células no estimuladas dentro del mismo grupo.

8.4 EVALUACIÓN DE MARCADORES DE IDENTIDAD

Con los anticuerpos de reactividad cruzada que se identificaron, se procedió a evaluar el porcentaje de las CMN que correspondían a los linfocitos CD4 y en que proporción proliferó esta población de manera antígeno-específica. Cinco días después de la activación, las CMN previamente marcadas con CFSE, se tiñeron directamente con el anticuerpo anti-CD4 y se analizaron por CF. En las tabla 7 y 8 se presentan los porcentajes de células CD4+ en bazo y en GLM, respectivamente, se muestran los porcentajes totales identificados con el anticuerpo de reactividad cruzada y los porcentajes de la población que se encontró proliferando, medidos por incorporación de CFSE.

Con el anticuerpo anti-CD4 contra ratón se identificó un promedio de entre 43 y 45% de linfocitos T CD4+ en células de bazo (tabla 7) de los 5 hámsteres analizados; en las células no estimuladas *in vitro* se identificó un promedio de 7.9% células CD4+ en estado de proliferación, este porcentaje se incremento de manera significativa ($P=0.001$) al estimularlas con TsCRTr alcanzando un promedio de 29.9%. En los GLM (tabla 8), se observaron valores de entre 48.3 y 57.3% de linfocitos T CD4+ en los 5 hámsteres, con un promedio de 52.8%; en esta población, las células no estimuladas *in vitro* presentaron un promedio de 14.2 % en estado de proliferación, el cual no se incremento de forma estadísticamente significativa ($p= 0.62$), llegando a un promedio de 17.9% al estimularlas de manera antígeno específica con TsCRTr.

En la figura 20 se muestran las gráficas representativas de las células de un hámster del grupo de animales vacunados con TsCRTr y de su estimulación *in vitro* con este mismo antígeno tanto en células de bazo como de GLM, comparado con las células de este mismo animal sin estímulo. En cada una de las gráficas se puede observar el porcentaje de la población total CD4+ en los dos cuadrantes superiores (R23 y R24) y en el cuadrante superior izquierdo (R23) a las células que se encuentran en proliferación

Tabla 7. Porcentajes de células CD4+ de bazo identificadas con el anticuerpo anti-CD4 PE de reactividad cruzada y porcentajes de proliferación medidos por incorporación de CFSE por citometría de flujo, en hámsteres vacunados con TsCRTr, en respuesta al estímulo *in vitro* con TsCRTr y sin estimular.

VACUNACIÓN	HAMSTER	% DE CÉLULAS CD4+ DE BAZO			
		SIN ESTÍMULO <i>IN VITRO</i>		TsCRTr <i>IN VITRO</i>	
		TOTAL	PROLIFERANDO	TOTAL	PROLIFERANDO
TsCRTr	1	39.9	9.3	39.7	28.7
	2	47.2	7.2	53.2	41.5
	3	51.9	6.1	49.6	26.4
	4	43.7	8.4	42.7	30.9
	5	32.6	8.5	39.8	22.1
	Promedio (+/- DS)	43.0 (7.3)	7.9 (1.2)	45.0 (6.1)	29.9 (7.2)

Tabla 8. Porcentajes de células CD4+ de GLM identificadas con el anticuerpo anti-CD4 PE de reactividad cruzada y porcentajes de proliferación medidos por incorporación de CFSE por citometría de flujo, en hámsteres vacunados con TsCRTr, en respuesta al estímulo *in vitro* con TsCRTr y sin estimular.

VACUNACIÓN	HAMSTER	% DE CÉLULAS CD4+ DE GLM			
		SIN ESTÍMULO <i>IN VITRO</i>		TsCRTr <i>IN VITRO</i>	
		TOTAL	PROLIFERANDO	TOTAL	PROLIFERANDO
TsCRTr	1	45.2	7.8	62.9	12.8
	2	49.6	4.2	55.3	9.6
	3	48.0	9.1	61.6	11.6
	4	45.8	13.6	49.5	32.6
	5	52.9	36.5	57.3	22.7
	Promedio (+/- DS)	48.3 (3.1)	14.2 (12.9)	57.3 (5.3)	17.9 (9.6)

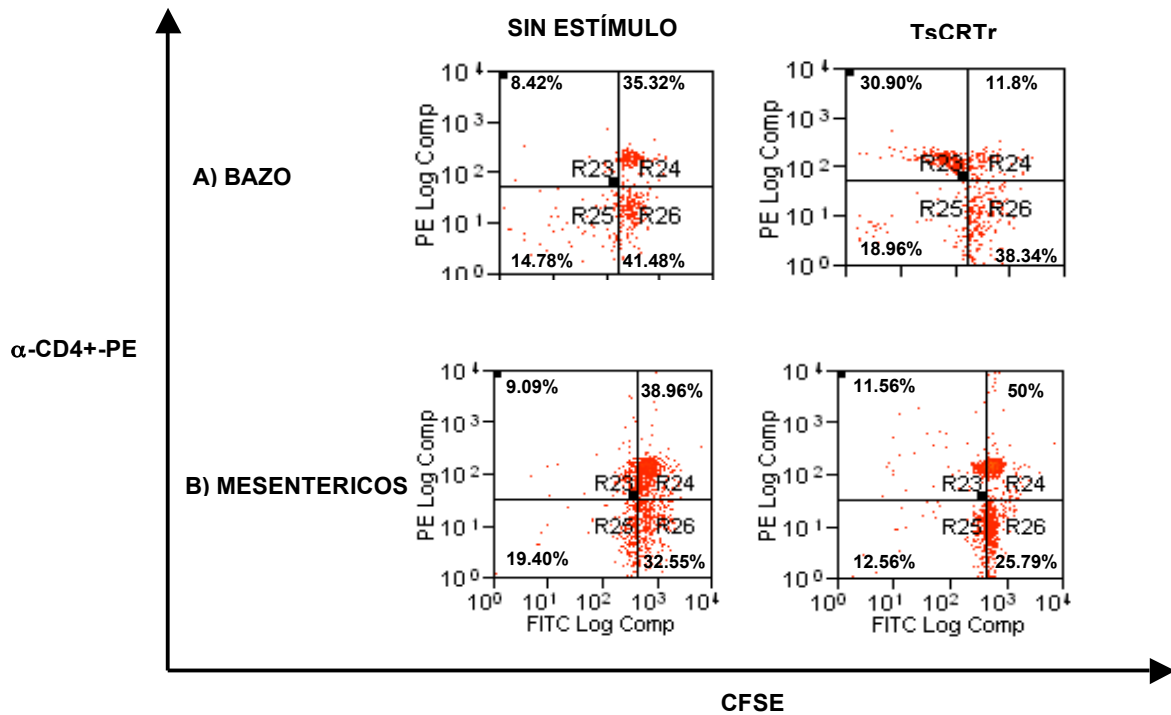


Fig. 20. Análisis de CF para identificación y análisis de proliferación de la población CD4+ de células obtenidas de bazo (A) y de GLM (B) de un hámster vacunado con TsCRTr y estimuladas con TsCRTr *in vitro*. Ejemplo representativo de los 5 animales estudiados en cada grupo. R25 y R26 muestran la población de CMN negativa a CD4; R23 y R24 representan el porcentaje total de células CD4+ y en R23 se observa el porcentaje de proliferación de éstas células.

8.5 EVALUACIÓN DE MARCADORES DE ACTIVACIÓN CELULAR

Simultáneamente a la evaluación de proliferación, se realizaron tinciones para la identificación de marcadores de activación temprana (CD69) y tardía (CD25) utilizando los anticuerpos de reactividad cruzada identificados. Debido a la magnitud del experimento, no fue posible identificar claramente la activación de estos marcadores después de la estimulación *in vitro* con TsCRTr, sin embargo, en algunos casos como el que se ejemplifica en la figura 21, que es representativo de un solo hámster inmunizado con la proteína recombinante, se logra apreciar un incremento de 0.6 % en la coexpresión de estas moléculas tras la estimulación con TsCRTr con respecto a las no estimuladas tanto en células de bazo como en GLM.

Los resultados de las tablas 9 y 10 muestran los valores que corresponden al porcentaje de células (bazo y GLM respectivamente) que expresan las moléculas de activación CD69, CD25 y la coexpresión de ambas en animales que se inmunizaron con la proteína recombinante con y sin estímulo *in vitro*. Se puede observar en todos los casos un ligero incremento en la expresión de ambas moléculas, sin embargo, estos datos no son concluyentes ni estadísticamente significativos ya que la desviación estándar de los valores promedio es mayor a éstos en muchos casos.

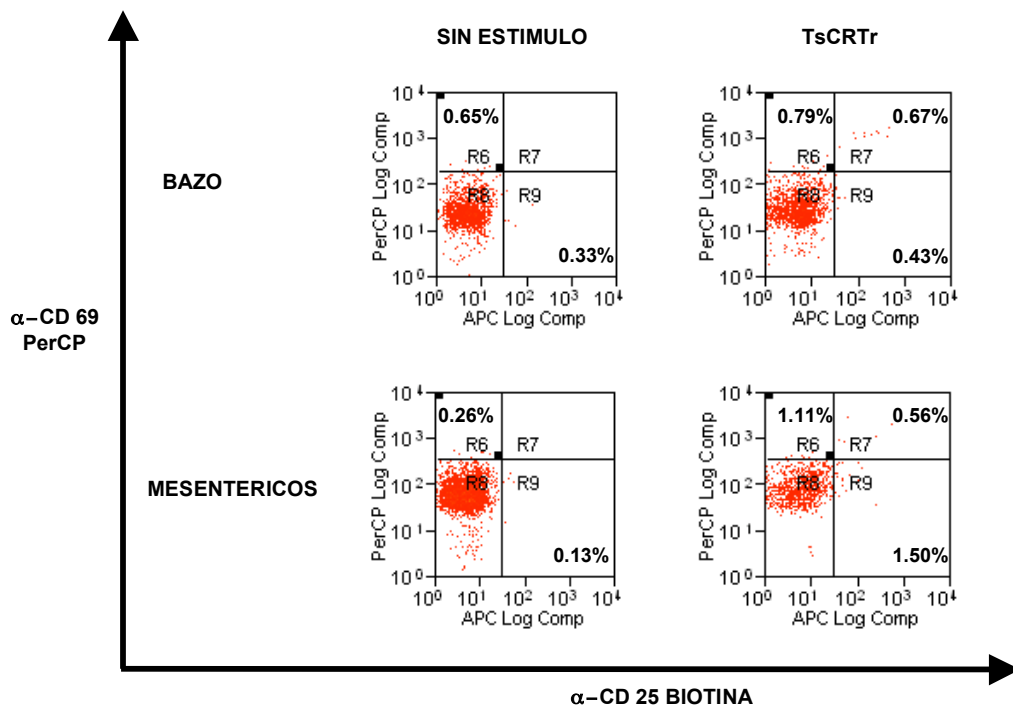


Fig. 21. Gráficas de puntos que muestran el porcentaje de expresión de moléculas CD25 (R9), CD69 (R6) y la coexpresión de ambas (R7) en células de bazo y GLM de un hámster inmunizado con TsCRTr y estimulado *in vitro* con este mismo antígeno.

Tabla 9. Porcentaje de células de bazo con marcadores de activación temprana (CD69), tardía (CD25) y con ambos en hámsteres vacunados con TsCRTr y estimulados *in vitro* con el mismo antígeno.

Vacunación	Hámster	% de células de bazo con moléculas de activación					
		Sin estímulo in Vitro			TsCRTr in Vitro		
		CD25	CD69	CD25 y CD69	CD25	CD69	CD25 y CD69
TsCRTr	1	0.33	0.65	0.00	0.43	0.79	0.67
	2	0.67	0.16	0.04	0.28	0.01	0.08
	3	0.21	0.96	0.36	0.92	0.03	0.27
	4	0.02	0.13	0.07	0.07	1.16	0.53
	5	0.00	0.02	0.01	0.31	0.72	0.00
	Promedio (+/- DS)	0.25 (0.27)	0.38 (0.40)	0.10 (0.15)	0.40 (0.32)	0.54 (0.50)	0.31 (0.29)

Tabla 10. Porcentaje de células de GLM con marcadores de activación temprana (CD69), tardía (CD25) y con ambos en hámsteres control y vacunados con TsCRTr y estimulados *in vitro* con el mismo antígeno.

Vacunación	Hámster	% de células de GLM con moléculas de activación					
		Sin estímulo in Vitro			TsCRTr in Vitro		
		CD25	CD69	CD25 y CD69	CD25	CD69	CD25 y CD69
TsCRTr	1	0.13	0.26	0.00	1.50	1.11	0.56
	2	0.29	0.27	0.02	0.64	0.93	0.08
	3	0.43	0.92	0.16	0.42	0.79	0.36
	4	0.03	0.07	0.00	0.04	0.49	0.02
	5	0.00	0.03	0.00	0.39	0.28	0.01
	Promedio (+/- DS)	0.18 (0.18)	0.31 (0.36)	0.04 (0.07)	0.60 (0.55)	0.72 (0.33)	0.21 (0.24)

9. DISCUSIÓN

La teniosis es un problema de salud pública en muchos países en vías de desarrollo que presentan altos índices de pobreza extrema y condiciones de salubridad inadecuadas, por lo que se hace necesaria la búsqueda de mecanismos que permitan su control. En este contexto el desarrollo de una vacuna permitirá influir de manera directa en la erradicación de esta enfermedad. En este trabajo se hace una identificación primaria de la activación de CMN del sistema inmune en el modelo de teniosis experimental en hámsteres, en respuesta a la inmunización con TsCRTr, la cual es un posible candidato a vacuna contra esta parasitosis.

El primer paso para realizar ésta evaluación fue buscar anticuerpos de reactividad cruzada que nos permitieran identificar a las subpoblaciones de linfocitos que se activan de manera específica tras la vacunación, así como a marcadores de superficie para evaluar la magnitud de dicha activación, ya que hasta el momento los reactivos para este propósito no se encuentran disponibles de manera comercial.

Se analizaron un total de 36 anticuerpos monoclonales (24 contra moléculas de ratón y 12 contra moléculas de humano) y se logró identificar a tres anticuerpos que presentan reactividad cruzada: anti-CD4-PE, anti-CD69-PerCP y anti-CD25-biotina, todos contra moléculas de ratón (tabla 1). Esta aportación es importante ya que permite generar nuevos parámetros inmunobiológicos en los estudios con hámsteres, lo cual es de interés para los investigadores que trabajan con este modelo. Por otro lado, se describe también la lista de anticuerpos que no dieron reactividad cruzada, lo cual permite establecer un avance más en el modelo.

Recientemente, en un estudio de Leishmaniosis visceral en el modelo experimental de hámster, se describió la reactividad cruzada del anticuerpo anti-CD4PE de ratón (la misma clona descrita en este trabajo) y también la reactividad

cruzada del anticuerpo anti-CD19 FITC (clona ID3, de BD-Pharmingen) (Dea-Ayuela y col., 2007), sin embargo, en esta tesis se probó también el anticuerpo anti-CD19 de esta marca, acoplado a FITC, acoplado a PE y acoplado a APC, en dos experimentos por separado no se encontró positividad en la identificación de CMN de hámster lo que implica que no presenta reactividad cruzada contra la población de células B de estos animales bajo las condiciones establecidas por los fabricantes del anticuerpo.

Por otro lado, hasta donde se ha indagado en la literatura, este es el primer trabajo donde se describe la reactividad cruzada de los anticuerpos anti-CD25 y anti CD69 en moléculas de hámster, por lo que se da la aportación de dos nuevas herramientas para el estudio en el modelo; uno para analizar activación de respuesta temprana y uno de respuesta tardía respectivamente, fundamentales para identificar la respuesta inmune celular inducida por diversos estímulos antigénicos y que aunados al anti-CD4 (que identifica linfocitos T cooperadores, determinantes en la inducción de la respuesta inmune celular) permiten establecer al hámster como un modelo cada vez más completo con fines de investigación.

La siguiente fase del proyecto fue evaluar si la TsCRTr, administrada por vía oral, es capaz de inducir una respuesta protectora contra la infección por *T. solium* en hámster, el cual ha demostrado ser uno de los modelos más permisivos a la infección y que mejor la reproducen, con la ventaja de que las tenias que se desarrollan no producen proglótidos grávidos por lo que no representan riesgo para la salud del operador (Ávila y col., 2006). Para este efecto, se diseñó un experimento de inmunización con esta proteína y el posterior reto con cisticercos, en el cual se evalúa de manera simultánea, el efecto de la TsCRTr sola o con TC como adyuvante, el porcentaje de recuperación de tenias, los cambios en el tamaño y características morfológicas de las mismas, la evaluación de la respuesta inmune humoral mediante la titulación de anticuerpos específicos, la evaluación de los perfiles de producción de citocinas por hibridación *in situ* y por

RT-PCR y la evaluación de la proliferación antígeno-específica de CMN por las metodologías aquí descritas.

Para la elección de la vía oral como medio de administración de la vacuna se tomaron en cuenta las ventajas que tiene ésta sobre las otras vías de administración, la principal es que por esta vía se induce una respuesta inmune de mucosas, con producción de IgA de secreción, no solo en el sitio de inducción sino también en secreciones externas debido a la migración de células sensibilizadas, así como la activación de células del sistema inmune directamente en los órganos linfoides cercanos al sitio de infección (en el caso de la infección por *T. solium*, tanto en las Placas de Peyer (PP) cercanas al sitio de anclaje, como en los GLM que circundan el intestino) (Shalaby, 1995). Además, la administración oral de vacunas da lugar a buenas respuestas inmunes tanto de mucosas como sistémicas (Senior, 2001) y presenta ventajas inherentes como son la facilidad de su aplicación, pues no requiere del uso de inyecciones, además, no se requiere personal capacitado para ello, lo cual a su vez, permite la administración de refuerzos de manera fácil y sin molestias para el receptor de la vacuna.

El principal problema que presentan las vacunas administradas por vía oral es la desnaturalización y degradación del antígeno en el ambiente hostil del tracto gastrointestinal, consecuentemente, se requiere un mayor número de inmunizaciones y con mayor frecuencia, lo cual puede llevar a la generación de tolerancia (Shalaby, 1995). Tomando en cuenta estas consideraciones, se eligió la vía oral acompañada de la administración de bicarbonato de sodio para disminuir el pH ácido del estómago y la TC como adyuvante para incrementar la respuesta de células. Como apoyo de esta elección existen artículos previos en los que se evalúan candidatos a vacunas contra helmintos en los cuales se hace una comparación entre la vacunación por vía oral y otras vías; el mayor porcentaje de protección y eficacia para impedir el desarrollo de los parásitos (que entran por vía oral) son resultado de la vacunación por ésta vía (Robinson, Bellaby y Wakelin, 1995; Shi y col., 1998; Tsuji y col., 2003; Bunjiro y col., 2004).

El estudio macroscópico de los porcentajes de recuperación de tenias (Fig 10) fue muy alentador ya que hubo una menor recuperación de estas en el grupo de animales vacunados con TsCRTr (47.5%) en comparación con los no inmunizados (75%) las cuales, además, presentaron un tamaño menor (2.1 cm contra 11.7 cm en promedio entre ambos grupos, respectivamente) y con localización más alejada del estómago (9.16 cm) que en los otros grupos de animales (inmunizados con TC (7.26 cm), V.V (7.36 cm) y diluyente 7.48 cm) (tabla 2).

Cabe señalar que cuando se compararon las longitudes de las tenias recuperadas de cada uno de los grupos de hámsteres (figura 11), las diferencias entre estas no fueron significativas debido a que el tamaño de los parásitos dentro de cada grupo presentó grandes variaciones y las desviaciones estándar fueron superiores al valor promedio. Para tratar de solventar esta tendencia, se propone que en estudios posteriores la población a evaluar sea mayor a 5 animales para obtener datos más representativos.

La observación de un menor número de tenias recuperadas y de menor tamaño, sugiere que existe un componente en los animales inmunizados que permite una mayor eliminación de los parásitos y aparentemente limita su desarrollo, comparado con los animales no inmunizados. Ya que la TsCRT se expresa de manera diferencial durante los procesos de desarrollo del parásito (Mendlovic, 2004), una respuesta inmune contra ella pudiera reflejarse directamente en estas observaciones.

Con respecto a la localización de las tenias recuperadas, se puede suponer que en los hámsteres inmunizados existe un componente de protección que dificulta el anclaje de estas en los sitios proximales al estómago, lugar donde se encuentran la mayoría de las PP en el hámster, (en este estudio las PP se encontraron entre los 4 y los 7 cm de distancia del estómago). Para investigar esta observación, el grupo de trabajo esta realizando el estudio de inmunohistoquímica e hibridación *in situ* tanto en las zonas de anclaje como en sitios proximales y distales del intestino

de hámsteres inmunizados y no inmunizados para ver el perfil de células y citocinas presentes en cada caso.

En sustento de los resultados macroscópicos anteriores, existe un reporte reciente en el cual se inmunizaron ratones por vía intraperitoneal tres veces con CRTr de *Necator americanus*, después se retaron con larvas infectivas del mismo parásito y se obtuvo una recuperación de gusanos adultos desarrollados en intestino de entre el 51 y el 57% que fue significativo con respecto a los animales control (Winter y col., 2005); en el trabajo aquí presentado se realizaron cuatro inmunizaciones con TsCRTr por vía oral, se realizó el reto con larvas del parásito y se obtuvo una recuperación del 47.5% de las tenias adultas en hámster, sin embargo, la población de animales con que se trabajó en este caso fue menor que en el estudio de *N. americanus*.

Como propuesta de estas observaciones se planea realizar un experimento administrando la TsCRTr por vía parenteral a un grupo de hámsteres y comparar las respuestas obtenidas por ambas vías para establecer si la administración oral de la TsCRTr tiene efecto sobre el desarrollo del parásito y al mismo tiempo, medir parámetros como el número de inmunizaciones y dosis del antígeno en cada caso.

Para la evaluación de la respuesta de proliferación antígeno-específica, se decidió estudiar el bazo y los GLM, ya que, como se mencionó anteriormente, la vacunación por vía oral puede dar lugar a respuesta inmune tanto en mucosas como sistémica. Cabe mencionar que los sitios primarios donde se lleva a cabo la inducción de la respuesta inmune en mucosas tras la administración de vacunas orales, son las PP (Mc Ghee y col., 1992), sin embargo, y debido al bajo porcentaje de células que se obtienen a partir de éstas y a que en ellas se estudió simultáneamente la presencia de células y citocinas *in situ*, se optó por los GLM ya que los linfocitos activados específicamente en las PP migran a los GLM por la irrigación linfática que los une (Issekutz, 1984; Offit y Dudzik, 1989).

Para la obtención y purificación de las células a partir del bazo y de los GLM, se enfrentó la dificultad técnica de trabajar con un gran número de animales simultáneamente, lo cual constituyó una limitante importante al momento de establecer los cultivos; ambos órganos fueron macerados suavemente para obtener la suspensión celular, posteriormente se pasaron a través de Ficoll-Hypaque, y finalmente se cultivaron en medio RPMI; durante este proceso las células resultaron maltratadas debido en parte a la metodología, pero también al tiempo que estuvieron fuera de condiciones favorables después de que el órgano fue disectado (alrededor de 30 min); al realizar el estudio de viabilidad con azul de tripán y yoduro de propidio se observó una viabilidad mayor al 80% (datos no mostrados) por lo que se consideró suficiente para continuar con el estudio. Como alternativas metodológicas para incrementar la viabilidad en los siguientes experimentos, se propone reducir el número de muestras, realizar una disgregación de los órganos a través de membranas comerciales para dicho fin y eliminar el paso por Ficoll-Hypaque, sustituyendo por la adición de una solución de lisis para eliminar eritrocitos.

Una vez establecidos los cultivos celulares provenientes de todos los grupos de hámsteres inmunizados, se procedió a estimularlos *in vitro* con la TsCRTr utilizada para la vacunación y se analizó la activación de las células en respuesta a éste antígeno. La TsCRTr fue producida a partir de un sistema de *E. coli*, por lo que existía la posibilidad de contaminación y activación celular debida al LPS y para eliminar este efecto, se utilizó un sistema de estimulación con la TsCRTr y la adición de polimixina, el cual es un antibiótico inhibidor de LPS (Cuéllar, Fonseca y Gómez, 2004). Como un control adicional se utilizó como estimulante a bacterias BL-21 sin transformar (denominadas Vector vacío (V.V.)) con y sin polimixina. Como control positivo se utilizó PHA, que en la actualidad es el activador policlonal más utilizado como factor estimulante de la proliferación en cultivos de diferentes estirpes celulares, incluidos los linfocitos (Kenan y col., 1992; Buhning y col., 1999; Fukao y col., 1999) y como control negativo se utilizaron células sin estimular.

En la figura 14 se puede observar que existió una diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0.002$) entre el porcentaje de activación de las células de bazo (de los cinco hámsters analizados) estimuladas con TsCRTr en comparación con las no estimuladas, sin embargo, al adicionar la TsCRTr más polimixina no existió diferencia significativa ($p=0.1$), lo que sugiere que la activación de las células se debió, en parte, al LPS presente aún en la TsCRTr, sin embargo, al analizar cada uno de los cinco hámsteres por separado encontramos casos en los que la diferencia si es significativa como en el mostrado en la figura 13, lo que sugiere que existe probable contaminación de la TsCRTr con LPS, pero restando este efecto, existe un componente de respuesta celular antígeno-específico.

Aunado a lo anterior, al estimular con las bacterias BL-21 solas y con polimixina, en células de bazo se encontraron porcentajes de activación muy bajos (0.87% y 0.63% en promedio, respectivamente) lo que sugiere que el vector en el que se produce la TsCRTr y por lo tanto sus componentes, no están implicados en la estimulación como tal; a este respecto se propone, en ensayos futuros, la utilización de TsCRTr totalmente pura, lo cual se puede realizar por electro-elución o bien por la generación de anticuerpos anti-TsCRTr y su posterior acoplamiento a soportes como sefarosa que permitan una purificación específica en columnas; simultáneamente se podría realizar la determinación de presencia de LPS por alguna de las pruebas que existen para ello, como la prueba de Lisis de Amebocitos de *Limulus* (Cuéllar, Fonseca y Gómez, 2004).

La respuesta celular en los GLM de los cinco hámsteres analizados al estímulo con TsCRTr sola o con polimixina es mayor y estadísticamente significativa ($p=0.001$ y $p=0.001$, respectivamente), con respecto a las células no estimuladas lo que implica que en los GLM la TsCRTr activa células de manera antígeno-específica, lo anterior constituye uno de los hallazgos más relevantes del trabajo; es importante señalar que la TsCRTr como vacuna, debe ser captada por las células M de las PP y después procesada por las células dendríticas, las cuales pueden presentar antígenos a los linfocitos T tanto en las mismas PP, como

migran a los GLM y ahí llevar a cabo la presentación del antígeno, de esto deriva que los GLM son órganos donde se puede apreciar la proliferación de manera adecuada.

Para explicar el por que se observa un mayor porcentaje promedio de células activadas en GLM (8.7%) que en bazo (3.58%) por el estímulo con TsCRTr (tablas 3 y 4), debemos tomar en cuenta que después de la presentación del antígeno y la activación, los linfocitos T y B migran de los GLM hacia la circulación sistémica a través del ducto torácico y así alcanzan otros órganos linfoides, entre ellos el bazo, en donde pueden continuar su proliferación pero sin los estímulos específicos que existían en las mucosas, por lo que se ven disminuidos en su capacidad de expansión clonal, simultáneamente, por esta misma vía los linfocitos pueden alcanzar tejidos de mucosa distales, (denominados tejidos efectores, tales como la lámina propia del intestino, los bronquios, el tracto genito-urinario y glándulas secretorias, los cuales en conjunto se denominan sistema inmune común de mucosas) (Scicchitano y col., 1988; Phillips-Quagliata y Lamm, 1988) en donde se expanden y maduran, en el caso de los linfocitos B, a células plasmáticas productoras de IgA, por esta razón es que se puede observar tanto proliferación de células T en bazo como respuestas de células B, medidas por producción de anticuerpos, en secreciones como las lágrimas o la saliva (Holmgren , 1991; MaGhee y col., 1992).

Con respecto a los porcentajes de activación en las células de GLM estimuladas con bacterias BL-21 solas (V.V) o con polimixina, fueron muy bajos y similares a los de las células sin estímulo lo que refuerza que el efecto de activación observado probablemente tenga un componente de respuesta mayoritariamente contra la TsCRTr y no contra componentes del sistema de expresión de ésta, ya que si el LPS fuera el contaminante, las células tratadas con V. V. habrían sido estimuladas.

Como se mencionó, los linfocitos que alcanzan la circulación sistémica pueden no encontrar el microambiente necesario para su proliferación en órganos como el bazo, sin embargo, el hallazgo de células que sí se activaron en dicho órgano de manera específica, sugiere que hay algún factor de transferencia de la inmunidad desde mucosas para generar respuesta sistémica, por lo que no se descarta que la TsCRTr administrada por vía oral, pudiera alcanzar la circulación y activar a células sistémicas como ha sido demostrado con CRT de otros parásitos en los que se ha identificado su presencia como producto de excreción-secreción (Guillou y col. 2007), la activación de estas células estaría generando el microambiente propicio para la activación de CMN de bazo; como sustento de lo anterior, se ha descrito la presencia de anticuerpos contra productos de excreción-secreción de *T. solium* en el suero de hámsteres infectados (Ávila y col. 2003).

Por otro lado, es importante señalar que la administración oral de antígenos requiere en muchas ocasiones de altas dosis para generar una respuesta inmune protectora, lo cual puede inducir tolerancia, ya que pequeñas cantidades de antígeno pueden ganar acceso a la circulación periférica y a los ganglios linfáticos periféricos donde son presentados en ausencia de las señales coestimuladoras apropiadas (Shi y col., 1998).

A este respecto y dado que no se observaron diferencias significativas entre el grupo vacunado con TsCRTr sola y el vacunado con TsCRTr más TC como adyuvante, se sugiere la utilización de un sistema de liberación que resista la degradación del antígeno por las enzimas digestivas y las condiciones ácidas del estómago; como candidatos se están evaluando los bilosomas, los cuales son vesículas lipídicas que tienen sales biliares incorporadas en su estructura (la más común y que mejor estabilidad confiere es el desoxicolato) (Conacher y col., 2001); el uso de los bilosomas permitirá englobar y proteger al antígeno liberándolo en el intestino delgado desde donde puede ser captado por células M o pasar a circulación de manera que con una menor dosis de antígeno se pueda inducir la respuesta y evitar el fenómeno de tolerancia (Senior, 2001).

Con respecto a la TC como adyuvante, se seleccionó originalmente por ser el prototipo de adyuvante en mucosas, debido a que se ha observado que cumple con la propiedad de inducir un microambiente inmunogénico adecuado para la presentación del antígeno, generando una respuesta inflamatoria controlada que lleva a un perfil de moléculas coestimuladoras y de citocinas mayoritariamente Th2 que da lugar a la producción de IgA (Foss y col., 2000; Robinson, Bellaby y Wakelin, 1995), al tiempo que se producen respuestas de memoria de largo plazo (Lycke y Holmgren, 1989). Sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que no hay una mayor activación celular al incluirla como adyuvante razón por la cual son necesarios los resultados de producción de IgA específica y citocinas para definir si se sigue usando como adyuvante o se incluye el uso de otros adyuvantes como el CpG (activador de TLR 9) el cual, además, podría ser incluido en los bilosomas junto con la TsCRTr.

Una vez que se observó la activación antígeno-específica a la TsCRTr, el siguiente paso fue investigar si la estimulación *in vitro* de CMN tanto de bazo como de GLM daba lugar a su proliferación, para lo cual se utilizó la incorporación del colorante CFSE. Se comparó el grupo de animales no vacunados contra todos los grupos de animales vacunados, a los cuales se les estimuló *in vitro* con PHA como control positivo, con TsCRTr, TsCRTr y polimixina y V. V. solo y con polimixina, siendo el basal de proliferación el porcentaje de células sin estímulo en cada caso.

Las células del grupo de hámsteres no inmunizados y no estimulados *in vitro* presentaron un VPP basal de 1.9% en bazo y 3.3% en GLM (tablas 5 y 6) debido a que también fueron retados con cisticercos, desarrollaron la teniosis y, por consiguiente, tuvieron una activación celular que probablemente dio lugar a proliferación. Existen estudios en los que se ha comprobado este efecto de activación primaria contra la vacuna y una mayor proliferación cuando se hace el reto con el parásito, tal es el caso de la vacunación contra *Schistosoma mansoni* con los productos denominados pcCT- SOD, pcGPX y pc-filamina las cuales protegen contra el parásito adulto mediante su eliminación (Rosemary y col. 2004).

En el análisis de proliferación de CMN de bazo (figura 18) se observó que en el sistema de estímulo *in vitro* con TsCRTr, solo las células provenientes de hámsteres vacunados con TsCRTr y TsCRTr más TC tuvieron un VPP significativamente mayor ($p \leq 0.05$) a las de los otros grupos de animales y a las que no recibieron estímulo, lo que sugiere que con la vacunación se generaron células de memoria, que al ponerlas en contacto con el antígeno *in vitro*, se activaron de manera específica, desencadenando su proliferación; en el sistema de células que recibieron estimulación *in vitro* con V.V. se observó una proliferación significativa ($p \leq 0.05$) en las células de todos los grupos de hámsteres, que nuevamente puede ser explicado por presencia de LPS en la TsCRTr, y corroborado en el grupo de vacunación con V.V. más polimixina donde ya no se observó proliferación significativa en ninguno de los grupos, excepto en el vacunado con V.V., lo que también pudiera indicar que hubo otros componentes de la bacteria que estimularon a las células.

Con respecto a las células de GLM (figura 19), no se observaron valores significativos de proliferación específica al estímulo con TsCRTr sola o con polimixina y al V.V. con polimixina, al evaluar en conjunto a los cinco hámsteres inmunizados. No obstante, cuando las CMN fueron estimuladas solo con V.V., sí se observó proliferación significativa ($p \leq 0.05$) en las provenientes de animales vacunados con TsCRTr más TC y los del grupo control, lo que nuevamente sugiere que hay factores propios del vector que promueven la proliferación celular. Para obtener resultados más contundentes que puedan dar mayor información para explicar estos datos se sugiere nuevamente que en próximos experimentos se trabaje con poblaciones más grandes de animales, así como la realización de cinéticas de la respuesta celular a los estímulos *in vitro*.

Los resultados anteriores sugieren que pueden existir epítopos relevantes en la TsCRTr que son capaces de dar lugar a la activación y proliferación de CMN tanto en células de bazo como de GLM al ser administrada por vía oral.

Con las herramientas disponibles se procedió a ver si estos determinantes antigénicos eran reconocidos por los linfocitos T CD4+, para lo cual se analizaron los cultivos de células de hámsteres vacunados con TsCRTr y se tiñeron con el anticuerpo anti-CD4 de ratón acoplado a PE.

El análisis en células indicó que la vacunación con TsCRTr induce la proliferación de linfocitos T CD4+ después de la estimulación *in vitro* con esta proteína, dicha proliferación fue observada de manera significativa en células de bazo ($p=0.001$) (29.9% contra 7.9 % en células sin estímulo) y como tendencia sin significancia estadística en GLM (17.9% contra 14.2% en células sin estímulo), reafirmando que la mayor proliferación se lleva a cabo en CMN de bazo. Es importante señalar que una de las principales células efectoras en la respuesta inmune son los linfocitos T CD4+, de tal manera que la identificación de su proliferación antígeno-específica es un indicador muy relevante de la capacidad de protección que induce la TsCRTr.

Con respecto a la función de los linfocitos CD4 en las infecciones parasitarias producidas por helmintos gastrointestinales, se han realizado varios estudios en donde se hacen evidentes múltiples mecanismos efectores que operan contra este tipo de parásitos, los cuales varían dependiendo del hospedero, de la especie del parásito y del lugar de éste en el intestino. Todos ellos sugieren que la respuesta inmune local protectora es controlada por células CD4+ de tipo Th2 y que la resistencia es debida a una deficiencia de respuesta Th1. La respuesta inmune anti-nemátodos y la capacidad de expulsarlos del intestino depende de que las células T CD4+ puedan liberar citocinas de tipo Th2 y generar una respuesta inflamatoria local, así como una respuesta de células cebadas y cambios fisiológicos en el intestino dados en algunas ocasiones por la producción excesiva de moco por parte de las células caliciformes de manera que se genere un ambiente hostil para la sobrevivencia del parásito en el intestino y se produzca su expulsión (Constant y Bottomly, 1997; Onah y Nawa, 2000).

En lo que se refiere a la respuesta inmune celular local, se ha visto que en las infecciones por helmintos como *S. rattii* existe una alta producción de IL-4 por parte de las células de GLM estimuladas *in vitro* con antígenos de éste, lo que sugiere que en roedores, la respuesta inmune que se genera contra éste tipo de parásitos es también de tipo Th2 (Wilkes y col., 2007). Una de las líneas de investigación de este proyecto es, como ya se menciono, la identificación de los perfiles de citocinas que se producen en las zonas de anclaje del parásito, en un sitio distal del mismo como control y en los GLM, los resultados obtenidos permitirán robustecer las observaciones aquí descritas.

El anticuerpo anti-CD4 permitió, a la par de la identificación de activación de la población CD4+ en respuesta a la TsCRTr, realizar un estudio preliminar de la distribución de la población de linfocitos T CD4+ en hámster; en células de bazo el promedio fue de entre el 43 y el 45% para esta subpoblación (tabla 7) y los GLM (tabla 8) presentaron entre un 48.3 y un 57.3%. Al comparar estos valores con los de ratón, que presenta aproximadamente el 25% de células CD4+ en bazo y 55% en ganglios linfáticos (Miltenyi Biotec, 2006), se logra apreciar que en el bazo del hámster hay un mayor número de células CD4+ que en el ratón, mientras que en ganglios linfáticos los valores de éstas son similares, más importante aún, se está detectando un porcentaje similar de células tanto en ratón como en hámsteres. El mayor número de células CD4+ en GLM puede deberse quizás a que estos son los sitios donde se desarrolla la respuesta inmune en contra del parásito y, por lo tanto, pudiera existir un incremento en el número de células de esta población. Estos datos son importantes para el conocimiento del modelo experimental, sin embargo, hay que tomar en cuenta que por tratarse de un anticuerpo de reacción cruzada, pudiera no estar identificando al total de la población y, que las células analizadas, se encontraban en proliferación. Como una línea más de este proyecto se esta trabajando en el análisis de un mayor número de hámsteres sin infección para obtener los valores de referencia de la población CD4+.

Como se mencionó, este trabajo forma parte de un proyecto en el que se está evaluando simultáneamente la respuesta inmune humoral y el perfil de producción de citocinas que en conjunto darán una idea global de la protección conferida con la vacuna. Como estrategias para solventar la falta de reactivos comerciales para la fenotipificación celular por citometría se podría realizar en un futuro en este proyecto es la identificación de los péptidos inmunodominantes en la vacuna, ya que se cuenta con su secuencia completa y se pueden generar dichos péptidos y marcarlos fluorescentemente, y la posterior identificación de las poblaciones de linfocitos T CD4+ antígeno-específicos mediante el uso de tetrámeros de moléculas MHC (Laughlin y col, 2007). Otra estrategia puede ser la generación de anticuerpos monoclonales, los cuales no han sido generados de manera continua y comercial contra moléculas de hámster (Witte y Streilein, 1983; Butcher y col. 1987), con estos anticuerpos se podría realizar la fenotipificación no solo de los linfocitos T, sino además de las células B, NK, eosinófilos y otras poblaciones leucocitarias involucradas en la respuesta celular.

Una alternativa más para obtener resultados acerca de la respuesta inmune a la TsCRTr y su administración por vía oral, es corroborando la presencia de IgA específica contra la proteína en secreciones intestinales, ya que ésta es el indicativo de una protección local efectiva (McGhee y col., 1992), con ésta finalidad, actualmente se están produciendo anticuerpos anti-IgA de hámster en conejo para el desarrollo de una técnica de ELISA y poder monitorear la producción del anticuerpo en saliva, heces, fluido intestinal y suero de animales infectados.

Como un parámetro más que permitiera describir con mayor detalle la participación de células, se buscó identificar la activación de CMN y de linfocitos T CD4+ mediante el uso de los anticuerpos anti-CD25 y anti-CD69. Se realizaron tinciones para ver si estas moléculas incrementaban su expresión tras la estimulación *in vitro* en las células de los hámsteres vacunados con TsCRTr (Fig. 19); desafortunadamente no se pudo identificar un incremento significativo de estas dos

moléculas como lo habíamos descrito previamente cuando identificamos a estos anticuerpos como de reactividad cruzada (Fig. 9), probablemente debido a que las condiciones del experimento no fueron las óptimas para su correcta identificación; para optimizar las condiciones se propone hacer cinéticas para monitorear la expresión de las moléculas y mejorar las condiciones de los cultivos celulares cuanto a tiempo de procesamiento, así como titular los anticuerpos para definir a que concentración se observa la expresión de estas moléculas.

Cabe mencionar que el diseño y realización de un experimento de esta magnitud lleva tiempo por lo que no fue posible reproducir estas tinciones nuevamente, sin embargo, se han realizado nuevos experimentos en células de hámsteres no inmunizados y se ha corroborado el incremento en la expresión de ambos marcadores tras la estimulación con PHA *in vitro*. La identificación del marcador CD25 en los linfocitos CD4+ ha sido utilizada como un marcador de activación tardía y en tiempos más recientes se utiliza para identificar a la población de linfocitos T CD4+ reguladores los cuales presentan altos niveles de expresión de este marcador (Baecher y Hafler, 2006); el incremento de expresión en la molécula CD69 ha sido utilizado como un marcador de activación temprana en los estudios de citometría de flujo (Jung y col., 1990); por tal motivo la identificación de ambos marcadores en respuesta a la vacunación con TsCRTr serán un parámetro contundente para identificar la participación de la inmunidad celular en la protección contra teniosis.

Este trabajo es importante por que es el primero en el que se describe la protección mediada por la vacunación con TsCRTr en el modelo experimental de hámster y, además, se describe la activación y proliferación antígeno-específica de células mononucleares y de linfocitos T CD4+.

10. CONCLUSIONES

1. Se estableció el modelo en hámster para el estudio por citometría de flujo de la inmunidad celular.
2. Se identificaron tres anticuerpos heterólogos de reactividad cruzada contra moléculas de identidad y de activación de hámster: anti-CD4-PE, anti-CD25-biotina y anti-CD69-PerCP.
3. Las CMN de bazo y GLM de hámsteres vacunados con TsCRTr presentan un aumento en tamaño y número que indica su activación y proliferan de manera antígeno-específica al ser estimuladas *in vitro*, en mayor magnitud que en los hámsteres no vacunados.
4. Se identificó que la población CD4+ prolifera de forma antígeno-específica tras la estimulación *in vitro* con TsCRTr en células de bazo de hámsteres vacunados.
5. El uso de la TC como adyuvante no tiene ningún efecto significativo en la activación y proliferación de las CMN de bazo y GLM.
6. El aumento en el nivel de activación y proliferación de CMN correlaciona con una disminución en el número de tenias recuperadas en los grupos vacunados tanto con adyuvante como sin adyuvante con respecto a los no inmunizados, tratados únicamente con adyuvante y tratados con bacterias BL-21 sin transformar.

11. PERSPECTIVAS

1. Continuar con la búsqueda de anticuerpos de reactividad cruzada para identificar marcadores de superficie de células de hámster.
2. Purificar en un 100% la TsCRTr.
3. Estandarizar las condiciones experimentales óptimas para la identificación de marcadores de activación celular.
4. Realizar una cinética de la activación y proliferación celular de células T de hámster con diferentes dosis de TsCRTr *in vitro*.
5. Diseñar un experimento en el que se analice el efecto solamente de la inmunización y otro experimento en el que se analice el efecto del reto con cisticercos.
6. Iniciar la producción de anticuerpos monoclonales contra moléculas de identidad de células de hámster para definir la participación de las subpoblaciones leucocitarias en la protección generada por la TsCRTr.
7. Diseñar un experimento de vacunación con bilosomas como sistema de liberación del antígeno y con CpG como adyuvante.

12. REFERENCIAS

1. ACTG Laboratory Technology Comité. Lymphocyte proliferation using CFSE. Laboratory manual dilution (CFSE) proliferation, PDF version 1.0, 2004.
2. Allan JC, Ávila G, García-Noval J, Flisser A, Craig PS. Immunodiagnosis of taeniasis by coproantigen detection. *Parasitology* 1990,101:473-477.
3. Asquith B, Debaq C, Florins A, Gillet N, Sánchez Alcaraz T, Mosley A, Willems L. Quantifying lymphocyte kinetics in vivo using CFSE. *Proc R Soc B* 2006, 273: 1165-1171.
4. Ávila G, Teran N, Aguilar L, Maravilla P, Mata P, Flisser A. Laboratory animal models for human *Taenia solium*. *Parasitol Intl* 2006; 55 Supplement:S99-S103
5. Ávila G, Benítez M, Aguilar L, Flisser A. Kinetics of *Taenia solium* antibodies and antigens in experimental taeniosis. *Parasitol Res* 2003, 89: 284-289.
6. Ávila G, Aguilar L, Benitez S, Yopez-Mulia L, Lavenat I, Flisser A. Inflammatory response in the intestinal mucosa of gerbils and hamsters experimentally infected with the adult stage of *Taenia solium* *Intl. J. Parasitol* 2002, 32:1301-1306.
7. Baecher-Allan CM, Hafler DA. The purification and functional analysis of human CD4+CD25high regulatory T cells. *Curr Protoc Immunol*. 2006; Chapter 7: Unit 7.4B.
8. Becerril-Flores MA, *Parasitología Médica: de las moléculas a la enfermedad*. Mc Graw Hill. México, 2005. 131-135.

9. Bueno EC, Vaz AJ, Machado LD, Livramento JA. Neurocysticercosis: detection of IgG, IgA and IgE antibodies in cerebrospinal fluid, serum and saliva samples by ELISA with *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* antigens. *Arq Neuropsiquiatr* 2008, 58:18-24.
10. Bungiro R, Solis V, Harrison L, and Cappello M. Purification and molecular cloning of and immunization with *Ancylostoma ceylanicum* excretory-secretory protein 2, an immunoreactive protein produced by adult hookworms. *Inf and Immun* 2004, 72: 2203-2213.
11. Buhning, H. J., Simons, P. J., Pudney, M., Muller, R., Jarrossay, D. and van Agthoven, A. The monoclonal antibody 97 A6 defines a novel surface antigen expressed on human basophils and their multipotent and unipotent progenitors. *Blood*, 1999, 94: 2343-2356.
12. Butcher GW. A list of monoclonal antibodies specific for alloantigens of the rat. *J Immunogenet* 1987, 14:163-176.
13. Chavarria A, Fleury A, Bobes RJ, Morales J, Fragoso G, Sciotto E. A depressed peripheral cellular immune response is related to symptomatic neurocysticercosis. *Microbes Infect* 2006, 8:1082-1089.
14. Conacher M. Oral immunisation with peptide and protein antigens by formulation in lipid vesicles incorporating bile salts (bilosomes). *Vaccine* 2001, 19: 2965–2974.
15. Constant SL, Bottomly K. Induction of Th1 and Th2 CD4+ T cell responses: the alternative approaches. *Annu Rev Immunol* 1997, 15: 297-322.

16. Craig, S.W. and Cebra, J.J. Peyer's patches: an enriched source of precursors for IgA-producing immunocytes in the rabbit. *J. Exp. Med.* 1971, 134:188-191.
17. Cruz-Revilla C, Toledo A, Rosas G, Huerta M, Flores-Pérez I, Peña N, Morales J, Cisneros-Quiñones J, Meneases G, Díaz- Orea A, Anciant N, Goldbaum F, Aluja A, Larralde C, Fragoso G, Sciutto E. Effective protection against experimental *Taenia solium* tapeworm infection in hamsters by primo-infection and by vaccination with recombinant or synthetic heterologous antigens. *J Parasitol* 2006, 92:864-867.
18. Cuéllar A, Fonseca A y Gómez A. Efecto del lipopolisacárido en cultivos de células dendríticas humanas y su inhibición por la polimixina B. *Biomédica* 2004, 24:413-422.
19. Davis SW, Hammerberg B. *Taenia taeniaeformis*: evasion of complement-mediated lysis by early larval stages following activation of the alternative pathway. *Int J Parasitol* 1990, 20:587-593.
20. Dea-Ayuela MA, Rama-Íñiguez S, Alunda JM and Bolás-Fernández F. Setting new immunobiological parameters in the hamster model of visceral leishmaniasis for in vivo testing of antileishmanial compounds. *Vet Res Commun* 2007 31: 703–717.
21. de Vos T and Dick T. *Trichinella spiralis*: The effect of oral immunization and the adjuvancy of cholera toxin on the mucosal and systemic immune response of mice. *Exp Parasitol* 1993, 76:182-191.
22. Domínguez-Martínez D. Evaluación de un método de citometría de flujo para la simplificación del diagnóstico de laboratorio de Dengue. Tesis de licenciatura, IPN. México, 2007.

23. Eggleton P, Ward FJ, Johnson S, Khamashta MA, Hughes GR, Hajela VA, Michalak M, Corbett EF, Staines NA, Reid KB. Fine specificity of autoantibodies to calreticulin: epitope mapping and characterization. *Clin Exp Immunol* 2000, 120: 384-391.
24. Elson CO. Cholera toxin and its subunits as potential oral adjuvants. *Curr Top Microbiol Immunol* 1989, 146:29.
25. Flisser A. Informe de proyecto PAPIIT IN220007. UNAM, México, 2007.
26. Flisser A, Vargas-Parada L, Laclette P. *T. solium* : Un parásito cosmopolita. *Investigación y Ciencia*, mayo 2006: 24-33.
27. Flisser A, Pérez-Tamayo R. Aprendizaje de la Parasitología basado en problemas. Editores de Textos Mexicanos. México, 2006. 338-339.
28. Foss DL, Murtaugh MP. Mechanisms of vaccine adjuvanticity at mucosal surfaces. *Anim Health Res Rev* 2000, 1:3-24.
29. Fukao, T., Kaneko, H., Berrell, G., Gatei, M., Tashita, H. & Yoshida, T. ATM is upregulated during the mitogenic response in peripheral blood mononuclear cells. *Blood* 1999, 94:1998-2006.
30. González LM, Ferrer E, Spickett A, Michael LM, Vatta AF, Gárate T, Harrison LJ, Parkhouse RM. The *Taenia saginata* homologue of the major surface antigen of *Echinococcus* spp. is immunogenic and 97% identical to its *Taenia solium* homologue. *Parasitol Res* 2007, 101: 1541-1549.

31. Gonzalez LM, Bonay P, Benitez L, Ferrer E, Harrison LJ, Parkhouse RM, Garate T. Molecular and functional characterization of a Taenia adhesion gene family (TAF) encoding potential protective antigens of Taenia saginata oncospheres. *Parasitol Res* 2007, 100: 519-528.
32. Guillou F, Roger E, Moné Y, Rognon A, Grunau C, Théron A, Mitta G, Coustau C, Gourbal BE. Excretory-secretory proteome of larval *Schistosoma mansoni* and *Echinostoma caproni*, two parasites of *Biomphalaria glabrata*. *Mol Biochem Parasitol* 2007, 155: 45-56
33. Hodgkins PD, Lee JH, Lyons AB. B cell differentiation and isotype switching is related to division cycle number. *J Exp Med* 1996, 184:277-281.
34. Holmgren J. Mucosal immunity and vaccination. *FEMS Microbiol Immunol* 1991, 4:1-9.
35. Issekutz, T.B. The response of gut-associated T lymphocytes to intestinal viral immunization. *J. Immunol* 1984, 133: 2955.
36. Jenkins DJ, Rickard MD. Specific antibody responses in dogs experimentally infected with *Echinococcus granulosus*. *Am J Trop Med Hyg* 1986, 35:345–349.
37. Jung LK, Haynes BF, Nakamura S, Pahwa S, Fu SM. Expression of early activation antigen (CD69) during human thymic development. *Clin Exp Immunol* 1990, 81: 466-474.
38. Kenan, R. J., Uknis, M. E., Pham, S. M., Spichty, K., Duquesnoy, R. J., Griffith, B. P. & Zeevi A. Mitogen responses of lymphocytes from lung transplant recipients-correlation with rejection and infection. *Transplantation* 1992, 54: 241-245.

39. Laughlin EM. , Miller JD, James E, Fillos D, Ibegbu C, Mittler RS, Akondy R, Kwok W, Ahmed R, and Nepom G. Antigen-specific CD4 T cells recognize epitopes of protective antigen following vaccination with an anthrax vaccine. *Infect Immun* 2007, 75: 1852-60.
40. Lycke N. and Holmgren J. Adoptive transfer of gut mucosal antitoxin memory by isolated B cells 1 year after oral immunization with cholera toxin. *Infection and immunity* 1989, 57: 1137-1141.
41. Marcelain K, Colombo A, Molina MC, Ferreira L, Lorca M, Aguillon JC, Ferreira A. Development of an immunoenzymatic assay for the detection of human antibodies against *Trypanosoma cruzi* calreticulin, an immunodominant antigen. *Acta Tropica* 2000, 75:291-300.
42. McGhee J, Mestecky J, Dertzbaugh M, Eldridge J, Hirasawa M, Kiyono H. The mucosal immune system: from fundamental concepts to vaccine development. *Vaccine* 1992, 10:75-88.
43. Mendlovic F, Carrillo-Farga J, Torres J, Laclette JP, Flisser A. Differential expression of calreticulin in developmental stages of *Taenia solium* J. *Parasitol* 2006, 92:789-795.
44. Mendlovic F, Ostoa-Saloma P, Solis CF, Martinez-Ocana J, Flisser A, Laclette JP. Cloning, characterization, and functional expression of *Taenia solium* calreticulin. *J Parasitol* 2004, 90: 891-893.
45. Merchant MT, Aguilar L, Avila G, Robert L, Flisser A, Willms K. *Taenia solium* description of the intestinal implantation sites in experimental hamster infections. *J Parasit* 1998, 84: 681-685.

46. Miltenyi Biotec. Ficha Técnica del anticuerpo anti-CD4 de ratón. Catálogo 2006 pp. 16.64.
47. Montero E, Gonzalez LM, Bonay P, Rosas G, Hernandez B, Sciutto E, Parkhouse RM, Harrison LJ, Morales MA, Garate T. *Taenia solium*: identification and preliminary characterization of a lipid binding protein with homology to the SEC14 catalytic domain. *Exp Parasitol* 2007, 116: 191-200.
48. Mulcahy G, O'Neill S, Donnelly S, Dalton JP. Helminths at mucosal barriers- interaction with the immune system. *Adv drug Deliv Rev* 2004, 56: 853-868.
49. Naglaa EG, El Ridi R, Tawab NA, El Demellawy M, Mangold BL. A *Schistosoma mansoni* 62-kDa band is identified as an irradiated vaccine T-cell antigen and characterized as calreticulin. *J Parasitol* 2000, 86:993-1000.
50. Nakhasi HL, Pogue GP, Duncan RC, Joshi M, Atreya CD, Lee NS, Dwyer DM. Implications of calreticulin function in parasite biology. *Parasitol Today* 1998, 14:157-159.
51. Offit, P.A. and Dudzik, K.I. Rotavirus-specific cytotoxic T lymphocytes appear at the intestinal mucosal surface after rotavirus infection. *J Virol* 1989, 63: 3507.
52. Onah DN and Nawa Y. Mucosal immunity against parasitic gastrointestinal nematodes. *Korean J Parasitol* 2000, 38: 209-236.
53. Pawlowski Z, Allan J, Sarti E. Control of *Taenia solium* taeniasis/cysticercosis: from research towards implementation. *Int J Parasitol* 2005, 35:1221-1232.

54. Parkhouse RM, Bonay P, González LM, Ferrer E, Gárate T, Aguilar CM, Cortez A MM, Harrison LJ. TSOL18/HP6-Tsol, an immunogenic *Taenia solium* oncospherical adhesion protein and potential protective antigen. *Parasitol Res* 2008, 102: 921-926.
55. Phillips-Quagliata, J.M. and Lamm, ME. Migration of lymphocytes in the mucosal immune system. In: *Migration and Homing of Lymphoid Cells, Volume II* (Ed. Husband, A.J.) CRC Press, Boca Raton, FL 1988, p. 53
56. Potter A and Wener M. Determine telomere length dynamics in proliferating cells. *Int Soc Analyt Cytol* 2005, 68A:53-58.
57. Proaño-Narvaez JV, Meza-Lucas A, Mata-Ruiz O, García-Jerónimo RC, Correa D. Laboratory diagnosis of human neurocysticercosis: Double-blind comparison of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Electroimmunotransfer. *Blot Assay* 2002, 40: 2115-2118.
58. Rabiela MT, Hornelas Y, García- Allan G, Rodríguez- del- Rosal E, Flisser A. Evagination of *Taenia solium* cysticerci: a histologic and electron microscopy study. *Arch Med Res* 2000, 31:205-207.
59. Restrepo BI, Aguilar M, Melby PC, And Teale M. Analysis of the peripheral immune response in patients with neurocysticercosis: evidence for T cell reactivity to parasite glycoprotein and vesicular fluid antigens. *Am J Trop Med Hyg* 2001, 65: 366-370.
60. Robinson K, Bellaby T, Wakelin D. Efficacy of oral vaccination against the murine intestinal parasite *Trichuris muris* is dependent upon host genetics. *Inf and Immunity* 1995, 63: 1762-1766.

61. Rokeach LA, Zimmerman PA, Unnasch TR. Epitopes of the *Onchocerca volvulus* RAL1 antigen, a member of the calreticulin family of proteins, recognized by sera from patients with onchocerciasis. *Infect Immun* 1994, 62: 3696-3704.
62. Rosemary M. Cook, Claudia Carvalho-Queiroz, Gregory Wilding, and Philip T. LoVerde. Nucleic acid vaccination with *Schistosoma mansoni* antioxidant enzyme cytosolic superoxide dismutase and the structural protein filamin confers protection against the adult worm stage. *Infect Immun* 2004, 72: 6112–6124.
63. Sarti E, Vedantam R. Measures for the prevention and control of *Taenia solium* taeniosis and cysticercosis. *Acta Tropica* 2003, 87:137-143.
64. Scicchitano, R., Stanisiz, A., Ernst, P.E. and Bienenstock, J. A common mucosal immune system revisited. In: *Migration and Homing of Lymphoid Cells, Volume II* (Ed. Husband, A.J.) CRC Press, Boca Raton, FL, 1988, p. 1
65. Senior K. Bilosomes: the answer to oral vaccine delivery? *DDT* 2001, 20:1031-1032.
66. Shalaby WSW. Development of oral vaccines to stimulate mucosal and systemic immunity: barriers and novel strategies. *Clin Immunol Immunopath* 1995, 74: 127-134.
67. Shi HN, Ingui JC, Dodge I, and Nagler-Anderson C. A helminth-induced mucosal Th2 response alters nonresponsiveness to oral administration of a soluble antigen. *J Immunol* 1998, 160: 2449-2455.
68. Trap C, Boireau P. Proteases in helminthic parasites. *Vet Res* 2000; 31:461-471.

69. Tsuji N, Suzuki K, Kasuga-Aoki H, Isobe T, Arakawa T, Matsumoto Y. Mice intranasally immunized with a recombinant 16 kilodalton antigen from roundworm *Ascaris* parasites are protected against larval migration of *Ascaris suum*. *Inf and Immunity* 2003, 71:5314-5323.
70. Wang J-X, Tang W, Shi L-P, Wan J, Zhou R, Ni J, Fu Y-F, Yang Y-F, Li Y, Zuo J-P. Investigation of the immunosuppressive activity of artemether on T-cell activation and proliferation. *Brit J Pharm* 2007, 150:652-661.
71. Wilkes CP, Bleay C, Paterson S, Viney ME. The immune response during a *Strongyloides ratti* infection of rat. *Parasite Immunol* 2007, 29: 339-346.
72. Winter JA, Davies OR, Brown AP, Garnett MC, Stolnik S, Pritchard DI. The assessment of hookworm calreticulin as a potential vaccine for necatoriasis. *Parasite Immunol* 2005, 27:139-146.
73. Witte PL y Streilein JW. Monoclonal antibodies to hamster class II MHC molecules distinguish T and B cells. *J Immunol* 1983, 130: 2282-2286.

URL's:

www.dgepi.salud.gob.mx/boletin/2008/sem1/index.htm, consulta el 28/02/08