



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

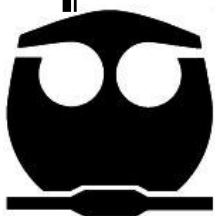
Péptidos Antimicrobianos como agentes terapéuticos  
para la cisticercosis

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**P R E S E N T A**

**Vera Teresa Vega Angeles**



MÉXICO, D. F.

2010



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## JURADO ASIGNADO

**PRESIDENTE:** Abel Gutiérrez Ramos  
**VOCAL:** José Cordero Hernández  
**SECRETARIO:** Abraham Landa Piedra  
**1er. SUPLENTE:** Adriana Guadalupe Mejía Chávez  
**2º SUPLENTE:** Beatriz Ruiz Villafán

**SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:** Este trabajo de Tesis se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular de *Taenia solium*, Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina de la UNAM. México D.F.

**ASESOR DEL TEMA:**

**DR. ABRAHAM LANDA PIEDRA**

---

**SUSTENTANTE:**

**VERA TERESA VEGA ANGELES**

---

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular de *Taenia solium* del Departamento de Microbiología y Parasitología. Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Bajo la dirección del Dr. Abraham Landa Piedra.

El proyecto fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología con el contrato 80134 que corresponde al proyecto “Desarrollo de fármacos Biológicos contra *Taenia solium*” y por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico. Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) con el contrato IN206708-3. Proyecto “Utilización de enzimas glicolíticas para el control de la cisticercosis”

## Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México que me ha permitido llenarme de conocimiento y de orgullo, espero algún día poder retribuirle todo lo que me ha dado.

Al Doctor Landa que me aceptó en su laboratorio un día de septiembre que llegué hasta ahí sin saber casi nada de *Taenia* y mucho menos de lo que es la investigación científica, gracias por haberme incitado a seguir hasta aquí y sobre todo por ser amigo y proveedor de domingos de fútbol.

A mis compañeros del laboratorio de Biología molecular de *Taenia solium*: a la Doctora Lucía Jiménez que me enseñó las metodologías y me ayudó a corregir los errores, a Alice por siempre ser amable y por estar dispuesta a ayudarme cuando lo necesité. A Aramis, Omar, Richie, Vic, Narda y Harely, Vera Lucía, Yanet, Sandra, Marco y sobre todo a Magdis que compartió su espacio vital conmigo en el laboratorio y lo más valioso, sus experiencias.

A Rosa María por ser todo en mi vida, por todo tu cariño, amor, esfuerzo y entrega a mi persona, eres la persona que mas amo en esta y en cualquier vida.

A Mamá y Papá por haberme dado todo lo necesario para llegar a este punto de mi vida.

A María Teresa por ser excelente amiga y compañera, gracias por tu tiempo, apoyo, esfuerzo, consideración y por los años de vida que me dedicaste cuando debiste estar haciendo otras cosas más divertidas.

A Meli por ser una buena hermana menor, por tu apoyo, por los conocimientos compartidos y por todo lo que vivimos día a día. Gracias por la tarea de administración...2014 estaremos ahí.

A Rikys por la comprensión, apoyo, ayuda, defensa y por impulsarme a hacer el ridículo en sus diversas formas.

A Aida por ser hermana incondicional, mejor amiga, confidente, cómplice...no me alcanzarían las líneas para describir todo lo que eres en mi vida. Tu apoyo fue esencial para la realización de este trabajo.

A Rodolfo por ser otro yo pero diferente, por compartirlo todo, por tu confianza y tu constante preocupación, por ser mi mejor amigo, por hacerme una princesa, nunca acabaré de agradecerte.

A Luis David por el apoyo moral y material pero sobre todo por el tiempo y la atención que me dedicas.

A mi hermanito Alex por su cariño, por compartir tus pertenencias más valiosas conmigo y por estar toda la carrera cerca de mí.

A Mario Gallegos, por que sin tu ayuda difícilmente hubiera terminado de escribir. Gracias por hacer mi vida menos caótica y más feliz. Muito obrigada pretinho!

Al Dr. Rodríguez Lima por ser el mejor compañero y amigo tanto del laboratorio como de la carrera. No te imaginas todo lo que me has enseñado. (Cuánto te quiero que hasta de grado te subí).

A Iván Hiram por su apoyo, amistad, por compartir el gusto por los parásitos y los hongos pero más por su valiosa contribución en la realización de esta tesis: dejarse morder por mis ratones.

A Perseo por las pláticas futboleras y por enseñarme que la amistad sincera y desinteresada existe.

A Selene, Rosalía, Jesús, Gustavo, Diego y Paris, por compartir sus vidas y sus familias conmigo desde hace 10 largos años.

A los químicos (fármaco-biólogos, en alimentos e ingenieros): David, Marianis, Ricardo, Meche, Roberto, Zaine, Jess, Luis Fernando, Marcela, Gerardo, Lamberto, Luz y Erik por ser mi familia en la Facultad de Química y sobre todo por los momentos divertidos pasados fuera de ella. Goretti y Sara: especialmente a ustedes por sus palabras siempre de aliento.

A René Arellano por la emoción, la diversión, los videojuegos y por compartir tu familia conmigo. Cuando te vea te voy a dar tus besotes.

A mis amigos del Laboratorio de Micología del Hospital General: Alexandro Bonifaz, Paocina, Javi, Margarita, MariJose, Mari y Marquito con ustedes descubrí lo hermoso que es ejercer la profesión. Los extraño todos los días.

A meus caros irmãos Huguiño, Abrãao, Alminha, Perlinha e Daniel do Nascimento pelos momentos de alegria e caxangas que deram-me a força para seguir adelante.

A la familia Angeles, aunque lejanos siempre han sido un ejemplo para mi.

A la familia Vega por enseñarme como debo y sobre todo, como no debo ser.

A la familia Osorio Bautista por ser excelentes amigos y por haberme brindado un espacio en su vida y en su casa.

Pero sobre todo a Dios por permitirme estar agradeciéndoles en este momento.

**Quien se arrodilla ante el hecho consumado es incapaz de enfrentar el porvenir.**

**León Trotsky.**

## Indice

<b>I. Resumen</b>	1
<b>II. Introducción</b>	2
<i>Taenia solium</i>	3
<i>Taenia crassiceps</i>	5
Epidemiología	7
Diagnóstico	9
Tratamiento	10
Respuesta inmune en ratones	
Balb/c infectados con <i>Taenia crassiceps</i>	11
Péptidos Antimicrobianos	12
Temporina A	14
Iseganan IB-367	15
Efecto de TA e IB-367 sobre cisticercos de <i>T. crassiceps in vitro e in vivo</i>	15
<b>III. Hipótesis</b>	17
<b>IV. Objetivos</b>	18
<b>V. Material y métodos</b>	
Estrategia experimental	19
Material biológico	19
Modelo experimental	20
Obtención de células de bazo	20
Estímulo de linfocitos	21
Determinación de proliferación de linfocitos con MTT	21
Preparación de extracto crudo	22
Determinación de interleucinas por el método de ELISA sándwich	22
Determinación de Inmunoglobulinas en suero	23
Determinación de carga parasitaria	24
Cultivo de cisticercos	24
<b>VI. Resultados</b>	25
<b>VII. Discusión</b>	31
<b>VIII. Conclusiones</b>	36
<b>IX. Referencias</b>	37



## Abreviaturas

°C	Grados Celsius
Con A	Concanavalina A
D.O.	Densidad óptica.
ECL	Extracto crudo de larva
IB-367	Iseganan IB-367
IgG1	Inmunoglobulina G1
IgG2a	Inmunoglobulina G2a
IgG2b	Inmunoglobulina G2b
IgE	Inmunoglobulina E
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-10	Interleucina 10
INF $\gamma$	Interferón $\gamma$
$\mu$ g	microgramos
$\mu$ l	microlitos
ml	mililitros
NC	Neurocisticercosis
OPS	Organización Panamericana de la Salud
Palm-KKNH <sub>2</sub>	Peptido de Ácido Palmítico-Lisinas
PAM	Péptidos Antimicrobianos
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
PHA	Fitohemaglutinina
PZC	Prazicuantel
rpm	Revoluciones por minuto
RPMI	medio Roswell Park Memorial Institute
TA	Temporina A
TLR4	Receptor tipo Toll 4

## Resumen

La taeniosis y la neurocisticercosis son enfermedades causadas por *Taenia solium*. En este cestodo se distinguen tres estadios: el huevo, metacestodo o cisticerco y el gusano adulto, siendo las formas infectivas el huevo y el cisticerco. El humano es el hospedero definitivo y el diseminador de estas enfermedades. *Taenia crassiceps* es también un cestodo, muy relacionado con *T. solium*. El cisticerco de *T. crassiceps* en el ratón tiene la capacidad de reproducirse por gemación, lo que facilita la utilización de este parásito como modelo de infección en el laboratorio. En este proyecto se utilizó este modelo de cisticercosis por *T. crassiceps* para poder determinar el papel de los péptidos antimicrobianos (Temporina A e Iseganan IB-367) en la respuesta inmune. Los péptidos antimicrobianos (PAM) son péptidos pequeños, catiónicos, anfipáticos que tienen la capacidad de matar agentes patógenos, así como de modular la respuesta inmune adaptativa. La Temporina A y el Iseganan IB-367 son capaces de causar daño en el cisticerco de *T. crassiceps in vitro* e *in vivo* disminuyendo la carga parasitaria en el ratón.

En este trabajo se estableció el modelo de cisticercosis murina por *Taenia crassiceps* cepa WFU, se determinó el perfil de interleucinas tanto para ratones infectados como para ratones infectados y tratados con los PAM antes mencionados y con el fármaco prazicuantel. Dichos péptidos no modificaron la respuesta inmune en este modelo de infección, aunque el péptido IB-367 fue capaz de producir proliferación de linfocitos *in vitro* y disminuir la carga parasitaria en un 20%. El prazicuantel disminuyó la carga parasitaria en un 70% mas no presentó efecto sobre la respuesta inmune. Otros PAM estudiados como el Palm-KKNH<sub>2</sub> y el Histatin 5 afectan la viabilidad de los cisticercos por lo que son candidatos para realizar estudios concernientes a desarrollar nuevas formas de matar a *Taenia solium*.

## II. Introducción

La taeniosis y la cisticercosis son enfermedades que afectan al ser humano causadas por el parásito *Taenia solium*. La forma más grave de la cisticercosis es la neurocisticercosis, en la cual el cisticerco o metacestodo (forma larvaria de este parásito) se aloja en el sistema nervioso del hospedero. Este padecimiento es de importancia en salud pública debido a la discapacidad producida por sus síntomas neurológicos y por su letalidad, sin embargo, generalmente el curso que sigue esta parasitosis es benigno. Esta enfermedad se desarrolla cuando el hospedero definitivo, que es el humano ingiere huevos de *Taenia* propiciado por las malas prácticas de higiene. La condición más comúnmente asociada con neurocisticercosis es la epilepsia. Un gran número de estudios muestra una fuerte asociación (por arriba del 50%) entre la epilepsia tardía y la neurocisticercosis en áreas endémicas para *T. solium*. (García et al., 1995)

La taeniosis es la enfermedad en la cual el cisticerco al ser ingerido por el hospedero definitivo (el humano) es activado por los ácidos gástricos y las sales biliares para finalmente establecerse en el intestino delgado donde se desarrolla en la forma adulta de este parásito. Existen dos especies de *Taenia* que causan taeniosis en el humano: *Taenia solium* y *Taenia saginata*, ésta última con la diferencia de que utiliza como hospedero intermediario a los bovinos. El parásito adulto produce huevos que son expulsados intermitentemente por el humano infectado con el consecuente riesgo de infectarse a si mismo, a su familia y si tiene, al ganado porcino (ver Fig.2). (Flisser A. 2006)

La cisticercosis porcina se presenta cuando el cerdo ingiere huevos o proglótidos grávidos de *T. solium* presentes en materia fecal. Cuando la oncósfera, que se encuentra dentro del huevo, es activada por las sales biliares y enzimas proteolíticas puede atravesar la mucosa intestinal y llegar así al torrente sanguíneo distribuyéndose a distintos órganos. El cerdo infectado desarrolla los cisticercos que se alojan en zonas de alto gasto energético como son el músculo y el cerebro.

La prevalencia y tendencia a dispersarse de estas enfermedades se ha acelerado notablemente debido a la pobreza, mala infraestructura de salud pública, la explosión demográfica, la crianza rural e intensiva de cerdos, el desarrollo de las vías de comunicación entre diversas partes del mundo y por el masivo movimiento de migrantes trabajadores y turistas. (Larralde C. y De Aluja A, 2008)

### ***Taenia solium***

*Taenia solium* pertenece al *phylum Platyhelminthes*, clase *Cestoda*, orden *Cyclophyllidae*, familia *Taenidae*, género *Taenia*, especie *solium* (Linneaus, 1758). El estadio adulto es aplanado, segmentado, blanquecino (Fig. 1C) y se encuentra anclado a la mucosa intestinal debido a la presencia de un órgano de fijación llamado escólex. Este órgano presenta un rostelo armado con dos coronas de ganchos (que pueden variar entre 22 y 32 ganchos) y cuatro ventosas. Seguido de este órgano se encuentra el cuello, que es un área germinal no segmentada que da origen a los proglótidos que forman el estróbilo o cuerpo del gusano. Los proglótidos que están cubiertos por una membrana tegumentaria que posee microticas, a través de la cual asimilan el alimento, ya que carecen de tubo digestivo. Dependiendo de sus características van a ser identificados como proglótidos inmaduros, maduros y grávidos. Los inmaduros son aquellos que no tienen órganos sexuales diferenciados y se encuentran cerca del cuello, le siguen los maduros que tienen órganos sexuales diferenciados y son considerados como una unidad reproductora independiente dado que poseen órganos genitales masculino y femenino en los que se lleva a cabo la fecundación (Flisser A. 2006). Los proglótidos distales son los grávidos, en los cuales se encuentran las ramas uterinas llenas de huevos. Estos proglótidos suelen desprenderse del parásito en segmentos cortos de manera que pueden ser algunas veces encontrados en las heces. Los huevos son esféricos y morfológicamente muy parecidos a los de otras tenias (Fig. 1A). La cubierta más externa es el vitelo, le sigue el embrióforo que le confiere el aspecto estriado al huevo y que es la más importante en su protección. Dentro de estas capas se encuentra el embrión hexacanto cubierto por la membrana oncosferal. Cuando el huevo es ingerido por el hospedero intermediario o, accidentalmente por el humano, eclosiona en el intestino liberando la oncósfera, que va a penetrar la mucosa

logrando llegar al sistema circulatorio, distribuyéndose a diferentes tejidos en los cuales se va a desarrollar (ver Fig. 2). Estos tejidos pueden ser músculo esquelético, sistema nervioso, ojos y tejido subcutáneo. (Larralde C y De Aluja A, 2008; Meza-Lucas A., Aguilar F., 2002). El cisticerco (Fig. 1B) es una vesícula ovalada translúcida recubierta por la pared vesicular que mantiene invaginado el escólex. La pared vesicular esta formada por un tegumento que en su superficie presenta microtricas rodeadas de una membrana plasmática, es por esta que absorbe nutrientes y excreta sustancias de desecho, se defiende e interacciona con el hospedero. La superficie tegumentaria del metacestodo está compuesta por un denso glicocálix formado por carbohidratos, glicoproteínas, glicolípidos y triglicéridos, colesterol y fosfatidilserina, dándole a la superficie una carga negativa. (Landa A. et al, 2009)

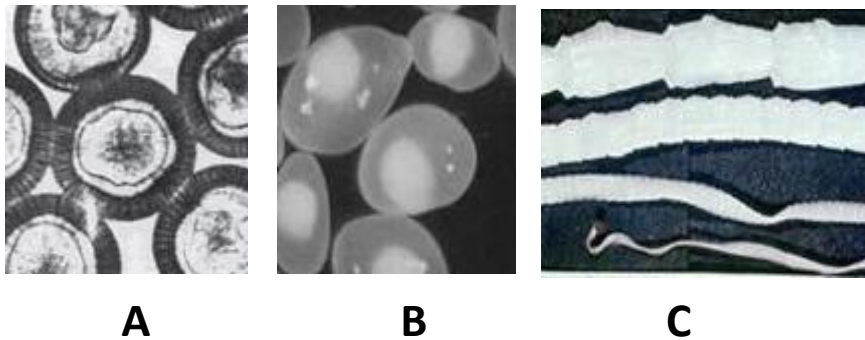


Fig.1. A) Fotografía de microscopía de luz de huevos y B y C) fotografía de microscopio óptico de larva y adulto *Taenia solium*. Tomada de (Larralde C. y De Aluja A., 2008)

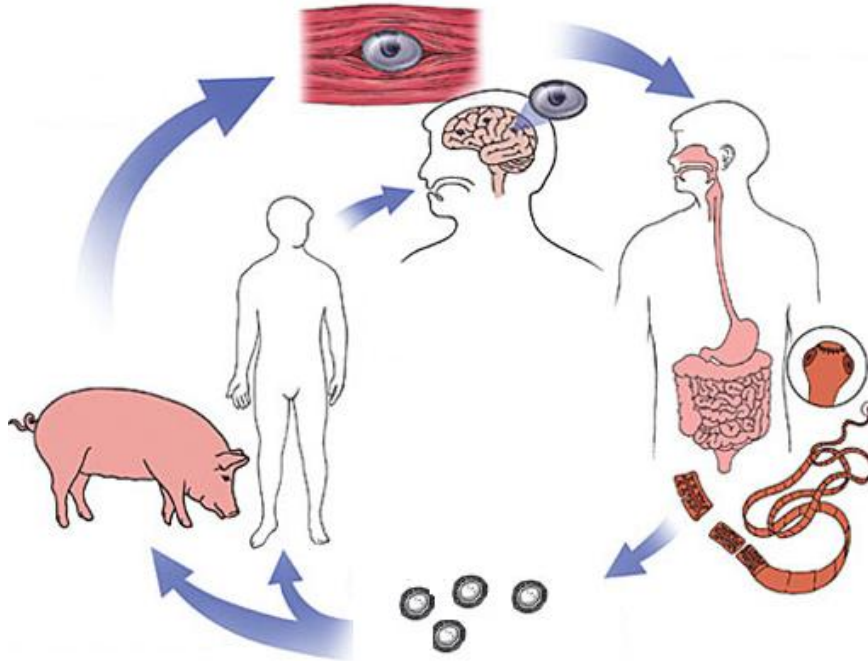


Fig. 2 Ciclo de vida de *Taenia solium*, el hospedero intermediario es el cerdo que, al ingerir huevos provenientes del parásito adulto, se desarrollan a la forma larvaria en zonas de alto gasto energético como es el músculo. Cuando el hospedero definitivo (humano) consume la carne de este cerdo se cierra el círculo desarrollando la tenia. La cisticercosis humana aparece cuando el humano ingiere los huevos debido a malas prácticas de higiene. Modificado de [www.aafp.org/afp/2007/0701/afp20070701p91-f1.jpg](http://www.aafp.org/afp/2007/0701/afp20070701p91-f1.jpg).

### ***Taenia crassiceps***

*Taenia crassiceps* es un parásito de zorros, lobos y perros (hospederos definitivos) y que se reproduce asexualmente por gemación en el tejido del hospedero intermediario. El ciclo de vida de esta tenia (Fig. 3) es parecido al de *T. solium*. En una infección natural, el parásito adulto se desarrolla en el intestino del zorro produciendo proglótidos maduros y huevos que son excretados en las heces. Cuando el ratón (hospedero intermediario) ingiere estos huevos, las oncósferas atraviesan la pared intestinal y se diseminan a diferentes órganos, principalmente tejido subcutáneo, pleura y peritoneo, estableciéndose en la forma larvaria. El ciclo se cierra cuando el hospedero intermediario es ingerido por el hospedero definitivo y los cisticercos se fijan en la mucosa del duodeno madurando hasta convertirse en el estadio adulto. (Willms K. and Zurabian R., 2009, Mooney K. et al 2000) Existen al menos otras 3 cepas de este parásito, una denominada Hyg similar a la WFU, ambas con escólex y otra denominada ORF que carece de él (Parra R, 2006).

En el modelo murino de *T. crassiceps* se aprovecha la capacidad de esta tenia para reproducirse de forma rápida y en hospederos de fácil manejo en el laboratorio, así como la similitud antigénica con *T. solium* que permiten extrapolar los conocimientos de este modelo a la infección causada por *T. solium*. La infección se desarrolla en la cavidad peritoneal de ratón permitiendo recuperar los cisticercos manteniendo la cepa por inoculaciones seriadas. (Willms K. y Zurabian R., 2009). La cisticercosis murina ha mostrado ser un modelo de infección muy útil en el estudio inmunológico, genético y en el de los factores de resistencia y susceptibilidad asociados al género. (Terrazas L, 1998).

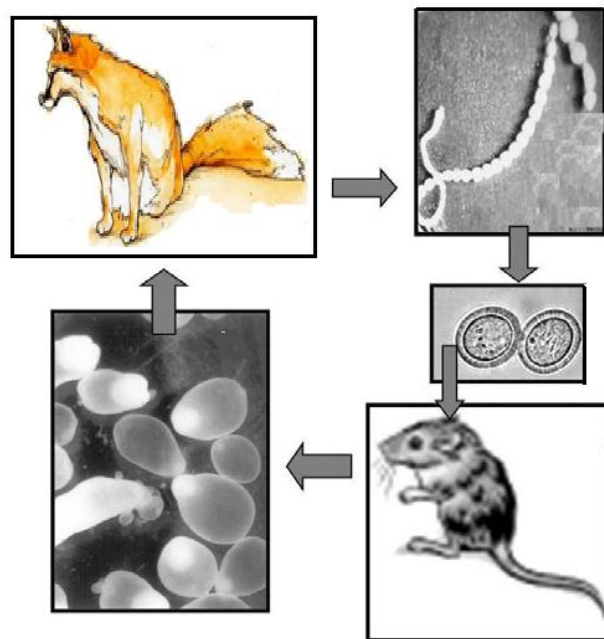


Fig. 3 Ciclo de vida de *Taenia crassiceps*. El hospedero intermediario (el ratón) alberga la larva del parásito que al ser ingerido por el hospedero definitivo (el zorro) desarrolla al estadio adulto generando proglótidos gravados y huevos que son liberados en las heces al ambiente. (Modificado de Willms K. and Zurabian R., 2009)

El patrón general de crecimiento de la infestación de *T. crassiceps* por inoculación intraperitoneal varía dependiendo del estado, cantidad del inóculo y días post infección. La especie del hospedero, cepa y sexo también afectan la dinámica de este desarrollo, al igual que la cepa del parásito. Algunos estudios han demostrado el rápido crecimiento de la infestación de los cisticercos de *T. crassiceps* en particular la cepa

ORF siendo la cepa WFU de crecimiento más lento que la cepa aneuploide antes mencionada. (Everhart M, 2004).

En un estudio realizado en el Laboratorio de Biología Molecular de *Taenia solium* de la Facultad de Medicina, se encontró que la mayor cantidad de parásitos de la cepa WFU se obtuvo a los 6 meses de infección con una aparición de cisticercos calcificados del 0.21% que aumentaron al 20% en los ratones con más de 6 meses de infección. Se observó que el mejor tiempo para la obtención de parásitos utilizados en los experimentos fue el de 5 meses (Fig. 4).

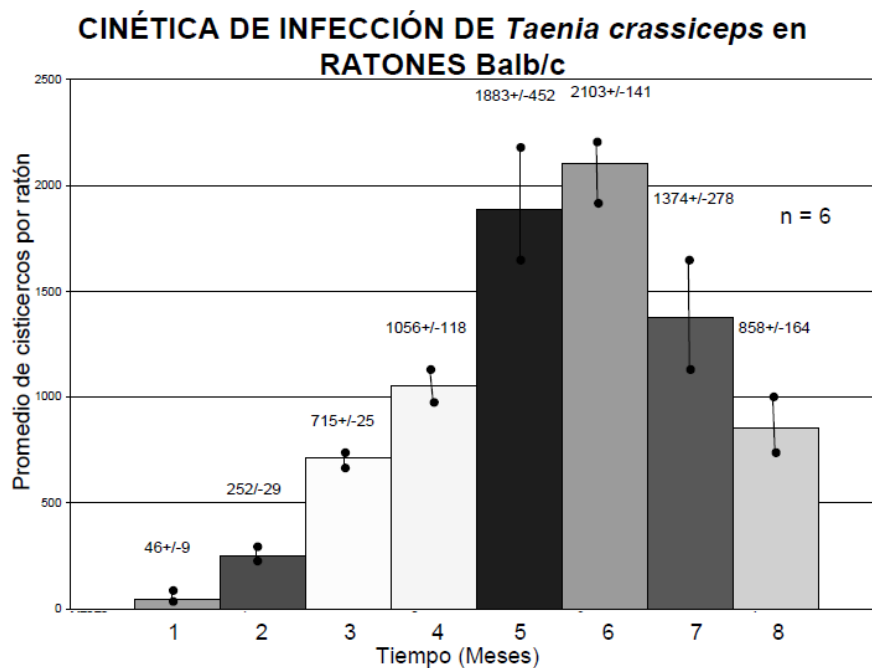


Fig. 4 Cinética de infección de *T. crassiceps* en ratones Balb/c (6 hembras de 10 semanas de edad por mes, inóculo: 20 cisticercos por ratón); sobre las barras se muestra el promedio de cisticercos por ratón en los diferentes meses de infección. Las barras verticales muestran el error estándar. (Tomada de Parra R. 2006)

### Epidemiología

El primer caso de cisticercosis humana fue publicado por el doctor Ignacio Gómez Izquierdo en una paciente cubana que falleció en un asilo psiquiátrico en 1910. En 2003 la taeniosis y la cisticercosis, fueron declaradas endémicas en América. Debido a que la prevalencia de esta enfermedad varía dependiendo de la técnica empleada para el



diagnóstico, es importante notar que en una misma zona pueden encontrarse diferentes prevalencias. La estandarización de las técnicas inmunológicas permitió el diagnóstico de la cisticercosis por medio de la detección de anticuerpos en suero. Desde el año 1990 hasta el 2005 ha habido una disminución de la incidencia en taeniosis considerable, mientras que en el caso de la cisticercosis, esta incidencia se ha mantenido. La incidencia nacional para la cisticercosis es del 0.29 por cada 100,000 habitantes con 13 estados de la república mexicana. Los estados más afectados son Jalisco con 1.03 e Hidalgo con 0.92, además de 7 estados que no tienen reporte de este diagnóstico. (Vigilancia epidemiológica, 2007)

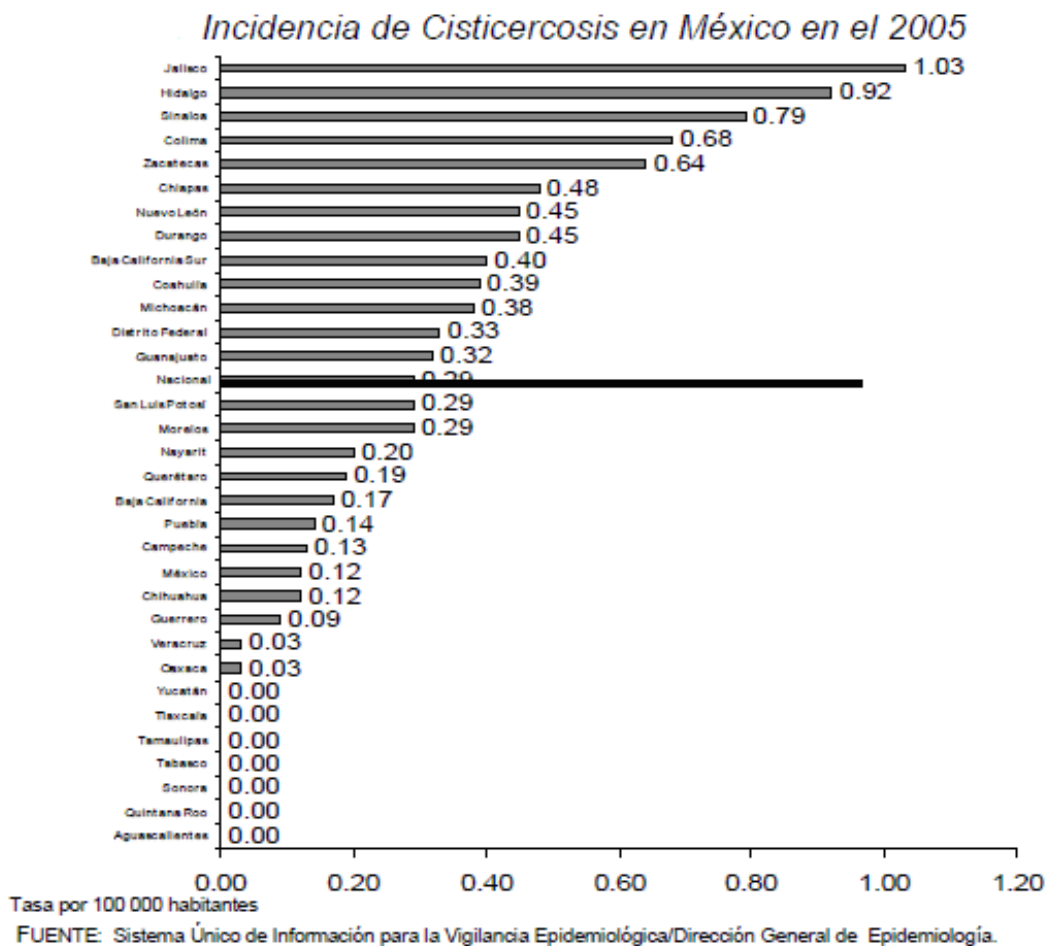


Fig. 5 Incidencia de la cisticercosis en México. Los estados con mayor incidencia son Jalisco e Hidalgo y con la menor Oaxaca y Veracruz. La media nacional es del 0.29 por cada 100 000 habitantes. (Tomado de Vigilancia epidemiológica Semana 4, 2007)

## Diagnóstico

Para el diagnóstico de la taeniosis la situación usual es la observación microscópica de huevos mediante métodos coproparasitológicos como el de concentración por flotación (Faust), sedimentación (Ritchie) o el de frotis grueso (Kato-Katz). Estas técnicas presentan baja sensibilidad ya que detectan menos de la mitad de los casos cuando se analiza solo una muestra de heces sin contar con que la presencia de huevos solo permite identificar que está presente la infección pero no permite discriminar a cual especie pertenece. (Meza-Lucas, Aguilar Rebolledo, 2002)

Para el diagnóstico de la neurocisticercosis se cuenta con las técnicas de imagen: tomografía computarizada y resonancia magnética que permiten definir el número, estadio, localización y extensión de las lesiones cerebrales. También se cuenta con las técnicas inmunológicas que son de bajo costo comparadas con los estudios de imagen. En estas técnicas se detectan anticuerpos anticisticercosis (en suero o líquido cefalorraquídeo) ya sea por inmunoelectrotransferencia (IET) con una fracción de glicoproteínas, ELISA (utilizando como antígeno extractos crudos de cisticercosis o el antígeno B), inmunoelectroforesis (IEF) e inmunofluorescencia indirecta (IFI), sin embargo estas no nos permiten distinguir entre una infección activa y una ya resuelta (Flisser et al, 2006) y presentan reacciones cruzadas con otros parásitos (Espinoza et al, 1986). Utilizando antígenos de excreción/secreción la sensibilidad y especificidad de ELISA aumentan encontrándose por EIBT que el 88% de los LCR probados contienen IgG específicas a antígenos de 95, 49 y 29 KDa. (López J. et al, 2004). Aplicando la técnica de IET y utilizando fracciones glicoproteicas purificadas de *T. solium*, Tsang ha logrado identificar glicoproteínas (GP50, 42, 24, 21,18, 14.13) que son específicas para el diagnóstico de este parásito encontrando un 98% de sensibilidad y un 100% de especificidad (Tsang et al, 1989) pero que al probarse en sueros de pacientes de zona endémica con neurocisticercosis, baja la sensibilidad al igual que cuando se prueba con sueros de pacientes con lesiones únicas (García et al, 1991, Wilson et al, 2001).

### **Tratamiento.**

La quimioterapia de la neurocisticercosis incluye tres tipos de medicamentos: los cestocidas, los corticoesteroides para disminuir la inflamación y otros fármacos para el manejo de síntomas, como la epilepsia, el dolor de cabeza o trastornos de comportamiento (Sotelo J. 1998)

La quimioterapia con prazicuantel (PZC) está indicada para pacientes con cisticercos viables (Sotelo J., 1987), este fármaco es seguro y efectivo contra todos los trematodos, cestodos adultos y contra algunas larvas de cestodos (Harnett W. 1988), sin embargo puede provocar una reacción inflamatoria intensa alrededor del cisticerco dañado y ocasionalmente causar síntomas neurológicos cuando es usado para tratar taeniosis en individuos con NC asintomática. Este fármaco actúa directamente sobre el parásito causando contracción muscular (Fetterer et al., 1980) y ruptura tegumentaria (Mehlhorn et al., 1981) con la consecuente exposición de antígenos (Harnett and Kusel, 1986) aunado a cambios en la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  (Redman et al., 1996). Tomando como base el costo-beneficio, los efectos adversos no son razón suficiente para excluir al PZQ como un tratamiento para administración a gran escala, sin embargo, deben tomarse las precauciones apropiadas. (Pawlowski Z., et al. 2005)

El albendazol es muy efectivo para el tratamiento de las helmintiasis y es uno de los medicamentos que se utilizan en las campañas masivas de desparasitación sobre todo en niños escolares. (Mascie G. et al 1999). El mecanismo de acción se basa en su capacidad para modificar el metabolismo de carbohidratos mediante la inhibición de la enzima fumarato reductasa. (Prichard R 1973), así como en su unión a la tubulina impidiendo la polimerización de los microtúbulos (Lacey E., 1988).

La OPS recomienda el uso de albendazol como el tratamiento de elección para la neurocisticercosis poniendo al prazicuantel como segunda opción, u ambos combinados con corticoesteroides. (OPS, 2004)

## **Respuesta inmune en ratones Balb/c infectados con *Taenia crassiceps*.**

La respuesta inmune en ratones Balb/c desarrollada frente a la infección con cisticercos de *Taenia crassiceps* (cepa ORF) ha sido ampliamente caracterizada. La inoculación de cisticercos en la cavidad peritoneal de estos ratones provoca la presencia de una respuesta inmune predominantemente celular, y aunque el hospedero es capaz de desarrollar anticuerpos específicos en contra de los antígenos del metacestodo, ésta es insuficiente para la protección y defensa (Cherning J. 1997, Sciutto et al 1991). Se ha observado que las células T están involucradas en la respuesta inmune restrictiva para esta infección, siendo la respuesta Th1 la predominante en la resistencia mientras que la Th2 está asociada con altas cargas parasitarias (Terrazas I. et al. 1999, 1998) Los macrófagos peritoneales alternativamente activados estimulados por los antígenos, en este caso los carbohidratos de la superficie tegumentaria del cisticerco, son la fuente temprana y principal de la IL-6 por la vía TLR 4 (Dissanayake S et al. 2004). Sin embargo, puede notarse que al inicio de la infección (1a-2a semana post-infección) cuando de la cavidad peritoneal se recuperan muy pocos o ningún cisticerco, la respuesta es del tipo Th1 con altos niveles de  $IFN\gamma$ , normales de IL-2 y presencia de anticuerpos específicos predominantemente isotipo IgG2a. Al avanzar a la 4a semana post-infección la producción de IL-2 e  $INF\gamma$  declina, más los niveles de IL-4, IL-6, IL-10, los anticuerpos anticisticerco IgG2b e IgG1, todos promotores de la respuesta tipo Th2, están incrementados en ratones parasitados de manera crónica. (Terrazas et al, 1998). En estado crónico de infección se sabe que los macrófagos adquieren un fenotipo de alternativamente activados que puede suprimir la proliferación de células T, promover el desarrollo de células tipo Th2 la cual cambia la respuesta de las células B para que dejen de producir IgE y modular la anergia celular inhibiendo la capacidad de proliferación de las células de bazo en respuesta a un estímulo antígeno específico (Vera L, 2010). La activación diferencial de la respuesta tipo Th1-Th2 juega un papel crucial en la resistencia o susceptibilidad del hospedero a esta infección. Por su parte el cisticerco produce factores anticomplemento, tiene receptores Fc que unen los anticuerpos producidos por el hospedero, absorbe proteínas del hospedero como

nutrientes y produce mediadores anti- inflamatorios que parecen jugar un papel en el bloqueo de la respuesta efectora en la interfase hospedero-parásito (Everhart M, 2004). Otros factores biológicos también influyen en la infección por este parásito como son el ambiente hormonal y la genética.

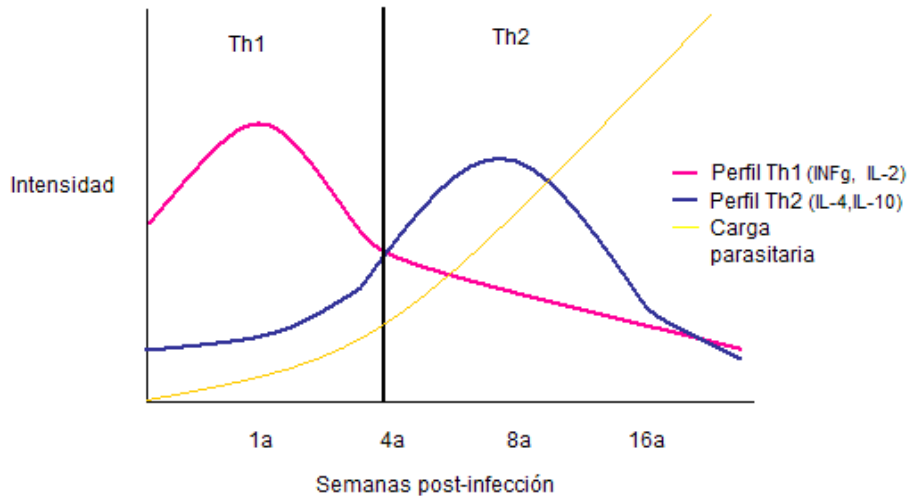


Fig. 6 Gráfica donde se muestra el perfil de Interleucinas tanto del tipo Th1 como Th2 a través del tiempo y hasta la semana 16 de infección en ratones Balb/c inoculados con 10 cisticercos de *Taenia crassiceps* cepa ORF (Modificado de Terrazas I. et al, 1998).

### **Péptidos Antimicrobianos (PAM)**

Los Péptidos Antimicrobianos catiónicos compuestos de 12-50 aminoácidos con cargas entre +2 y +7 son producidos en todas las especies vivas incluidas bacterias, hongos, plantas, insectos, aves, crustáceos, anfibios y mamíferos, y son importantes para la defensa del hospedero en zonas localizadas. Estos péptidos son producidos en grandes cantidades en el sitio de infección y/o inflamación por la respuesta inmune innata y pueden tener un amplio espectro antibacterial, antifúngico, antiviral y antiprotozoario, así como propiedades antisépticas. También actúan como señalizadores intracelulares y coordinan la respuesta inmune innata y adaptativa, influenciando procesos como la liberación de interleucinas, la proliferación celular, angiogénesis y quimiotaxis. (Hancock R y Diamond G, 2000).

En humanos los péptidos antimicrobianos, como las catelicidinas y defensinas, están presentes en casi todas las mucosas, leucocitos y son también secretados en tejido epitelial. (Hancock R., 1999)

Debido a su carácter catiónico presentan afinidad por interactuar con los fosfolípidos aniónicos de las membranas bacterianas. Algunos han presentado también actividad lítica, con cierta selectividad, sobre células cancerosas. La mayoría de estos péptidos pueden adoptar una estructura de  $\alpha$  hélice anfipática en un ambiente hidrofóbico perturbando la bicapa lipídica de la membrana blanco. (Mangoni L. et al. 2000) Otros adoptan estructura de hojas  $\beta$  estabilizadas por puentes disulfuro y los menos comunes, son péptidos extendidos con predominancia de uno o dos aminoácidos (prolina, triptófano o histidina). También hay péptidos formados por digestión proteolítica de proteínas catiónicas más largas como la lactoferrina. (Hancock R y Diamon G, 2000)

Se han sugerido dos mecanismos de destrucción de microorganismos por estos péptidos: el primero involucra la formación de canales o poros debidos a la interacción electrostática directa con los componentes negativos de la membrana celular del patógeno, seguido de la inserción en dicha membrana. El segundo involucra la permeabilización de la membrana y la interacción con blancos aniónicos dentro de la célula (Landa A. et al 2009).

Algunas ventajas de estos péptidos como fármacos son: su amplio espectro anti infeccioso, bajo potencial para inducir resistencia y su actividad anti inflamatoria, sin embargo presentan también desventajas: sus altos costos de síntesis, algunos presentan toxicidad local y sistémica, susceptibilidad a proteólisis, la reducción de su actividad en ciertas condiciones de pH, salinidad, en suero, sensibilidad y alergia después de repetidas administraciones, entre otras.

Estos PAM presentan potenciales estrategias para su aplicación terapéutica: 1) como agente anti infeccioso por si solo, 2) en combinación con antibióticos o antivirales para promover cualquier efecto sinergista o aditivo, 3) como agente inmunoestimulador que actúe sobre la inmunidad innata y 4) como agente neutralizante de endotoxinas para prevenir complicaciones potencialmente fatales asociadas con factores de virulencia causantes de shock séptico. (Gordon Y.J, 2005).

## Temporina A

Las Temporinas son PAMs de 10-13 residuos, aislados de secreciones de piel de la rana roja europea *Rana temporaria*. Estos se encuentran dentro de los gránulos de las glándulas holócrinas dérmicas (Fig. 7) y son liberadas en las secreciones de la piel como una reacción ante estrés o daño (Simmaco M. et al, 1998). Todas las temporinas están amidadas en el C-terminal y contienen un residuo básico, ya sea lisina o arginina. La secuencia de Temporina A es: FLPLIGRVLSGIL-NH<sub>2</sub>, tiene un peso molecular de 1396 Da, hidrofobicidad de 0.5876, posee carga neta de +2 y adopta una estructura de  $\alpha$  hélice en un ambiente hidrofóbico (Mangoni L, et al. 2000). Existen diferentes hipótesis sobre el mecanismo de acción por el cual las temporinas matan a los microorganismos: la inserción en el núcleo hidrofóbico de la membrana celular, la interacción con las

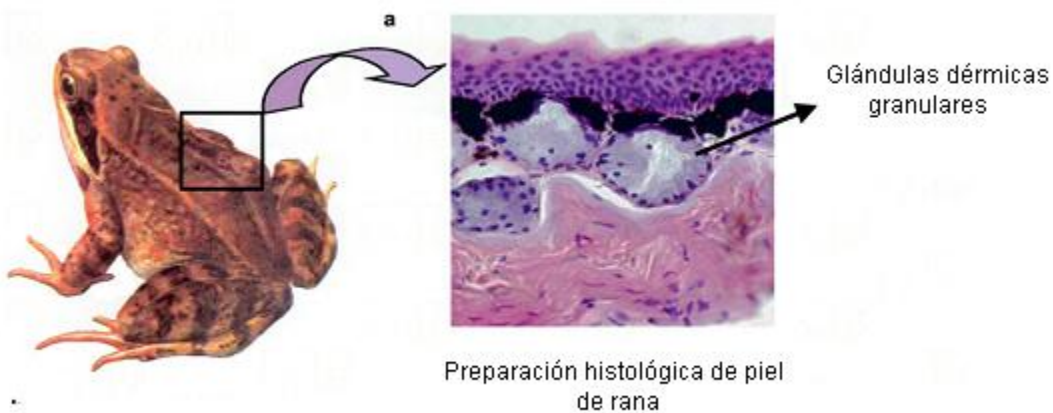


Fig 7. Los péptidos antimicrobianos de la piel de rana son producidos por las glándulas dérmicas serosas, localizadas en la región dorsal del animal y son controlados por axones simpáticos. (Tomado de Mangoni L., 2006)

cabezas aniónicas y las colas hidrocarbonadas de los fosfolípidos bacterianos, uniendo DNA o alterando la actividad enzimática. (Giacometti A, 2005). Para el caso de los parásitos, la TA ha demostrado tener actividad anti-Leishmania en concentraciones micromolares, sin actividad hemolítica, manteniendo su función biológica en suero y sin daño a macrófagos de ratón. Este mecanismo involucra la permeabilización de la membrana induciendo un rápido colapso del potencial de membrana dañándola y reduciendo niveles de ATP intracelular. Al interaccionar directamente con la membrana

destruyendo su integridad, es muy difícil que el parásito desarrolle resistencia (Mangoni L, 2005). El péptido inicialmente se une electrostáticamente a la membrana aniónica, el cual estabiliza su estructura  $\alpha$  hélice anfipática, requerido para la perturbación subsecuente de la membrana.

Esta temporina posee otras funciones no antimicrobianas similares a otros PAMs de mamíferos:  $\beta$ -defensinas y catelicidinas, tiene efecto quimiotáctico en fagocitos humanos, presumiblemente mediado por receptores de superficie celular. Este importante vínculo entre el sistema inmune innato y adaptativo (por medio del reclutamiento de células inmune al sitio de infección) adiciona características benéficas a las temporinas para ser desarrolladas como fármacos (Mangoni L., 2006).

### **Iseganan (IB-367)**

Iseganan (RGGLCYCRGRFCVCGR-NH<sub>2</sub>) es una defensina sintética derivada de la protegrina 1 que se encuentra naturalmente en leucocitos de cerdo. Es un péptido catiónico con estructura de hojas  $\beta$  y puentes disulfuro (Martin E. et al. 1995) rico en cisteína, con una carga neta de +5, un peso molecular de 1900 Da y una hidrofobicidad de -0.1394 (Panyutich A. et al 1997; Landa A. et al 2009). Posee un amplio espectro de actividad *in vitro* contra bacterias gram positivas aerobias, anaerobias y gram negativas, así como contra levaduras. Es un rápido microbicida en saliva, tiene una baja propensión a inducir resistencia. (Chen J. et al. 2000) y mantiene su actividad en presencia de suero (Martin E. et al. 1995). El IB-367 ha sido desarrollado como un enjuague bucal para tratar la estomatitis en pacientes con alto riesgo de desarrollar esta enfermedad y ha llegado a ensayos de fase III. También se ha probado como un fármaco en forma de aerosol para el tratamiento de la neumonía causada por ventilación artificial en pacientes en terapia intensiva. (Gordon Y. et al; Kollef M et al. 2005)

### **Efecto de TA e IB-367 sobre cisticercos de *T. crassiceps* *in vitro* e *in vivo***

Se ha mostrado que ambos péptidos son capaces de destruir las larvas de este parásito *in vitro*, en este caso el IB-367 produce mayor daño morfológico que el péptido TA. Sin embargo, la TA tiene un mejor efecto terapéutico que el IB-367 *in vivo* (Fig. 8),



reduciendo la carga parasitaria en ratones infectados sin que haya una diferencia al tratarlos con bajas o altas dosis de péptidos y mostrando que, aunque se abate la carga parasitaria, no son capaces de matar a todos los cisticercos, desarrollándose de nuevo la infección a partir de las larvas sobrevivientes. Por microscopía electrónica se ha visto que estos péptidos inducen cambios en la membrana tegumentaria observándose formación de grandes vesículas con aglutinación, pérdida de microtricas y destrucción de la membrana. También producen pérdida de la motilidad, encogimiento de la vesícula y disminución de la evaginación sugiriendo que estos péptidos pueden dañar al escólex y así evitar su implantación en el intestino del hospedero. (Landa A. et al, 2009)

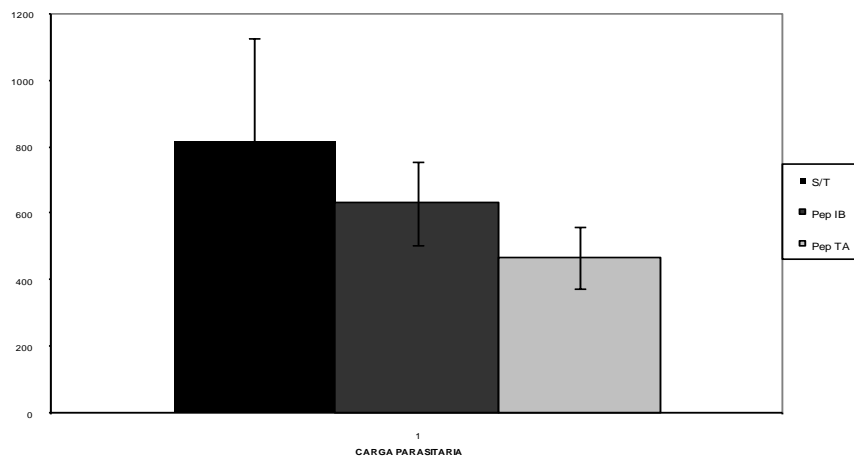


Fig. 8 Efecto de PAMs en ratones infectados con *Taenia crassiceps* donde se observa la reducción de la carga parasitaria después de la administración de una dosis única de estos péptidos en ratones con un mes de infección con *Taenia crassiceps* (WFU). Los ratones del grupo marcado como S/T fueron inyectados con PBS, IB con Isegran IB-367 y TA con Temporina A. Las barras muestran la DS del número de cisticercos por ratón. (Tomado de Landa A. et al, 2009)

Se sabe que al inicio de la infección se da una respuesta inmune del tipo Th1 que es restrictiva para este parásito. Por otro lado, los PAMs son antiinflamatorios y son reguladores de la respuesta inmune innata, además de que han mostrado capacidad de abatir la carga parasitaria en el modelo de ratón-*T. crassiceps*. Por lo que este trabajo pretende estudiar el papel de los PAMs (TA y IB-367) sobre la respuesta inmune temprana de un ratón infectado con cisticercos.

### **III. Hipótesis**

Los péptidos antimicrobianos al ser administrados en la fase temprana de la infección en el modelo ratón-*Taenia crassiceps*, cuando prevalece la respuesta Th1 (protectora), por sus propiedades inmunológicas (moduladores y destructores) serán capaces de mantener esta respuesta evitando la polarización a una tipo Th2.

## **IV. Objetivos**

### **Objetivo general.**

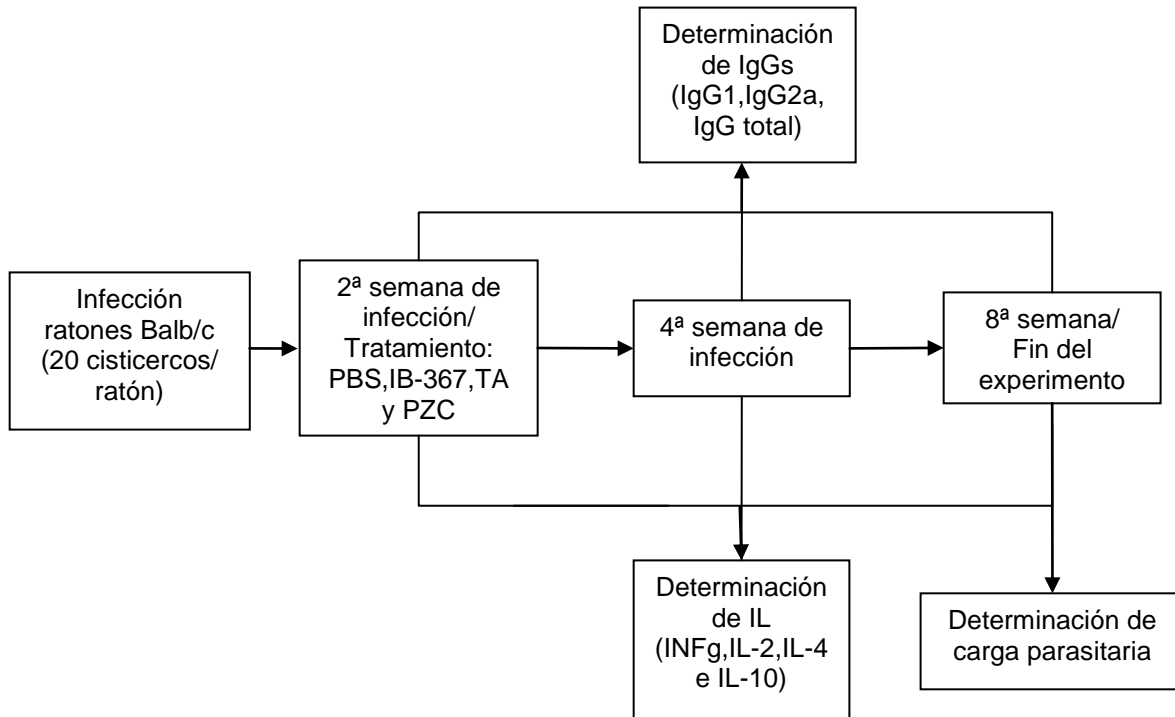
Estudiar la participación de los péptidos antimicrobianos (Temporina A e Iseganan IB-367) durante la respuesta Th1 en cisticercosis murina.

### **Objetivos particulares**

- Establecer el modelo de cisticercosis murina.
- Determinar si los péptidos antimicrobianos tienen efecto sobre los linfocitos en cultivo.
- Evaluar el papel de los péptidos antimicrobianos sobre ratones cisticercosos con respuesta Th1 temprana.
  - a) Carga parasitaria
  - b) Determinación de la respuesta inmune

## V. Material y Métodos

### Estrategia experimental



### Material biológico

Ratones de la cepa Balb/c infectados con cisticercos de *T. crassiceps* fueron facilitados por la Facultad de Medicina. Los cisticercos se obtuvieron de la cavidad peritoneal de estos ratones infectados por 6 meses. Estos parásitos fueron lavados con solución de fosfato estéril y utilizado para realizar cultivos.

## **Modelo experimental.**

Se estableció el modelo de cisticercosis murina ratón-*Taenia crassiceps* (cepa WFU). Ratones hembra Balb/c de 7 semanas de edad, se inyectaron con 20 cisticercos en la cavidad peritoneal. Cinco meses después, de los ratones fueron extraídos cisticercos viables con una vesícula clara, no calcificados, sin gemas y con un tamaño de aproximadamente 2 mm de diámetro. Después fueron lavados con PBS estéril para luego inyectarlos en el peritoneo de nuevos ratones con agujas del 18 G (20 cisticercos/ratón) suspendidos en aproximadamente 500  $\mu$ l de PBS estéril.

Para los experimentos se formaron cuatro grupos de 11 ratones cada uno, un grupo control de ratones infectados, el segundo grupo de ratones infectados y tratados con 200 $\mu$ g de Iseganan IB-367, otro grupo de ratones infectados y tratados con 200 $\mu$ g de Temporina A y el último grupo de ratones también infectados pero tratados con Prazicuantel (15mg/kg) Todos los tratamientos se administraron a la 2a semana de infección. Los ratones fueron mantenidos en condiciones normales con alimento y agua *ad libitum*.

Se sangró a los ratones al tiempo cero (sangrado preinmune) y a las 2, 4 y 8 semanas post-infección Para la obtención de la sangre se realizó una pequeña incisión en el tercio proximal de la cola de los ratones, se colectó la sangre en un tubo eppendorf de 1.5 ml y se centrifugó a 3000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5415 C) durante 10 minutos, para después separar el suero y guardarlo en congelación a -20°C hasta su uso.

## **Obtención de células de bazo**

Los ratones fueron sedados con 50  $\mu$ l de Rompun (Clorhidrato de Xilazina, Bayer) para posteriormente ser sacrificados por dislocación cervical. En condiciones de esterilidad se extrajo el bazo de dos ratones por cada grupo, se colocó cada bazo en 2 ml medio RPMI (Sigma), las células se obtuvieron por maceración y cribado. En tubos Falcon de 15 ml se recolectaron dichas células y se centrifugaron a 1,300 rpm (Labofuge 400, Heraeus Instruments) por 10 minutos. El sobrenadante se decantó y se agregó 3 ml de solución de lisis, procediendo a centrifugar a 1300 rpm por 10 minutos. Este paso se

repitió tantas veces como fuera necesario hasta obtener un sobrenadante sin residuos hemáticos visibles. Este sobrenadante se desecha y se agregan 2 ml de medio RPMI centrifugando una vez más a 1,300 rpm (Labofuge 400, Heraeus Instruments) por 10 minutos. El sobrenadante se desecha y la pastilla celular se re suspende en 2 ml de medio RPMI. Se realizó el conteo de células (10  $\mu$ l de suspensión celular + 85  $\mu$ l de medio RPMI + 5  $\mu$ l de azul de Evans) en cámara de Neubauer. La cantidad de células fue ajustada de modo que se pusieron 40,000 células en 100  $\mu$ L de medio RPMI suplementado por pozo en placas de cultivo de 96 pozos (costar). Se colocaron las placas en incubación en condiciones de CO<sub>2</sub> al 5% y a 37° C de temperatura durante 72 horas.

**Estímulo de linfocitos:** Para cada grupo de ratones (Control, IB-367, TA y PZQ) se prepararon los siguientes estímulos y a cada pozo de cada grupo se le estimuló de la forma siguiente:

- Concanavalina A (25  $\mu$ g)
- Extracto crudo de larva de *Taenia crassiceps* (10 y 5  $\mu$ g)
- PBS estéril (25  $\mu$ l)

Estos estímulos se agregaron a las 24 horas de cultivo incubándose a 37° C y CO<sub>2</sub> (5%) durante 48 horas, después de las cuales se centrifugó la placa a 1,300 rpm por 10 minutos y se guardó en congelación para posterior uso del sobrenadante. Se colectó el sobrenadante celular para la determinación de interleucinas por la técnica de ELISA.

#### **Determinación de proliferación de linfocitos con MTT (3-(4,5- dimetiltiazol-2-il)-2,5-bromuro difeniltetrazolio)**

Para esta determinación se ponen 20,000 células de bazo por pozo en placas de cultivo de 96 pozos en 100  $\mu$ l de medio RPMI suplementado. Se dejaron en cultivo en incubación a 37° C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 horas. Pasado este tiempo se agregaron las cantidades de péptido (IB-367 y TA): 2, 20 y 200  $\mu$ g por pozo usando como control positivo Concanavalina A y Fitohemaglutinina (10  $\mu$ g por pozo). A las 24 horas se

agregó 20  $\mu\text{l}$  de MTT por pozo y se dejó incubando 2 horas después de las cuales se agregó 100  $\mu\text{l}$  de DMSO (Dimetil sulfóxido) por pozo y se centrifugó la placa a 1,300 rpm (Labofuge 400, Heraeus Instruments) por 5 minutos. La lectura se tomó en un espectrofotómetro (Microplate autoreader EL311SX, Bio-tek Instruments) a 570 nm.

### **Preparación de extracto crudo**

Aproximadamente 10 g de cisticercos de *Taenia crassiceps* fueron homogeneizados en un Ultraturrax T-8, con una solución de extracción con inhibidores de proteasas [Tosil-L-lisina clorometil cetona (TLCK) 10mM. Ácido etilendiaminotetracético (EDTA) 0.5M, Fenil metil sulfonil fluoruro (PMSF) 200mM]. La homogeneización se realizó mediante 3 pulsos de 30 seg cada uno, con 1 min de incubación en hielo entre cada uno. El homogenado se centrifugó a 25,000 rpm por 30 min (Avanti<sup>TM</sup> 30 centrifuge, Beckman) y se colectó el sobrenadante, el cual se dializó en 4L de una solución PBS, pH 7.4 durante toda la noche. Al término de la diálisis, el sobrenadante se centrifuga a 25,000 rpm por 15 min en la misma centrifuga. Al sobrenadante obtenido se determina la concentración de proteína por el método de Bradford, se divide en alícuotas y se almacena a  $-20^{\circ}\text{C}$ , hasta su uso. La composición de los extractos se determinó por geles de poliacrilamida con SDS en condiciones reductoras.

### **Determinación de interleucinas por el método de ELISA sándwich.**

Se realizó la medición de interleucinas en sobrenadante de linfocitos 48 horas después de la estimulación.

**Sensibilización de la placa:** se acoplaron a las cajas anticuerpo anti-interleucina 2, 4, 10 y anticuerpo anti  $\text{INF}\gamma$  a una concentración de 0.5  $\mu\text{g}/100\ \mu\text{L}$  por pozo diluyendo en amortiguador de carbonatos 0.1M, pH= 9.6 en una placa para ELISA de 96 pozos. Esta placa se selló con tapas de plástico y se incubó 2 horas a  $37^{\circ}\text{C}$  y toda la noche a  $4^{\circ}\text{C}$ .

**Muestras:** Al día siguiente se lavó la placa con la solución de lavado y se secó, se bloqueó con 100  $\mu\text{L}$  de BSA al 1% en solución de lavado durante 30 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$ ,

después de este tiempo se lavó y se secó. Se añadieron 100  $\mu$ L por pozo de los sobrenadantes obtenidos del cultivo celular. Se incubó durante 2 horas a 37° C y después se incubaron a 4°C, toda la noche. Al día siguiente se lavó la placa con solución de lavado y se secó, después se agregó 100  $\mu$ L del segundo anticuerpo anti-IL 2, 4,10 y anti-IFN $\gamma$  en una dilución 1:2000 en solución de lavado. Se dejó incubar 2 horas a 37° C y luego toda la noche a 4° C.

**Revelado:** Se lavó la placa y se secó. Se agregó 100  $\mu$ L del anticuerpo anti-IL de rata peroxidado a una dilución 1:2000 en solución de lavado. Se incubó 1 hora a 37° C, se lavó y se secó. En cada pozo se agregaron 100  $\mu$ L de ortofenilendiamina + solución sustrato+ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (al 15%) preparada en el momento. Se dejó desarrollar la reacción durante 10 minutos para luego pararla con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.1 M. La lectura se realizó en un equipo Multiskan Ascent a 492 nm.

### **Determinación de Inmunoglobulinas en suero**

Se sensibilizó la placa de ELISA con antígeno de *Taenia crassiceps* 2.0  $\mu$ g /pozo diluido en amortiguador de carbonatos 0.1M pH 9.6. Se dejó incubar 2 horas a 37° C y toda la noche a 4° C. Se lavó la placa con solución de lavado y se secó para después agregar solución bloqueadora. Se bloqueó incubando 30 minutos a 37° C. Se lavó la placa y se secó. Se agregaron las muestras de suero a una dilución 1:100 en solución de lavado y se dejó incubando durante 2 horas a 37° C. Se lavó y se secó para agregar 100  $\mu$ L/pozo del anticuerpo correspondiente (IgG1, IgG2a, IgGtotal, IgE e IgM) a una dilución 1:2000 en solución de lavado, se incubó durante 1 hora a 37° C. Se lavó la placa una vez concluido el tiempo de incubación y se secó. Al momento se preparó la solución de revelado y se dejó transcurrir la reacción durante 10 minutos. Se agregaron 50  $\mu$ L por pozo de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.1M. La lectura se realizó en un equipo Multiskan Ascent a 492 nm.



### **Determinación de carga parasitaria**

Todos los ratones de cada grupo fueron sacrificados por dislocación cervical (previa sedación) a las 8 semanas de infección. La cavidad peritoneal se lavó con PBS para extraer todos los metacestodos contenidos en ella. Los cisticercos se pusieron en un tubo Falcon para su posterior conteo.

### **Cultivo de cisticercos**

Se sacrificó un ratón hembra Balb/c de 5 meses de infección (previa sedación) y se extrajeron las larvas con PBS estéril. Estas larvas se lavaron con PBS estéril una vez y después una segunda con medio RPMI. Se separaron los parásitos en cajas Petri de plástico y se pusieron en medio RPMI dejándolos incubar media hora. Se observaron los cisticercos y se escogieron los que no presentaban escólex evaginados o daño y conservaban su forma ovalada y vesícula translúcida. En una placa de cultivo de 48 pozos se pusieron 10 de estos cisticercos en 500  $\mu$ l de RPMI.

En un pozo a parte se verificó el porcentaje de evaginación agregando bilis de cerdo al 25 % en RPMI y dejando incubar 2 horas a 37C y 5% de CO<sub>2</sub>. La evaginación de los cisticercos se determinó por la salida completa del escólex. A cada pozo se agregaron los siguientes péptidos antimicrobianos: Citropin 1.1, PALM, LFH, Histatin 5. Todos en cantidades de 1, 10, 50, 100 y 200  $\mu$ g por pozo. Se dejó incubando durante 24 horas en incubadora a 37° C y 5% de CO<sub>2</sub>. Pasado este tiempo se observaron los cisticercos en microscopio invertido (Nikon TMS-F), determinando su viabilidad con los parámetros de la movilidad y daño a la pared vesicular y evaginación del escólex. Para esto último, se agregó bilis de cerdo al 25% en RPMI a los cisticercos, se dejó incubando 2 horas en las condiciones ya mencionadas y se contó el número de cisticercos evaginados para cada pozo. La movilidad fue determinada mediante la observación del movimiento característico del parásito y se clasificó en alta, media, baja o nula, del mismo modo la integridad de la morfología fue establecida por pérdida del fluido vesicular y daño en la pared vesicular y se clasificó también como completa, media o nula.

## VI. Resultados

El primer experimento se realizó para conocer el efecto que los péptidos IB-367 y TA presentan sobre la proliferación linfocitos de bazo tanto de ratones no infectados (sanos) y ratones infectados con el parásito *Taenia crassiceps*.

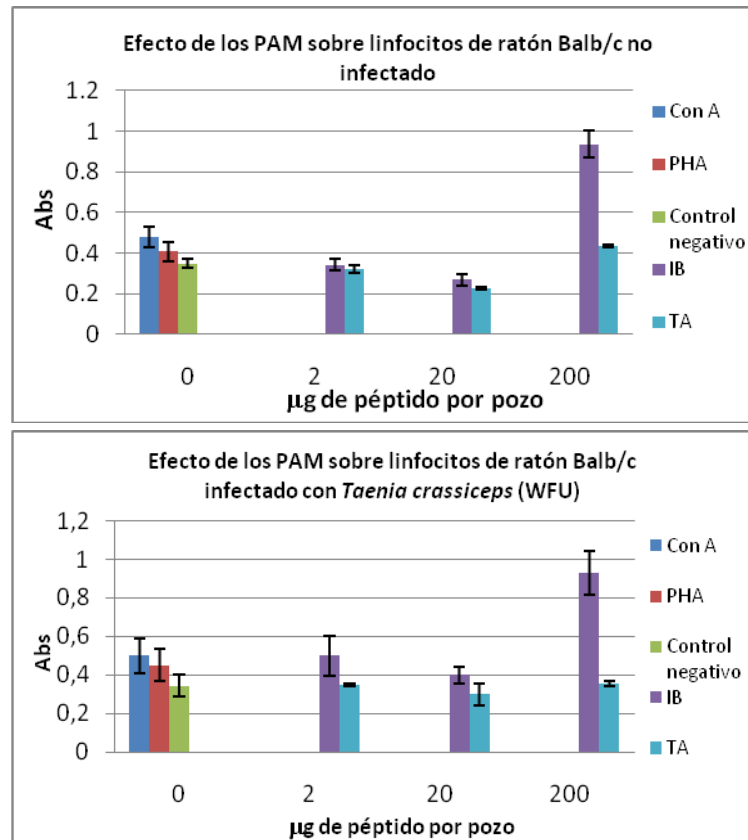


Fig. 9 En la figura se muestra la proliferación *in vitro* de linfocitos extraídos de bazo tanto de ratones sanos como de ratones infectados con *Taenia crassiceps*. El grupo control negativo consta de linfocitos a los que no se les agregó estímulo y los controles positivos fueron estimulados a proliferar con Concanavalina A (Con A) y Fitohemaglutinina (PHA). La Con A, PHA y los péptidos se agregaron a las 24 horas de cultivo y se dejaron incubando otras 24 horas. La proliferación se cuantificó mediante el ensayo colorimétrico con MTT descrito por Mosmann T., 1983. Las barras muestran la DS para cuatro determinaciones por grupo.

En este caso los péptidos no tuvieron efectos adversos sobre los linfocitos de los ratones, en ninguna de las cantidades empleadas, mostrando una estimulación de la proliferación muy parecida a la provocada con los mitógenos Concanavalina A (Con A) y la Fitohemaglutinina (PHA) tanto para el péptido TA como para el IB-367 en las concentraciones de 2 y 20 µg, con excepción de la cantidad más alta (200 µg) de éste

último péptido, en la que se observa un aumento de mas de 2 veces la proliferación en linfocitos obtenidos, tanto en los ratones sanos como en los ratones infectados.

Una vez descartada la posible toxicidad de los péptidos hacia las células inmunes del hospedero, se procedió a realizar los ensayos de tratamiento con los péptidos en los grupos de ratones infectados con larvas de *T. crassiceps*, se midieron los niveles de interleucinas producidas por los linfocitos en respuesta a los antígenos del parásito (ECL) *in vitro*. Los linfocitos fueron obtenidos de ratones con diferentes tiempos de infección:

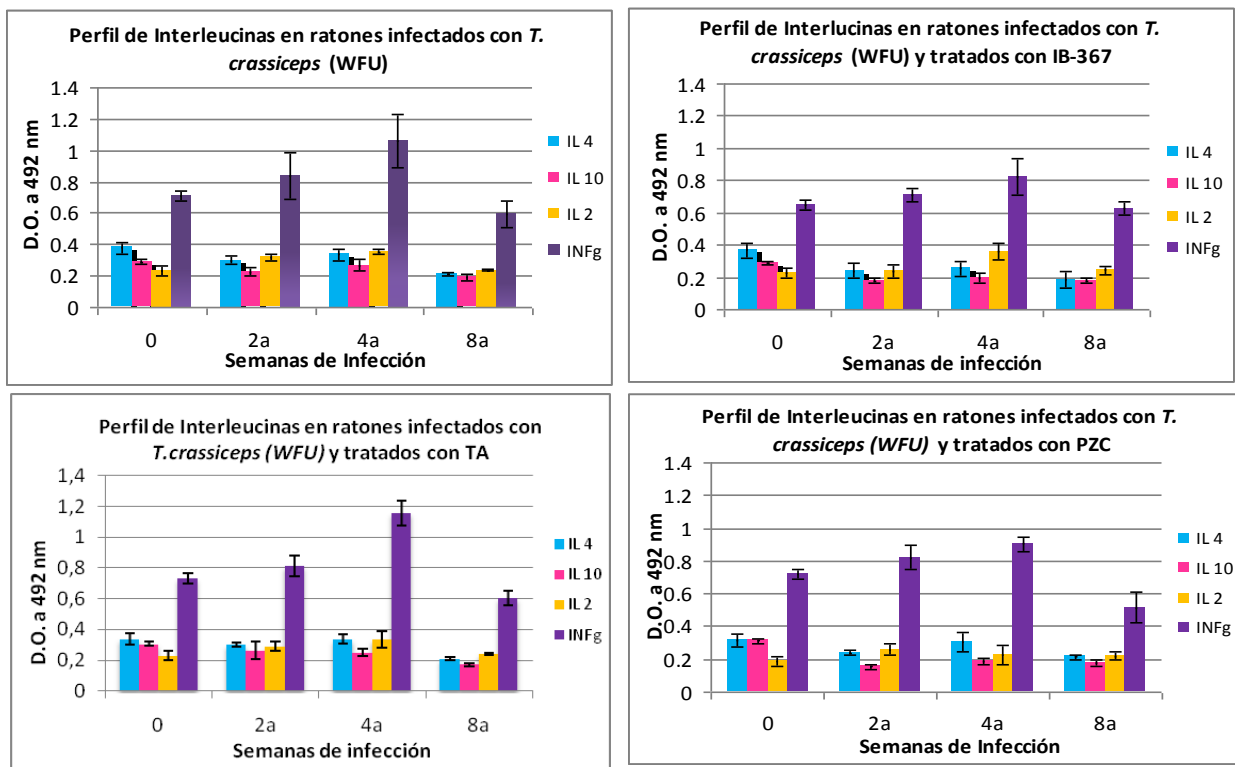


Fig. 10 Gráfica de barras en la que se muestra la tendencia de las interleucinas del perfil Th1 (IL-2 e INF $\gamma$ ) y del perfil Th2 (IL-4 e IL-10) a través del tiempo de infección para los cuatro grupos tratados con PBS, IB-367, TA y PZC, los que se administraron al final de la segunda semana de infección. Las interleucinas se midieron en los sobrenadantes de cultivo de linfocitos por ELISA. Las barras de error muestran la desviación estándar de cuatro mediciones.

En la figura 10 se puede observar que el  $IFN\gamma$  (marcador de Th1) en los grupos de ratones infectados tratados con PBS, IB-367, TA y PZQ presenta una medida de  $DO_{492nm}=0.7$  al tiempo cero que aumentan hasta la cuarta semana de infección donde alcanzan un máximo de alrededor de una  $DO_{492nm}= 0.8$ , para después disminuir hasta un nivel de entre el 0.5 a 0.6 de D.O. en la octava semana. En contraste para el grupo de ratones tratados con IB-367 y PZC en el tiempo de cuatro semanas se mantienen cercanos a una  $DO_{492nm} =0.8$  para el  $IFN\gamma$  con respecto a los ratones tratados con TA y PBS para luego decaer a una  $DO_{492nm} =0.6$  unidades. Por otro lado, tanto la IL-2 (Th1) como las interleucinas del perfil Th2 conservan una tendencia constante y sin notarse una predominancia significativa para ninguna de las medidas realizadas en este estudio. Cabe mencionar que cuando los linfocitos fueron estimulados con ECL a 5 y 10  $\mu g$  y con el mitógeno Con A, no se encontraron diferencias en la producción de ILs.

Por otro lado, de las muestras de sangre obtenidas de todos los grupos de ratones, se separó el suero y en éste se midieron los niveles de isotipos de IgG anti-cisticercos específicos contra el parásito. La IgG1 como representativa del perfil Th2 y la IgG2a como representativa del perfil Th1.

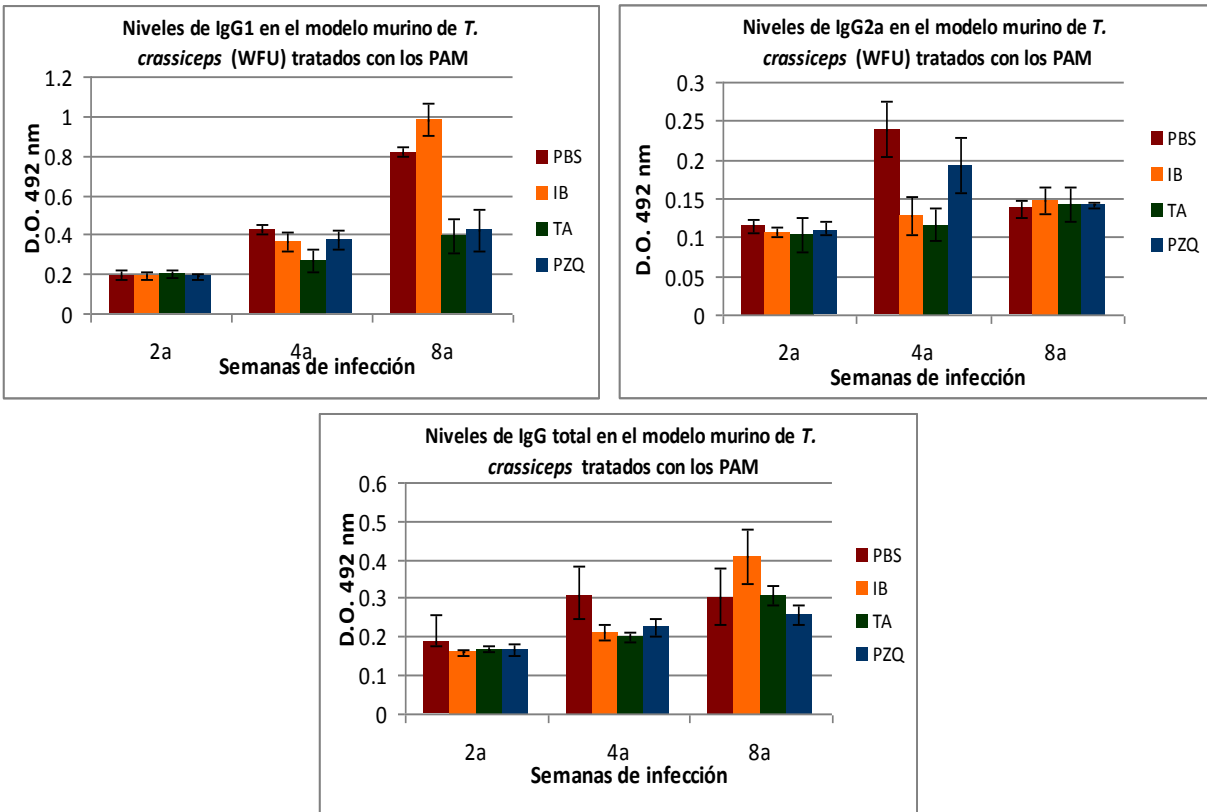


Fig. 11 Niveles de Inmunoglobulinas G anti-cisticercos (IgG1, IgG2a e IgGs totales) en suero de todos los ratones Balb/c de los cuatro grupos a diferentes semanas de infección. Las barras muestran la DS de cuatro determinaciones por grupo.

Los niveles de IgG1, representativa de la respuesta tipo Th2, en los ratones infectados y tratados con PBS, TA, IB-367 y PZC presentan 0.2 unidades de D.O. a las 2 semanas de infección aumentando este nivel en todos los grupos al doble hacia cuarta semana de infección. Para la octava semana de infección la IgG1 se triplica y cuadruplica para los ratones tratados con PBS e IB-367, respectivamente. En contraste, esta IgG1 se mantienen como los de la cuarta semana en los ratones tratados con TA y PZC (Fig. 11, primera grafica).

La IgG2a (marcador de Th1) empieza con un nivel basal de 0.1 unidades de DO a la segunda semana de infección, que aumenta en la cuarta semana solo en los grupos tratados con PBS (dos y media veces) y en PZC (se duplica) manteniéndose constante para los grupos tratados con TA e IB-367. Para la octava semana los niveles de IgG2a en todos los grupos disminuyen al nivel que presentaban en la segunda semana de infección (Fig. 11, segunda gráfica).

Para el caso de la determinación de la IgG total en los grupos infectados y tratados con PBS, PAMs y PZC desde la segunda semana muestran un ligero aumento que a través del tiempo se duplica y triplica en la cuarta y octava semana, respectivamente (Fig. 11, tercera grafica).

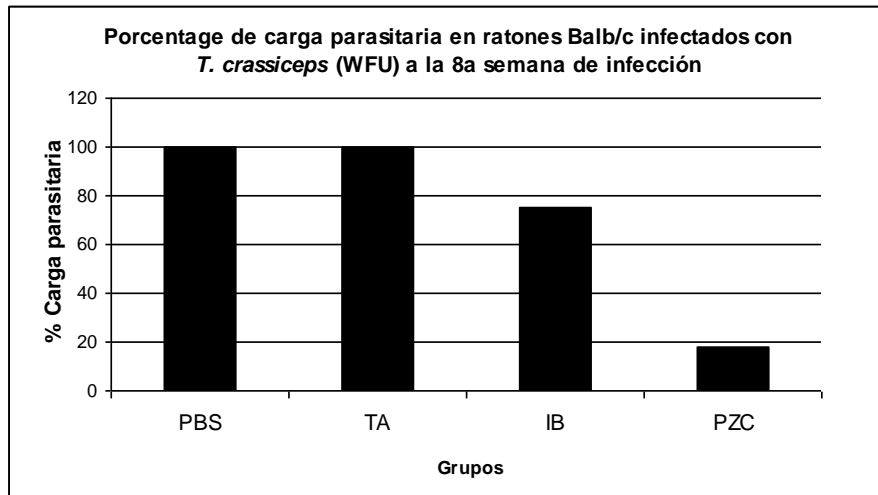


Fig. 12 Porcentaje de carga parasitaria determinada a la octava semana (sacrificio) en ratones infectados con *T. crassiceps* (WFU) de los diferentes grupos tratados: PBS, Péptidos Antimicrobianos (TA e IB-367) y con prazicuantel (PZC).

A la octava semana de infección se sacrificaron los ratones de los cuatro grupos. En la figura 12, se observa la disminución de la carga parasitaria tanto para el grupo tratado con prazicuantel que muestra una disminución del 72% como para el grupo de IB-367 que muestra una reducción del 25%. El grupo tratado con TA no presenta disminución en el número de cisticercos con respecto al grupo tratado con PBS (control).

Debido a que en el laboratorio se disponía de otros PAM, se decidió probar su efecto *in vitro* sobre cisticercos de *T. crassiceps* (WFU). El efecto sobre la viabilidad del parásito

se determinó a través de la capacidad de evaginación, la movilidad y el daño a la pared tegumental observado por microscopía óptica.

Tabla 1. Determinación del efecto que diferentes Péptidos Antimicrobianos presentan sobre los cisticercos de *T. crassiceps* en un cultivo de 24 hrs.

		0 µg	1µg	10 µg	50 µg	100µg	200 µg
<b>Citropin 1.1</b>	Evaginación	9/10	8/10	10/10	9/10	9/10	6/10
	Daño	-	-	-	-	-	-
	Motilidad	+++	+++	+++	+++	++	++
	Observación	-	-	-	-	-	-
<b>Palm-KKNH<sub>2</sub></b>	Evaginación	9/10	9/10	10/10	10/10	1/10	3/10
	Daño	-	-	-	-	+++	+++
	Motilidad	+++	+++	++	++	-	-
	Observación	-	-	-	-	Encogimiento	Encogimiento
<b>LFH</b>	Evaginación	10/10	10/10	8/10	8/10	4/10	7/10
	Daño	-	-	-	-	+	-
	Motilidad	+++	+++	+++	+++	++	+++
	Observación	-	-	-	-	-	-
<b>Histatin 5</b>	Evaginación	10/10	10/10	10/10	10/10	4/10	3/10
	Daño	-	-	-	-	-	-
	Motilidad	+++	+++	+++	+++	+++	++
	Observación	-	-	-	-	-	-

**Evaginación** : Número de cisticercos evaginados / número total de cisticercos.

**Movilidad**: +++++ Alta +++ Media ++ Moderada +Baja – Nula.

**Daño**: +++++ Alta +++ Media ++ Moderada +Baja – Nula.

El péptido Palm-KKNH<sub>2</sub> a la dosis de 100 µg causó un mayor daño en los cisticercos, de modo que la vesícula perdió líquido observándose un encogimiento del parásito, asimismo la movilidad y la evaginación se vieron disminuidas con respecto al control sin tratamiento, el daño a la superficie tegumentaria se mantuvo en la dosis de 200 µg. El péptido Histatin también presentó una disminución en la evaginación pero no se observó ningún daño en la pared visto al microscopio óptico con las dosis de 100 y 200 µg, asimismo se observó una disminución en la movilidad sobre todo en la concentración más alta.

Lactoferrina H presenta disminución en la evaginación en las cantidades más altas aunque en 100 µg ésta disminución es mayor, asimismo la movilidad y el daño en la pared es muy ligero sólo en la dosis de 100 µg. El péptido Citropin 1.1 muestra que sólo en la concentración más alta, disminuye la evaginación y la movilidad pero no muestra daño observable sobre la pared.

## VII. Discusión

*Taenia crassiceps* es un parásito que provoca un cambio en la polarización de la respuesta inmune de tipo Th1 a un perfil Th2, lo que favorece el desarrollo del parásito y provoca una infección crónica. En esta el parásito comienza a reproducirse sin control, escapando del sistema inmune del hospedero provocando así las grandes cargas parasitarias encontradas en los ratones Balb/c (del orden de los 2000 cisticercos por ratón a los seis meses de infección). Sin embargo, se ha notado que al inicio de la infección (primera y segunda semana) en el modelo murino por *T. crassiceps* (ORF) la respuesta inmune de Tipo Th1, es restrictiva para el parásito manteniendo baja la carga parasitaria.

Por otro lado, los péptidos antimicrobianos Temporina A e Iseganan IB- 367 ya han sido probados en este modelo y han mostrado tener la capacidad de abatir la carga parasitaria *in vivo* administrados al mes de infección, así como causar daño al cisticercos *in vitro*. Otra cualidad de estos péptidos es la de ser moduladores del sistema inmune, aunque esto no se ha estudiado en este modelo. Por estas razones decidimos probar si TA e IB-367 tenían un efecto modulador sobre el sistema inmune del ratón ayudando a abatir la carga parasitaria si se administran en las primeras semanas de infección cuando la respuesta es de tipo Th1 en este modelo de cisticercosis murina.

Lo primero que se hizo fue evaluar si estos péptidos a diferentes concentraciones tenían algún efecto en los linfocitos del ratón sano o de ratón infectado, encontrándose que en la concentración de 200  $\mu$ g el péptido IB-367 es capaz de inducir proliferación *in vitro* de linfocitos extraídos de bazo, posiblemente debido a que este péptido es un análogo de protegrina 1 de mamíferos, péptido que presenta un efecto mitogénico en fibroblastos (Hancoch R. y Diamond G., 2000, Martin E. et al, 1995, Rivas-Santiago B. et al, 2005), efecto que no se observa con el péptido TA que es obtenido de piel de rana. Es posible que este péptido al aumentar la proliferación linfocitaria tenga un efecto sobre la inmunidad y dado que en esta infección la presencia de linfocitos Th1 o Th2 provocan ya sea, el combate a la infección o el establecimiento de la cronicidad, sería importante saber exactamente qué tipo de linfocitos son los que están proliferando. Este efecto mitogénico podría ser benéfico si el fenotipo proliferado fuese el de tipo Th1 ayudando al hospedero a combatir la infección.



El perfil de interleucinas en el modelo murino por *Taenia crassiceps*, ya se ha reportado con anterioridad (Terrazas et al., 1998) para la cepa ORF. En este proyecto se trabajó con el mismo parásito pero con la cepa WFU que es de lento crecimiento en los ratones, en la cual se nota que el comportamiento de dichas interleucinas difiere de lo reportado. Las IL-2, 4 y 10 permanecen constantes a lo largo de 8 semanas de infección, hecho que contrasta con lo reportado para el modelo por cepa ORF en el cual la IL-10 comienza a aumentar a la segunda semana post- infección, mientras que la IL-4 aumenta a partir de la cuarta y las IL de perfil Th1: IL-2 e  $INF\gamma$  predominan al inicio de la infección para disminuir conforme se establece la cronicidad. El  $INF\gamma$  tampoco guarda relación con lo reportado ya que aumenta a la cuarta semana de infección (segunda de tratamiento) y disminuye en la octava mostrando la misma tendencia tanto en el grupo control como en los grupos tratados. Estas diferencias entre ambos modelos pueden deberse a que la cepa ORF es de crecimiento rápido y muestra altas cargas parasitarias a las primeras semanas de infección del orden de miles de cisticercos en 3 semanas, mientras que para la cepa WFU en ese tiempo se recuperan menos de mil larvas generándose una respuesta inmune con el perfil Th1 retrasado, respecto a lo observado para cepa ORF. Por otro lado, las tendencias en los perfiles de ILs medidos para los grupos tratados con PAM no muestran diferencias con respecto al grupo de ratones infectados y tratados con PBS observándose el aumento de  $IFN\gamma$  a la cuarta semana de infección (segunda de tratamiento) en todos los grupos para después disminuir en la octava semana. En el grupo IB-367 el nivel máximo alcanzado de  $IFN\gamma$  no llega al nivel observado en el grupo control (PBS) aunque tiene la misma tendencia; esto podría deberse a la acción del péptido sobre la producción de esta ILs por los linfocitos Th1, aunque también es posible que este grupo de ratones no haya respondido ante la infección igual que el grupo control ya que en la segunda semana de infección antes de la administración del péptido la D.O. para esta IL está por debajo del nivel obtenido en los demás grupos. Lo anterior sugiere que dichos péptidos administrados en las condiciones establecidas en este proyecto no modifican la respuesta inmune de modo que se observe un cambio en algunas de las interleucinas que pudieran evidenciar la presencia de la respuesta del tipo Th1 o de tipo Th2, ya que

la tendencia en los perfiles de ILs es el mismo en los cuatro grupos. Los linfocitos fueron estimulados con ECL de *T. crassiceps* y Con A sin que se notaran diferencias frente a los linfocitos no estimulados, esto es debido a que el parásito provoca anergia (Villa y Kuhn, 1996) en estas poblaciones celulares como parte de su mecanismo de evasión de la respuesta inmune.

Los experimentos con IB-367 deben ampliarse para poder determinar exactamente qué función está desempeñando este péptido sobre el sistema inmune del ratón. Dado que el perfil de ILs en este modelo de infección mantiene el perfil Th1 hasta la cuarta semana de infección sería importante evaluar si el perfil de ILs sólo difiere en esta etapa de la infección o si cambia completamente respecto a lo reportado para cepa ORF.

Respecto a las inmunoglobulinas anti-cisticerco, los niveles aumentados de IgG1 en la octava semana coinciden con lo ya reportado, dado que la respuesta humoral genera este isotipo que es promovido por la respuesta tipo Th2 conforme avanza la infección y la carga parasitaria aumenta (Terrazas et al, 1998). Los niveles de IgG2a incrementados en el grupo control indican que posiblemente hasta la cuarta semana de infección la respuesta es del tipo Th1 y que, concuerda con los niveles aumentados de IFN $\gamma$  también en cuarta semana. Sin embargo en los grupos tratados con PAM no se observa este aumento y en el grupo tratado con PZC este aumento es muy ligero. Esto nos sugiere que los péptidos podrían estar influyendo sobre la producción de esta Ig de modo que se mantenga constante a lo largo de las 8 semanas de infección aunque este efecto no concuerda con el perfil de ILs observado para este grupo. La IgG anti-cisticerco total presenta la tendencia esperada de incremento al mismo tiempo que la infección, lo que concuerda con experimentos reportados donde se ha observado que la cantidad de IgG está en proporción directa con la proliferación de los cisticercos en infecciones experimentales (Hewitson J. et al, 2009).

Los perfiles de Ig obtenidos en este proyecto indican que el modelo murino por *T. crassiceps* cepa WFU se comporta de una forma muy parecida a lo ya reportado en estas parasitosis y que los péptidos TA e IB-367 pueden tener un efecto en la

producción de anticuerpos específicos del tipo IgG2a, aunque más estudios deben realizarse para comprobar esto.

El grupo de ratones tratado con IB-367 arrojó un porcentaje de reducción de carga parasitaria del 20% lo que nos indica que el péptido puede tener solamente un efecto destructor directo sobre el parásito, como el que ya se ha observado en otros trabajos, debido a sus características del mismo, y que es capaz de causar daño en el cisticerco provocando la muerte de algunos de los parásitos en la cavidad peritoneal. A este respecto cabe mencionar que la Temporina A administrada en la segunda semana de infección no presentó reducción de la carga parasitaria, contrastando con lo ya reportado, donde es más efectiva *in vivo* cuando es administrada al mes de infección (Landa A. et al, 2009). Esta diferencia puede deberse a que en este trabajo el tratamiento se dio a la segunda semana de infección mientras que en el caso reportado en el que fueron efectivos ambos péptidos el tratamiento se dio al mes, sugiriendo que en esta etapa muy temprana el péptido no es capaz de dañar a los cisticercos de un modo que repercuta en la carga parasitaria. Para el grupo administrado con Prazicuantel también se obtuvo una reducción en el número de cisticercos del 70% que era lo esperado, debido a que ya se sabe la efectividad de este fármaco e incluso se obtuvo este efecto terapéutico con una sola dosis por vía oral. Lo que se deseaba observar en este grupo era si este fármaco tiene algún efecto sobre el sistema inmune. El resultado obtenido indica que hasta la octava semana de infección si bien hay disminución en la carga parasitaria, no hay cambio en la tendencia del perfil de interleucinas ni anticuerpos.

Por otro lado, de los péptidos con los que se trabajó *in vitro*, diferentes a IB-367 y TA, se observa que el Palm-KKNH<sub>2</sub> es el péptido que ocasiona más daño visible en el cisticerco y en su capacidad para evaginar, esto puede deberse a que el péptido posee características lipídicas y catiónicas que le permiten interaccionar con el tegumento del cisticerco y el escólex causándoles daño. Histatin 5 es un péptido catiónico rico en histidina de estructura  $\alpha$  hélice, que se encuentra en la saliva de los humanos con propiedades fungicidas y antibacterianas que es capaz de actuar sobre la membrana de bacterias y, en el caso de *Candida albicans* ha mostrado que también puede afectar el

potencial transmembrana de las mitocondrias (Helmerhorst E. et al. 1997, 1999). En este trabajo dicho péptido no afectó al tegumento de forma visible, pero si tuvo un efecto sobre la movilidad y sobre la evaginación sugiriendo que pueda actuar sobre el sistema muscular o en las mitocondrias del parásito.

En este trabajó se estableció el modelo murino por *Taenia crassiceps* cepa WFU y se determinó el perfil de ILs hasta la octava semana post-infección tanto para ratones infectados y tratados con PBS como para ratones infectados y tratados con los PAMs (TA e IB-367) y con prazicuantel. En este modelo la respuesta inmune parece estar retrasada con respecto al modelo por cepa ORF que mantiene el perfil Th1 hasta la cuarta semana de infección. Respecto a los péptidos y el PZC administrados a la segunda semana de infección, parecen no influir en que la respuesta inmune celular del ratón para abatir totalmente la carga parasitaria. Se sabe que algunos PAMs son moduladores de la respuesta inmune adaptativa, lo que los hace interesantes para utilizarlos como agentes terapéuticos en contra de enfermedades parasitarias y el cáncer.

## VIII. Conclusiones.

- Se estableció el modelo murino de cisticercosis por *Taenia crassiceps* (WFU).
- El péptido IB-367 tiene efecto proliferativo sobre linfocitos de ratón Balb/c.
- Iseganan IB-367 y Temporina A no tienen efecto sobre la respuesta inmune de ratones infectados con *T. crassiceps* (WFU).
- El péptido IB-367 tiene efecto directo sobre el parásito ya que disminuye en un 20 % la carga parasitaria.
- El Prazicuantel no tiene efecto sobre la respuesta inmune de ratón Balb/c, pero ayuda a esta a destruir al parásito, ya que reduce un 70% la carga parasitaria.
- El péptido Palm-KKNH<sub>2</sub> daña al cisticerco y disminuye su evaginación, mientras que el péptido Histatin 5 disminuye la movilidad y la evaginación por lo que son candidatos para realizar más ensayos.

## IX. Referencias.

- Chen J, Falla TJ, Liu H, Hurst MA, Fujii CA, Mosca DA, Embree JR, Loury DJ, Radel PA, Cheng Chang C, *et al.* (2000) Development of protegrins for the treatment and prevention of oral mucositis: structure-activity relationships of synthetic protegrin analogues. *Biopolymers*, 55: 889
- Cherning J. (1997) Common host antigens in laboratory rats infected with the metacestodes of *Taenia crassiceps*. *J. Helminthol.* 51: 215-220.
- Espinoza B., Ruiz-Palacios G., Tovar A., Sandoval A., Plancarte A., Flisser A. (1986) Characterization by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay of the Humoral Response in Patients with Neurocysticercosis and its application in Immunodiagnosis. *J. of Clinical Microbiology*,24:4; 536-541.
- Farnaud S. y Evans R. (2003) Lactoferrin—a multifunctional protein with antimicrobial properties. *Molecular Immunology*, 40: 395–405.
- Fetterer, R.H., Pax, R.A., Bennett, J.L., (1980). Praziquantel, potassium and 2,4-dinitrophenol: analysis of their action on the musculature of *Schistosoma mansoni*. *Eur. J. Pharmacol.* 64, 31-38.
- Flisser A, Vargas-Parada L y Laclette J., (2006) *Taenia solium*: un parásito cosmopolita Investigación y ciencia, Mayo, 24-33.
- García H.H., Gilman R.M., Tovar M., Flores E., Jo R., (1995) Factors associated with *T. solium* cysticercosis: analysis of 946 Peruvian neurological patients. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 52, 145-14
- García H., Martínez M., Gilman R., Herrera G., Tsang V., Pilcher J., Daz F., Verástegui M., Gallo C., Porrás M., Alvarado M. y Miranda E. (1991) Diagnosis of cysticercosis in endemic regions. *The lancet*, 338: 549-551.
- Giacometti A., Cirioni O., Wojciech K., DAmato, Silvestri C, Del Prete M., Licci A., Lukasiak J. y Scalise G. (2005) In vitro activity and killing effect of temporin A on nosocomial isolates of *Enterococcus faecalis* and interactions with clinically used antibiotics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 55, 272-274.
- Gordon, Y. Jerold, Romanowski, Eric G. and McDermott, Alison M. (2005) A Review of Antimicrobial Peptides and Their Therapeutic Potential as Anti-Infective Drugs', *Current Eye Research*, 30: 7, 505-515.
- Hancock R. (1999) Host Defence (Cationic) Peptides: What is their future clinical potencial?. *Drugs*, 57: 469-473.
- Hancock R., Diamond G. (2000). The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. *Trends in microbiology*, 8: 9, 402-410.

Harnett, W., Kusel, J.R., 1986. Increased exposure of parasite antigens at the surface of adult male *Schistosoma mansoni* exposed to praziquantel in vitro. *Parasitology*, 93: 401-405.

Helmerhors E., Breeuwer P., van 't Hof W., Walgreen-Weterings E., Oomeni L., Veerman E., Nieuw Amerongen A., Abee T. (1999) The Cellular Target of Histatin 5 on *Candida albicans* Is the Energized Mitochondrion. *J. of Biol. Chem.* 274:11; 7286-7291.

Helmerhors E., van 't Hof W., Veerman E., Simoons-Smit I. and Nieuw Amerongen A. (1997) Synthetic histatin analogues with broad-spectrum antimicrobial activity. *Biochem J.* 326, 39-45

Hewitson J, Grainger J., Maizels R.(2009) Helminth immunoregulation: The role of parasite secreted proteins in modulating host immunity. *Molecular and Biochemical Parasitology*,167: 1-11.

Kollef M., Pittet D, Snchez Garca M, Chastre J, Fagon Y, Bonten M, Hyzy R, Fleming T, Fuchs H, Bellm L, Mercat A, Maez R, Martnez A, Eggimann P, Daguerre M, and Luyt C. (2005) A Randomized Double-Blind Trial of Iseganan in Prevention of Ventilator-associated Pneumonia. *American Journal of respiratory and critical care medicine*; 173: 91-97.

Lacey E. (1988) The role of the cytoskeletal, protein, tubulin in the mode of action and mechanism of drug resistance to benzimidazoles. *Int J Parasitol*; 18: 885-936.

Landa A, Jimnez L, Kaethe W, Jimnez-Garca L, Lara-Martnez R, Robert L, Cirioni O, Baranska-Rybak W, Wojciech K,(2009) Antimicrobial peptides (Temporin A and Iseganan IB-367): Effect on the cysticerci of *Taenia crassiceps*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 164,126-130.

Larralde C, De Aluja A. (2008) Cisticercosis: guía para profesionales de la salud. Ed. Biblioteca de la Salud. Fondo de cultura Económica; 19-41.

López J.A., García E., Cortes I.M., Sotelo J., Tato P., and Molinari J.L., (2004) Neurocysticercosis: relationship between the developmental stage of metacestode present and the titer of specific IgG in the cerebrospinal fluid. *Annals of Trop. Med. And Parasitol.* 98: 6, 569-57

Mangoni L., (2006) Temporins, anti-infective peptides with expanding properties. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 63, 1060-1069.

Mangoni L., Rinaldi A., Di Giulio A., Mignona G., Bozzi A., Barra D., Simmaco M. (2000) Structure-function relationships of temporins, small antimicrobians peptides from amphibian skin. *Eur. J. Biochem.* 267, 1447-1454.

Mangoni L., Saugar J., Dellisanti M., Barra D., Simmaco M., Rivas L. (2005) Temporins, Small Antimicrobial Peptides with Leishmaniacidal Activity. *The Journal of Biological Chemistry*, 280, 984-990.

Martin E., Ganz T., Leherer R. (1995) Defensinas and other endogenous peptide antibiotics of vertebrates. *Journal of Leukocyte Biology*. 58; 128-136.

Mascie G., Alam M, Montanari R, Karim R, Ahmed T, Karim E, Akhtar S. (1999) A study of the cost effectiveness of selective health interventions for the control of intestinal parasites in rural Bangladesh. *J Parasitol*; 85: 6-11

Mehlhorn, H., Becker, B., Andrews, P., Thomas, H., Frenkel, J.K., 1981. In vivo and in vitro experiments on the effects of praziquantel on *Schistosoma mansoni*. A light and electron microscopic study. *Arzneimittelforschung*, 31, 544-554.

Meza-Lucas A., Aguilar F. (2002) Taeniosis humana por *Taenia solium*. *Revista Mexicana de Parasitología Clínica*. 49: 2, 92-99.

Monney K. A., Spolski R.J., See E.J. y Kuhn R. E. (2000) Immune Destruction of Larval *Taenia crassiceps* in Mice. *Infection and immunity*, 68: 5, 2393-2401

Mosmann T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 16; 65(12):55-63.

Organización Panamericana de la Salud. Guía para el tratamiento de enfermedades infecciosas. Washington D.C.: OPS, 2004. pp. 170-179.

Panyutich A, Shi J, Boutz PL, Zhao C, Ganz T. (1997) Porcine polymorphonuclear leukocytes generate extracellular microbicidal activity by elastase-mediated activation of secreted propeptins. *Infect Immun.*; 65: 978-985.

Parra Unda Jesús Ricardo (2006). Universidad Nacional Autónoma de México. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas.

Pawlowski Z., Allan J., Sarti E. (2005) Control of *Taenia solium* taeniasis/cysticercosis: From research towards implementation. *International Journal of Parasitology*, 35: 1221-1232.

Prichard R (1973) The fumarate reductase reaction of *Haemonchus contortus* and the mode of action of some anthelmintics. *Int J Parasitol*; 3: 409-417.

Redman, C.A., Robertson, A., Fallon, P.G., Modha, J., Kusel, J.R., Doenhoff, M.J., Martin, R.J., 1996. Praziquantel: an urgent and exciting challenge. *Parasitol. Today* 12, 14-20.

Rivas-Santiago B., Sada E., Hernández-Pando R., Tsutsumi V. (2006) Péptidos antimicrobianos en la inmunidad innata de enfermedades infecciosas. *Salud Pública*; 48:62-71.



Sciutto E., Fragoso G., Daz M. L., Valds F., Lomet C., Govezensky T., Montoya R.M. and Larralde C. (1991) Murine *Taenia crassiceps* cysticercosis: H-2 and sex influence on susceptibility. *Parasitol. Research*, 77: 243-24

Simmaco M., Mignogna G. and Barra D. (1998) Antimicrobial peptides from amphibian skin: what do they tell us? *Biopolymers* 47: 435-450.

Sotelo J, Del Brutto O. Therapy of neurocysticercosis. *Childs Nerv Syst* (1987), 3: 208-211.

Sotelo J., Jung H. Pharmacokinetic optimisation of the treatment of neurocysticercosis. *Clin. Pharmacokinet.* 1998; 34: 503-515.

Terrazas I., Bojalil R., Govezensky T., Larralde C. (1998) Shift from an early protective TH1- type immune response to a late permissive TH2-type response in murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). *J. Parasitol*; 84:1, 74-81.

Terrazas I., Cruz M., Rodríguez-Sosa M., Bojalil R., García-Tamayo F., Larralde C. (1999) Th1-type cytokines improve resistance to murine cysticercosis caused by *Taenia crassiceps*. *Parasitol. Res* ; 85: 135-141.

Tsang V.C.W., Brand J.A., Bojer A.E. (1989) An enzyme- linked immunoelectrotransfer blot assay and glycoprotein antigen for diagnosing human cysticercosis (*Taenia solium*) *J. Infec. Dis.* 59, 50-59.

Vera Arias Laura. Junio 2010. Universidad Nacional Autónoma de México, Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas.

Wilson M., Bryan R., Fried J., Ware D., Schantz P., Pilcher J., y Tsang V. (1991) Clinical evaluation of the cysticercosis enzimed-linked immunoelectrotransfer blot in patients whith neurocysticercosis. *J. Infec Dis* 164: 1007-1009.

Páginas consultadas:

Vigilancia Epidemiológica Semana 41 2007:41;24. Consultado 16 de noviembre del 2009. <http://www.dgepi.salud.gob.mx/boletin/2007/sem42/pdf/edit4207.pdf>

[www.aafp.org/afp/2007/0701/afp20070701p91-f1.jpg](http://www.aafp.org/afp/2007/0701/afp20070701p91-f1.jpg). Consultado 7 de junio del 2010.