

Universidad Nacional Autónoma de México

Doctorado en Ciencias Biomédicas

Facultad de Medicina

**Evaluación de la calreticulina recombinante de *Taenia solium* como posible vacuna contra teniosis**

Tesis que para obtener el grado de

Doctora en Ciencias

Presenta

**Biól. Sonia Andrea León Cabrera**

Comité Tutorial

Dra. Ana Flisser    Dr. Juan Pedro Laclette    Dr. Alejandro Escobar

México, D. F. Noviembre de 2011



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.

## **AGRADECIMIENTOS**

**Al posgrado en Ciencias Biomédicas y a la Universidad Nacional Autónoma de México por todo el apoyo académico, económico y logístico brindado durante el programa de Doctorado.**

**Al CONACYT por la beca otorgada durante el desarrollo del doctorado.**

**A la DGAPA UNAM, por los proyectos PAPIIT IN217710 y IN220007 con los que se financió este trabajo.**

**A la Dra. Ana Flisser por abrirme las puertas a la ciencia en su laboratorio, por su guía, apoyo y asesoría durante mi proceso formativo.**

**Al Dr. Juan Pedro Laclette por sus valiosos comentarios y por transmitirme el amor y el interés por la ciencia.**

**Al Dr. Alejandro Escobar por su asesoría y sugerencias.**

**Al Dr. Julio Cesar Carrero por su ayuda y orientación durante la producción de la proteína recombinante.**

**A mis compañeras de laboratorio: a la Q.F.B Mayra Cruz, a la Dra. Guillermina Ávila y a la Dra. Fela Mendlovic por su apoyo, compañía y ayuda durante este proyecto y mi estancia en México.**

**A la Q.F.B. Mayra Cruz, M. en C. Mirza Romero y al Dr. Pablo Maravilla por su ayuda y apoyo durante la estandarización del PCR en tiempo real.**

**A la Sra. Isabel por su apoyo en el cuidado de los animales, por sus correctivos y por el cafecito matutino.**

**A la Dra. Ingeborg Becker, al Dr. Ignacio Terrazas, al Dr. Pablo Maravilla y al Dr. Daniel Martínez Fong por sus valiosos comentarios a esta tesis.**

## **AGRADECIMIENTOS**

**A mis padres María del Socorro y Miguel Hernando por su amor inagotable, ayuda y compañía. Luchadores incansables.**

**A mis hermanitos Gina y Leonardo por su cariño, alegría y apoyo.**

**A Galo por brindarme todo tu amor, por compartir tu vida conmigo y estar ahí siempre...**

**A mis amigos Oscar y Claudia por estos años de amistad, compañía y por ser parte de mi familia en México.**

**A mi amigo Joselín por brindarme su ayuda cuando llegué a México y hacerme sentir como en casa.**

## CONTENIDO

<b>1. RESUMEN</b>	6
<b>2. ABSTRACT</b>	7
<b>3. INTRODUCCIÓN</b>	<b>8</b>
3.1. Factores de riesgo asociados a la cisticercosis	9
3.2. Medidas de control	9
3.3. Vacunación en contra del parásito intestinal	11
3.4. Modelo experimental	12
3.5. Calreticulina	14
3.6. Respuesta inmune contra helmintos intestinales	16
<b>4. HIPÓTESIS</b>	18
<b>5. OBJETIVOS</b>	18
<b>6. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	
6.1. Modelo experimental para la teniosis intestinal	19
6.2. Producción de la TsCRT recombinante	19
6.3. Inmunización y reto	21
6.4. Necropsias	22
6.5. Evaluación de la respuesta inmune humoral	23
6.6. Evaluación de la respuesta inmune en la zona de anclaje del parásito	24
6.7. Extracción de RNA y PCR en tiempo real para el análisis de la expresión de las citocinas en el hámster	24
6.8. Ensayos de proliferación linfocitaria en las células del bazo y los nódulos linfáticos mesentéricos (NLM)	26
6.9. Análisis estadístico	27

<b>7. RESULTADOS</b>	
7.1. Modelo experimental para teniosis intestinal	28
7.2. Producción de TsCRT recombinante	32
7.3. Protección inducida por la inmunización oral con TsCRT	34
7.4. Evaluación de la respuesta inmune humoral	39
7.5. Evaluación de la respuesta inmune en la zona de anclaje del parásito	42
7.6. Análisis de los cambios en la expresión de las citocinas en el hámster	44
7.7. Proliferación linfocitaria en las células del bazo y los nódulos linfáticos mesentéricos (NLM) en respuesta a la inmunización	46
<b>8. Discusión</b>	47
<b>9. Conclusiones</b>	54
<b>10. Anexos</b>	56
<b>11. Referencias</b>	58

## 1. RESUMEN

La neurocisticercosis humana es causada por el estado larvario del cestodo *Taenia solium*. Estudios epidemiológicos han demostrado que el portador de la tenia adulta intestinal en el hogar o en el ambiente cercano es el principal factor de riesgo para adquirir cisticercosis. La vacunación es una alternativa para prevenir el establecimiento o el desarrollo del parásito adulto. Debido a que la infección ocurre por vía oral, es necesario inducir una efectiva y eficiente inmunidad intestinal. La calreticulina de *Taenia solium* (TsCRT) es una proteína multifuncional presente en las células subtegumentarias y musculares del cisticerco y la tenia, además, se expresa de manera diferencial durante la gametogénesis y la embriogénesis. El objetivo de este proyecto fue evaluar la protección inducida por la inmunización oral con TsCRT en el modelo de teniosis intestinal en el hámster dorado. Inicialmente se estandarizaron las condiciones óptimas del modelo experimental, en donde se evaluó la edad del hospedero y los porcentajes de infección que dependieron de la clase de cisticerco usado durante el reto. Posteriormente se obtuvo TsCRT en un sistema de expresión bacteriano y con esta proteína más toxina colérica (TC) como adyuvante, se inmunizaron hámsteres por vía oral en 4 ocasiones una vez por semana. Los grupos control fueron inmunizados con TC, bacterias sin transfectar o con el diluyente. Quince días después de la última inmunización los hámsteres se retaron por vía oral con 4 cisticercos. Durante la necropsia se determinó el porcentaje de infección, la longitud y la localización de los parásitos en el intestino. La inmunización oral con TsCRT indujo una reducción en el número de tenias del 33% hasta 44%, cuando el reto se realizó con cisticercos rojizos. Al retar con los cisticercos blanquecinos, la protección fue hasta del 100%. En los animales inmunizados las tenias encontradas fueron pequeñas y modificaron su zona de anclaje en el intestino. El análisis de la respuesta inmune mostró un incremento en la producción de anticuerpos IgA en la mucosa e IgG sistémico después de la segunda inmunización. Además, se observó aumento en la hiperplasia de células caliciformes y en la expresión de IL-4 e IFN- $\gamma$  en la zona de anclaje de los parásitos en el intestino de los animales inmunizados. En conclusión, la inmunización con TsCRT regula la producción local de citocinas estimulando la producción de IgA, que junto con la activación de las células caliciformes y la producción de mucinas, puede resultar en un ambiente poco favorable para los parásitos afectando su desarrollo y finalmente promoviendo la expulsión.

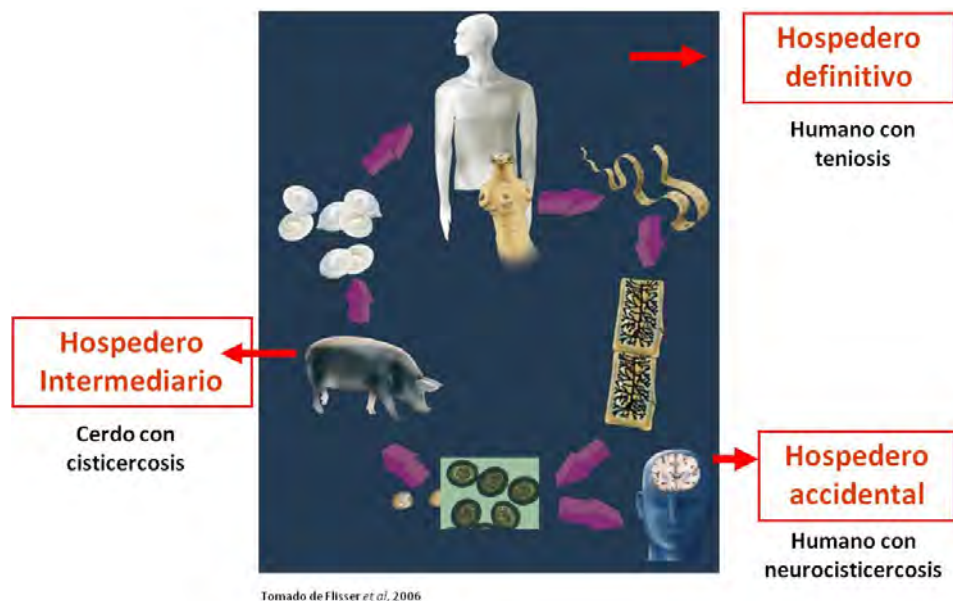
## 2. ABSTRACT

Human neurocysticercosis is caused by the larval stage of the cestode *Taenia solium*. Epidemiological studies have demonstrated that tapeworm carriers are the main risk factor for acquiring cysticercosis. Thus, vaccination against the adult *T. solium* tapeworm could be a promissory alternative control measure by inducing an effective intestinal immunity. *T. solium* calreticulin (TsCRT) is a multifunctional protein, located in the tegument and muscle cytons of the cysticerci and tapeworms, and it is expressed during gametogenesis and embryogenesis. The aim of this project was to evaluate the effect of oral immunization with TsCRT on the intestinal taeniosis in the golden hamster model. Initially, optimal conditions for the experimental model were standardized, including age of the host, infection rates and morphological characteristics of the cysticerci used for the challenge. Then, TsCRT was obtained in a bacterial expression system and employed for oral immunization of hamsters weekly during four weeks with cholera toxin (CT) as adjuvant. Control groups were inoculated with CT, non-transfected bacteria or with the diluent. Fifteen days after the last immunization, hamsters were orally challenged with four viable cysticerci. During necropsy, the length and location of tapeworms at the intestine, as well as the percentage of tapeworm recovery were determined. Oral immunization with TsCRT induced 33% to 44% in tapeworm reduction when hamsters were challenged with reddish cysticerci. When the challenge was performed with yellowish cysticerci, protection increased to 100%. Tapeworms recovered from immunized hamsters were reduced in length, exhibiting a significant change in their location at the intestinal lumen. Vaccinated hamsters developed serum IgG and faecal IgA specific antibodies detected since the second immunization. TsCRT oral immunization also augmented goblet cell hyperplasia accompanied by a significant increase in the expression of IL-4 and IFN- $\gamma$  at the intestinal attachment site of the parasite. In conclusion, our findings indicate that oral vaccination with TsCRT regulates the local cytokine production stimulating IgA secretion that, together with the activation of goblet cells and mucin production, could result in an unfavorable environment for parasites, which is associated with an impaired tapeworm development and parasite expulsion.



### 3. INTRODUCCIÓN

La neurocisticercosis es una enfermedad causada por el céstodo *Taenia solium*. En varios países de América latina, África y Asia se considera una parasitosis de importancia en salud pública y es una causa significativa de morbilidad y mortalidad (Fleury 2009). El principal factor de riesgo para adquirir cisticercosis humana o porcina es la presencia en el entorno familiar o cercano de un portador de la tenia adulta intestinal (Flisser 1994). El ser humano adquiere la teniosis por comer carne de cerdo insuficientemente cocida que contiene cisticercos vivos. El cisticerco es ovalado, mide de 1 a 2 cm y es vesicular con el escolex invaginado; cuando se transforma en tenia, el escolex y el cuello evaginan, anclándose en la mucosa intestinal. A partir del cuello, se forma el estróbilo que mide hasta un par de metros y es como un listón blanco y aplanado formado por segmentos repetitivos en diferente grado de desarrollo: inmaduros, maduros y grávidos, estos últimos pueden contener alrededor de 60,000 huevos y son liberados en las heces. El cerdo es el hospedero intermediario debido a que en él se desarrolla el estadio de metacéstodo o cisticerco en el músculo o en el cerebro después de consumir heces fecales contaminadas. El ser humano también puede desarrollar de manera accidental, cisticercosis en el sistema nervioso central y el músculo esquelético al consumir huevos del parásito adulto (Garcia et al. 2002; Garcia et al. 2003) (Figura 1).



**Figura 1.** Ciclo de vida de *Taenia solium*

### **3.1. Factores de riesgo asociados a la cisticercosis**

Estudios de campo en algunos países de América Latina como México y Perú, identificaron como principal factor de riesgo para adquirir cisticercosis la presencia del portador de *T. solium* en casa o en el ambiente cercano (Sarti-Gutierrez et al. 1988; Sarti et al. 1992; Sarti et al. 1994; Garcia et al. 1999). Se ha demostrado que la prevalencia de individuos con teniosis es mayor entre pacientes con neurocisticercosis que en el resto de la población (Gilman et al. 2000). Existe una asociación entre la presencia de portadores de la tenia adulta con la severidad de la neurocisticercosis, ya que, aparentemente, la mayor parte de las infecciones masivas cerebrales resultan de una fuente de infección constante en pacientes que tienen el parásito adulto en el intestino (Flisser 2006). Por lo tanto la percepción de que la tenia es un huésped silencioso que no causa daño al ser humano, debe considerarse errónea, ya que los portadores de tenia deben visualizarse como fuentes potenciales de contagio a ellos mismos y a aquellos que viven en el ambiente cercano (Gilman et al. 2000). Además, estudios epidemiológicos han identificado otros factores de riesgo asociados a la cisticercosis como: consumo de carne infectada, historia de liberar proglótidos de tenia, mala higiene personal, historia de crisis convulsivas de inicio tardío y fecalismo al ras del suelo (Flisser 2006). Las personas seropositivas generalmente se encuentran agrupadas en casas que tienen un miembro que informó haber desalojado proglótidos o que tenía estudios coproparasitológicos o coproantígenos positivos. La cisticercosis porcina se asocia con permitir a los cerdos deambular libremente y utilizar a las porquerizas como baños (revisado en (Flisser 2002; Garcia et al. 2003).

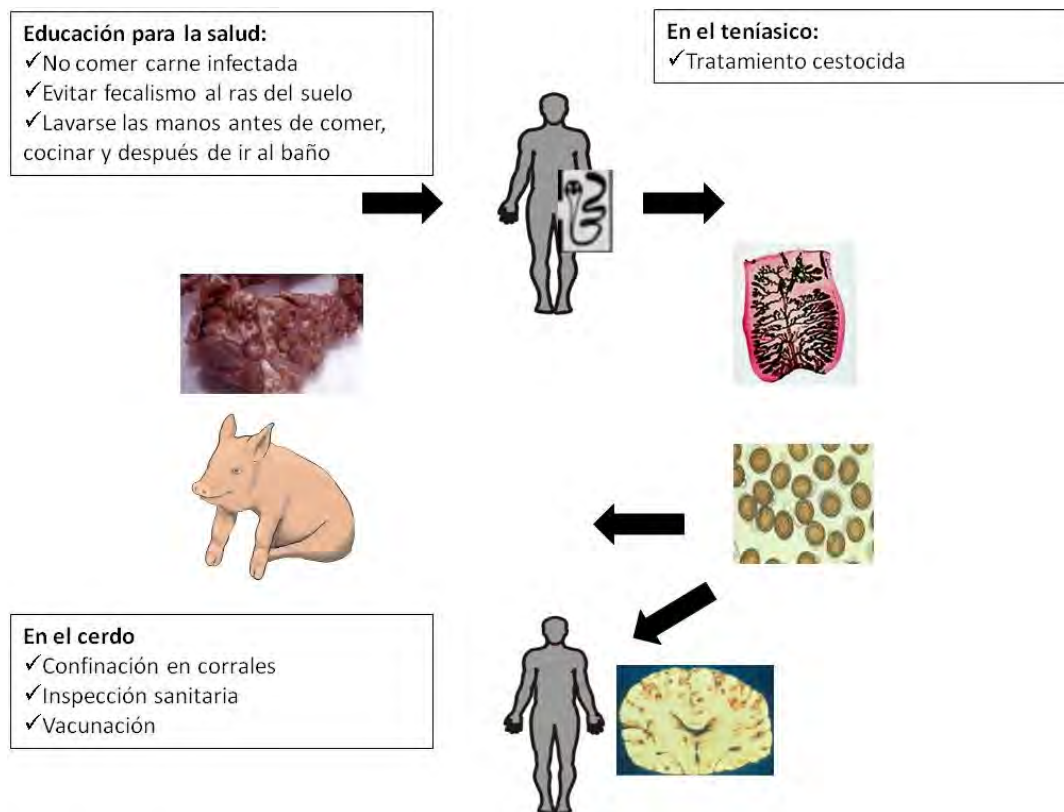
### **3.2. Medidas de control**

Desde hace aproximadamente 20 años el uso de diversos fármacos para el control de geohelminths, así como el de programas educativos y de salud pública, ha sido una constante en las zonas con alta prevalencia de algunas helmintiasis, con la finalidad de disminuir las tasas de infección y aumentar la calidad de vida del individuo (Allan et al. 1997; Boa et al. 2003). En el caso de *T. solium*, la niclosamida y el prazicuantel son

fármacos que han sido usados para tratamientos contra teniosis, sin embargo la niclosamida no está disponible en México y la norma oficial (NOM, 2004) recomienda el uso del praziquantel para el tratamiento de teniosis en personas sintomáticas y asintomáticas (Flisser et al. 2005). No obstante, como esta droga se absorbe en el intestino puede causar complicaciones en personas con neurocisticercosis (Flisser et al. 1993). Además, fenómenos como la migración masiva de personas provenientes de áreas rurales hacia zonas urbanas, tanto de zonas endémicas como no endémicas, hace que los portadores de la tenia intestinal escapen del control, esparciendo la enfermedad y restableciendo la transmisión del parásito cuando regresan a su área de origen (Larralde 2006). La teniosis es una enfermedad asintomática, por consiguiente puede tardar un tiempo en ser detectada y tratada, tiempo suficiente para que la tenia produzca millones de huevos. Además, recientemente se ha sugerido que el uso masivo de antihelmínticos puede resultar en el desarrollo de resistencia a estas drogas (Wolstenholme et al. 2004). Por lo tanto, el uso de fármacos en los portadores de la tenia adulta parece no ser la mejor opción para interrumpir la transmisión de *T. solium* (Figura 2). En algunas poblaciones, una estrategia de intervención preventiva ha sido proveer educación para la salud, modificando los conocimientos, actitudes y prácticas de la comunidad con la meta de evitar nuevas infecciones en humanos y en cerdos (Sarti et al. 1997; Flisser et al. 2005; Flisser et al. 2006). Aunque estas acciones han sido exitosas en cierto nivel, parecen ser insuficientes para controlar la transmisión de esta parasitosis a largo plazo (Boa et al. 2003; Garcia et al. 2006).

Durante los últimos años, los esfuerzos para el control de esta parasitosis se han enfocado en el desarrollo de vacunas en contra de la cisticercosis porcina (Guo et al. 2004; Manoutcharian et al. 2004; Gonzalez et al. 2005; Wu et al. 2005). Vale la pena resaltar que en México hay importantes avances en esta área. Proteínas recombinantes de la oncósfera de *T. solium* denominadas TSOL18 y TSOL45-1A inducen 99.5% y 97% de protección respectivamente, en cerdos inmunizados y retados experimentalmente con huevos de *T. solium* (Flisser et al. 2004). La vacuna sintética S3Pvac induce altas tasas de protección en contra de la infección adquirida de manera natural (Huerta et al. 2001; Sciutto et al. 2007). Sin embargo, el éxito de esta estrategia está determinado por programas de vacunación

continuos, ya que el efecto de la vacuna en contra de la cisticercosis porcina, permanecerá durante el tiempo en el cual los cerdos vacunados permanezcan vivos. Si el programa de vacunación se interrumpe, la prevalencia de la cisticercosis en los cerdos recién nacidos retornará a los valores iniciales en el momento en el cual haya disponibilidad de huevos por un portador de la tenia adulta intestinal (Sciutto et al. 2007). Conjuntamente, estos portadores son difícilmente detectados en las comunidades, las cuales generalmente están en pobreza extrema con dificultad para atender a sus animales.



**Figura 2.** Medidas de control en contra de la cisticercosis

### 3.3. Vacunación en contra del parásito intestinal

La vacunación en contra del establecimiento o el desarrollo del parásito adulto de *T. solium*, surge como una alternativa para prevenir la dispersión de millones de huevos con

la capacidad de desarrollarse en cisticercos e infectar a los seres humanos y a los cerdos. A pesar de que la vacunación en contra de cestodos adultos intestinales ha sido un área poco explorada, existen algunos reportes que indican que es posible inducir protección. Ensayos en perros vacunados con antígenos de secreción/excreción del gusano adulto de *Echinococcus granulosus*, demuestran que es posible reducir en un 64% el número de parásitos y suprimir en un 90% la producción de huevos (Herd et al. 1975), revisado en (Sciutto et al. 2007). En un estudio reciente, al inmunizar oralmente perros con dos proteínas recombinantes de *E. granulosus*, se obtuvo una disminución hasta del 80% en el número de parásitos adultos intestinales y se encontró una reducción en el tamaño de las tenias que permanecieron en el intestino de los animales inmunizados (Petavy et al. 2008). En la vacunación contra *Taenia hydatigena*, utilizando antígenos somáticos del parásito adulto y un adyuvante, se obtuvo una protección de hasta el 83% (Kandil and Abou-Zeina 2005). En el caso de *Hymenolepis diminuta* se ha reportado hasta un 100% de protección al inmunizar ratas con oncósferas no viables, pero esto no sucede al hacer el ensayo en ratones y retar con *Hymenolepis microstoma* (Fan et al. 2004) revisado en (Sciutto et al. 2007). Para *T. solium* el único ensayo realizado en el hámster dorado, indica que es posible conferir protección contra el parásito adulto al inmunizar subcutáneamente y oralmente con péptidos sintéticos derivados de una biblioteca de cDNA de *T. crassiceps* (Cruz-Revilla et al. 2006); pero este último estudio se realizó con pocos animales y sin repeticiones. Sin embargo, no existen reportes sobre el uso de proteínas recombinantes o vacunas orales y la respuesta inmune que estas inducen en protección contra teniosis.

### **3.4. Modelo experimental**

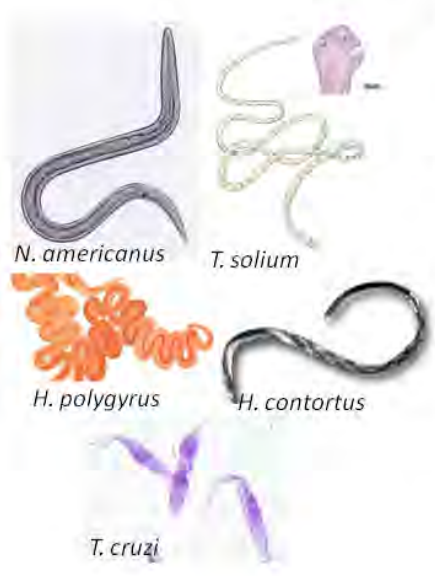
El hospedero definitivo del adulto de *T. solium* es el ser humano, lo que conlleva a la imposibilidad de estudiar la relación hospedero-parásito. El desarrollo de modelos experimentales ha permitido realizar investigaciones en aspectos inmunológicos e histológicos en la relación hospedero-parásito en teniosis. *T. solium* puede crecer en hámsteres dorados (*Mesocricetus auratus*) y en otros roedores (Maravilla et al. 1998). En el intestino del hámster, el cisticerco puede transformarse en la fase adulta del parásito, desarrollarse y crecer algunos centímetros. En animales inmunosuprimidos, es posible

recuperar tenias pre-grávidas, de varios centímetros de longitud que pueden permanecer hasta 40 días en el intestino (Avila et al. 2006). Sin embargo, en el hospedero no inmunosuprimido los parásitos se desprenden del intestino sin maduración previa al cabo de pocas semanas. Debido a las facilidades de manejo que presenta el hámster, así como a la alta susceptibilidad a la infección por este parásito, se utilizó para desarrollar una prueba de diagnóstico para teniosis (Allan et al. 1990). Para esto se emplearon animales inmunodeprimidos e inmunocompetentes y se observó que en los primeros se recupera un mayor número de tenias y estas son de mayor tamaño, aunque nunca se desarrollan hasta la gravidez, por lo que no representan riesgo para la salud del operador. Este modelo experimental permitió determinar parámetros del crecimiento del parásito en animales inmunodeprimidos (Avila et al. 2006) e identificar los componentes de la respuesta inflamatoria en la mucosa intestinal y de la respuesta inmune humoral en animales inmunocompetentes (Merchant et al. 1998; Avila et al. 2002; Avila et al. 2003). En los hámsteres infectados con *T. solium* se detectan anticuerpos séricos y coproanticuerpos a partir de la segunda semana de infección. La respuesta inflamatoria está conformada por diversos tipos celulares, las células caliciformes, que incrementan durante la primera semana de infección, llegando al máximo en la segunda semana y regresando a sus valores iniciales un mes post-infección; este aumento es cuatro veces mayor que el número de células caliciformes presentes en los animales no infectados. Sobresale la ausencia de las células cebadas en la mucosa intestinal de hámsteres infectados y su aumento en la mucosa intestinal de gerbos, en los que las tenias son más pequeñas y se desalojan más rápidamente (Avila et al. 2002). Estos datos indican que el hámster dorado es un modelo experimental adecuado por su alta susceptibilidad al desarrollo de parásitos adultos de *T. solium* sin necesidad de inmunodepresión. Las respuestas sistémica y local inducidas en la infección con la tenia adulta intestinal (Avila et al. 2006), la protección generada después de una infección primaria (Cruz-Revilla et al. 2006) y el incremento de la susceptibilidad a la infección debido a la inmunodepresión con corticosteroides (Maravilla et al. 1998), indican que el sistema inmune del hámster es capaz de responder a la infección por *T. solium*.

### 3.5. Calreticulina

La calreticulina (CRT) es una proteína altamente conservada con actividades importantes en la regulación de funciones celulares (Nakhasi et al. 1998). Inicialmente se identificó en el lumen del retículo endoplásmico como una proteína de unión al  $\text{Ca}^{++}$  (Michalak et al. 1992). Actualmente, se sabe que esta proteína está involucrada en la regulación de la homeóstasis y de los niveles de  $\text{Ca}^{++}$  intracelular, como chaperona, en expresión de genes, autoinmunidad, angiogénesis, crecimiento de tumores y se comprobó su presencia en varios compartimientos subcelulares (Michalak et al. 1999). Se han identificado homólogos de la calreticulina en diferentes parásitos lo que denota su importancia en la relación hospedero-parásito (Figura 3) (Khalife et al. 1993; Rokeach et al. 1994; Kasper et al. 2001; Mendlovic et al. 2006; Cabezon et al. 2008). Por ejemplo, pacientes infectados con *Necator americanus* desarrollan anticuerpos IgE específicos contra la CRT (Kasper et al. 2001). Los basófilos aislados de los individuos que habitan las zonas endémicas para ancilostomas son capaces de liberar histamina en presencia de CRT (Pritchard et al. 2007). Esta proteína, también es reconocida por los anticuerpos de tipo IgE e IgG1 producidos por ratones infectados con *Heligmosomoides polygyrus* y es capaz de inducir la degranulación de una línea celular de basófilos que ha sido sensibilizada con estos anticuerpos (Rzepecka et al. 2006). Un análisis del proteoma de *H. polygyrus* reveló que los parásitos que persisten por mayores periodos de tiempo en ratones C57BL/10 sobre-expresan esta proteína en comparación a los que se expulsan rápidamente en ratones SWR (Morgan et al. 2006). Además, la CRT de *H. polygyrus* estimula la producción de las citocinas IL-4 e IL-10 por parte de linfocitos T CD4+ en ratones infectados con este parásito (Rzepecka et al. 2009), lo que resalta la habilidad de esta proteína por inducir respuestas alérgicas e inmunes de tipo Th2. En algunos modelos experimentales, bajo esquemas de inmunización parenteral, la CRT se ha evaluado como candidata a vacunación contra helmintos produciendo diferentes grados de protección, así como una polarización hacia la respuesta inmune de tipo Th2. La CRT es uno de los antígenos inmunodominantes en la vacuna de cercaria irradiada, que confiere mayor protección en los modelos experimentales de esquistosomosis y es capaz de estimular linfocitos B y T *in vitro* (El Gengehi et al. 2000). En ratones

inmunizados con la CRT recombinante de *Necator americanus* que después se infectaron con las larvas infectivas del mismo parásito se obtuvo una reducción del 43 al 49% en el número de gusanos adultos (Winter et al. 2005).



Parásito	Implicaciones de la Calreticulina (CRT)
<i>N. americanus</i>	Pacientes infectados desarrollan anticuerpos IgE Estimula la liberación de histamina de basófilos aislados de una población infectada Como vacuna: disminución del 43%-49% de parásitos
<i>H. polygyrus</i>	Ratones infectados desarrollan anticuerpos IgE Indujo la degranulación de una línea celular de basófilos sensibilizados con IgE Estimula la secreción de IL-4 e IL-10 de linfocitos CD4+ de ratones infectados La inmunización subcutánea en ratones indujo la producción de anticuerpos IgE e IgG1 específicos, así como la producción de IL-4
<i>T. solium</i>	La inmunización oral en ratones estimuló la producción de IL-4 e IL-5 en células de NLM
<i>H. contortus</i>	Detectada en productos de excreción/secreción
<i>T. cruzi</i>	Altamente inmunogénica Inhibe angiogénesis Inhibe C1q complemento

**Figura 3.** La calreticulina y los parásitos

Recientemente, se aisló el cDNA que codifica para la calreticulina de *T. solium* (TsCRT), además se logró expresar esta proteína en un sistema de expresión de *E. coli* y obtener una proteína recombinante funcional con capacidad de unir  $Ca^{2+}$  *in vitro* (Mendlovic et al. 2004). En *T. solium*, por estudios de inmunolocalización, utilizando anticuerpos específicos anti-TsCRT, se demostró que esta proteína se expresa diferencialmente en los estadios del ciclo de vida del parásito, estando presente en la gametogénesis y la embriogénesis. En el cisticerco y el adulto, la TsCRT se localiza preferencialmente en el músculo de las ventosas y del rostelo, así como en las células tegumentarias (Mendlovic et al. 2006). Estos dos tipos celulares tienen una gran actividad metabólica, ya sea la contracción-relajación o el



transporte activo, respectivamente, lo que sugiere que la expresión de la TsCRT pudiera jugar un papel importante en los procesos de anclaje de la tenia a la pared intestinal, en la que participa activamente el roseto y ventosas, y de alimentación del parásito, ya que no tiene sistema digestivo y su alimento es por transporte de nutrientes a través del tegumento. Esta información sugiere que esta proteína es un candidato interesante para el desarrollo de una vacuna que induzca una respuesta inmune que interfiera con el establecimiento y el desarrollo del parásito adulto y/o con la producción de huevos infectivos.

### **3.6. Respuesta inmune contra helmintos intestinales**

Los mecanismos de la respuesta inmune en contra de los parásitos intestinales han sido ampliamente estudiados en infecciones experimentales de roedores con helmintos (Horii et al. 1993; Wilkes et al. 2007; Allen and Maizels 2011). En múltiples helmintiasis, la respuesta inmune protectora ha sido relacionada con repuestas de Tipo 2 (Anthony et al. 2007). Estas respuestas incluyen activación y expansión de células CD4<sup>+</sup> Th2, células plasmáticas secretoras de IgE, eosinófilos, células cebadas y basófilos. El incremento en los niveles de las citocinas IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 e IL-21 es característico en estas infecciones. A través de la producción de IL-4, las células Th2 regulan el cambio de isotipo de las células B hacia la producción de anticuerpos IgE. A través del receptor Fc de alta afinidad para IgE presente en la superficie de las células de la respuesta inmune innata como basófilos y células cebadas, los complejos inmunes de IgE inducen la degranulación de estas células. Los productos secretados por los basófilos y las células cebadas incluyen citocinas, quimiocinas, histamina, heparina, serotonina y proteasas que pueden inducir el reclutamiento de las células inflamatorias, el incremento en la permeabilidad vascular y la contracción del músculo liso. En la mucosa intestinal, las células Th2 pueden reclutar eosinófilos (a través de IL-5) y células cebadas (a través de IL-9), así como actuar directamente sobre las células epiteliales (a través de IL-4, IL-9 e IL-13), células del músculo liso (a través de IL-4 e IL-13) e inducir la producción de moco y la hiperplasia de las células caliciformes (Paul and Zhu 2010). Las citocinas producidas por las células Th2 pueden tener efectos en muchos otros tipos celulares debido a que los receptores IL-4 (IL-4R) e IL-13 (IL-13R) se expresan ampliamente en diferentes tipos celulares. A pesar de

que varias helmintiasis inducen respuestas Th2, los componentes involucrados en la protección difieren de un parásito a otro (Cuadro 1).

**Cuadro 1.** Componentes de la respuesta inmune necesarios para la expulsión de algunos helmintos intestinales

Parasito	Zona de anclaje en el intestino	Componentes involucrados en la expulsión	Citocinas	Referencia
<i>T. spiralis</i>	Intraepitelial (sincicio de células epiteliales) Intestino delgado	Células cebadas: mMCP-1, mMCP-2 Células caliciformes: RELM $\beta$ , Siat4c	IL-4 IL-13	(Artis et al. 2004; Knight et al. 2008)
<i>T. muris</i>	Intraepitelial (túneles de células) Ciego	Recambio de las células epiteliales Células caliciformes: RELM- $\beta$	IL-13	(Betts and Else 1999; Cliffe et al. 2005)
<i>N. brassiliensis</i>	Se ancla a la pared del intestino delgado	Células caliciformes: RELM- $\beta$ Contracción del músculo liso	IL-13	(Uber et al. 1980; Ishikawa et al. 1994)
<i>T. solium</i>	Se ancla a la pared del intestino delgado	Células cebadas y caliciformes (gerbos) Células caliciformes (hámsteres)	IL-13 IL-5	(Avila et al. 2002; Avila et al. 2003)
<i>H. diminuta</i>	Se ancla a la pared del intestino delgado	Células caliciformes	IL-13	(McKay and Khan 2003; Webb et al. 2007)

#### 4. HIPÓTESIS

La vacunación con la calreticulina recombinante de *Taenia solium* (TsCRT) por vía oral estimula el sistema inmunitario del hospedero impidiendo el establecimiento o el desarrollo del estadio adulto de este parásito.

#### 5. OBJETIVOS

##### GENERAL

Evaluar si la inmunización por vía oral con TsCRT induce protección contra la teniosis experimental por *Taenia solium* en el hámster dorado.

##### ESPECÍFICOS

1. Producir TsCRT en un sistema de expresión bacteriano y obtener una proteína recombinante funcional en cantidad suficiente.
2. Estandarizar las condiciones óptimas del modelo experimental: edad del hámster dorado, porcentaje de infección y porcentaje de recuperación de tenias.
3. Analizar la respuesta de anticuerpos específicos inducidos por la inmunización con TsCRT e identificar cambios en las poblaciones de células cebadas y caliciformes en la mucosa intestinal.
4. Determinar cambios en la expresión del mRNA de las citocinas IFN- $\gamma$ , IL-12, IL-4 e IL-10 en la mucosa intestinal y en el bazo de los animales inmunizados con TsCRT.

## 6. MATERIAL Y MÉTODOS

### 6.1. Modelo experimental para la teniosis intestinal

Se utilizaron hámsteres hembras (*Mesocricetus aureatus*) no singénicas producidas en el bioterio de la Facultad de Medicina o machos producidos en el bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas, se mantuvieron bajo condiciones convencionales, se les proporcionó agua y alimento estériles *ad libitum*. Se desparasitaron por vía oral dos semanas antes de la infección o de la primera inmunización con 30 mg/kg de albendazol durante tres días y con una dosis única de praziquantel en la misma concentración. El protocolo fue aprobado por el Comité de Investigación y de Ética de la Facultad de Medicina de la UNAM.

Se obtuvieron cisticercos de *T. solium* del músculo esquelético de diferentes cerdos con infecciones naturales. Los cisticercos se midieron, se fotografiaron y se usaron 10 parásitos para determinar la viabilidad mediante la prueba de evaginación *in vitro*, se incubaron en 25% de bilis de cerdo en medio de cultivo RPMI a 37°C durante 6 h. Los hámsteres se retaron por vía oral con 4 cisticercos por animal.

### 6.2. Producción de la TsCRT recombinante

El fragmento de cDNA que codifica para la TsCRT madura sin el péptido señal se clonó en el plásmido pET 23-a con resistencia a ampicilina (Mendlovic et al. 2004). Para la preparación y transformación de bacterias competentes BL21 y XI- 1 blue, se inocularon 5 ml de medio LB con una colonia de bacterias y se incubaron a 37°C durante 16 h en agitación. Las células se enfriaron en hielo y se cosecharon por centrifugación a 5000 rpm durante 15 min a 4°C, se resuspendieron en el volumen original con CaCl<sub>2</sub> 50 mM. Se incubaron en hielo durante 30 min, se cosecharon y se resuspendieron en 500 µl de CaCl<sub>2</sub>, se dividieron en alícuotas de 100 µl y se incubaron en hielo con 10 µl del plásmido durante 30 min. Transcurrido este tiempo, se les dio un choque térmico a 42°C durante 60 s y se incubaron en hielo 2 min. Se les añadió 1 ml de medio LB y se incubaron 1 h a 37°C en

agitación. Las bacterias transformadas se centrifugaron, se resuspendieron en 100  $\mu$ l de medio LB y se sembraron en cajas de agar con 200  $\mu$ g/ml de ampicilina. Las bacterias se incubaron a 37°C toda la noche. En la mañana se observó el grado de crecimiento de las colonias y se guardaron a 4°C. En la tarde se escogieron 6 colonias por caja que se usaron para inocular 5 ml de medio LB con ampicilina, se cultivaron toda la noche a 37°C en agitación. Al día siguiente, las bacterias XI- 1 blue transformadas se utilizaron para obtener suficiente plásmido para la secuenciación. El plásmido se purificó utilizando el kit de Quick plasmid (Invitrogen). Con las bacterias BL21 se inocularon matraces con 100 ml de medio LB-ampicilina en una dilución 1:100, después de 5 h de cultivo, hasta alcanzar una OD<sub>600</sub> de 0.8 a 0.9, se añadió IPTG 1 mM, después de 4 h de incubación las bacterias se cosecharon por centrifugación y los precipitados se guardaron a -20°C hasta su uso. Las bacterias se analizaron en geles de poliacrilamida SDS-PAGE al 12% para verificar la expresión de la proteína de interés. La TsCRT producida de manera recombinante se identificó en el gel como una banda enriquecida de 50 kDa.

La purificación de TsCRT incluye centrifugación diferencial y electroelución. Para la centrifugación diferencial se utilizaron 5 ml del amortiguador A (Tris-HCl 20 mM pH 7.3, sacarosa al 20%) para lisar las células y extraer las proteínas solubles de los precipitados después de agitar 5 min en el vortex. Las bacterias se centrifugaron a 8500 rpm a 4°C 15 min. El precipitado se resuspendió en 6 ml de ddH<sub>2</sub>O, después de centrifugar se añadieron 3 ml del amortiguador P que contiene inhibidores de proteasas (Complete, Roche), se sonicaron cuatro veces a 50 W durante 30 s, se agregó 5  $\mu$ l de RNAsa y DNAsa de una solución stock de 1mg/ml por cada ml. Finalmente, el sonificado se incubó a temperatura ambiente 10 min y se centrifugó a 10500 rpm durante 30 min. Se sometieron a electroforesis 10  $\mu$ l de los sobrenadantes obtenidos después de cada centrifugación en geles de poliacrilamida con SDS para identificar la fracción que contiene la TsCRT, la que se denominó S3.

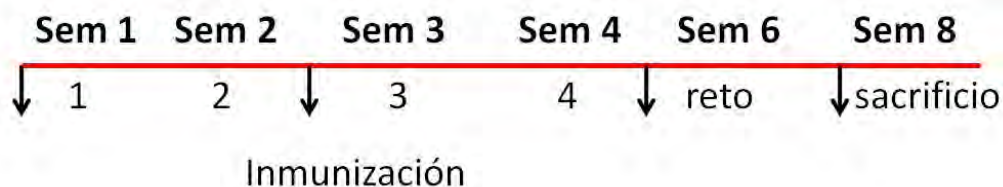
Para la electroelución se utilizó la fracción S3 y se realizaron varias electroforesis en geles de SDS-PAGE al 12%. Los geles se tiñeron con Imidazol-SDS 0.2N/0.1% y ZnSO<sub>4</sub> 0.2N que permitió detectar la banda de 50 kDa que corresponde a la TsCRT. Las bandas de

varios geles se cortaron en fracciones de  $1\text{mm}^3$  con ayuda de un bisturí. Se utilizaron tubos de vidrio verticales que contienen la membrana de diálisis (Bio-rad), se llenaron con el buffer de elución Tris-Glicina-SDS 25mM/192mM/0.02% evitando la formación de burbujas. Cada tubo se llenó con  $1\text{ cm}^3$  del gel y se colocó en la cámara de elución. La elución se realizó en el electroelutor 422 de Bio-rad, a 10 mA/tubo durante 1h. Transcurrido este tiempo, se cambio el buffer de elución por uno sin SDS. Se recolectaron 300  $\mu\text{l}$  de buffer por cada tubo en donde está la TsCRT. El producto eluido se analizó en un gel SDS-PAGE al 12% y las proteínas se cuantificaron (Bio-Rad DC protein assay). Se detectó una única banda que correspondió a la TsCRT. La elución de 6 geles pequeños produjo aproximadamente 200  $\mu\text{g}$  de TsCRT. Con el objetivo de eliminar los restos del detergente de la muestra, se realizó una diálisis con PBS en columnas (Centricom, Millipore). Para eliminar los restos de las endotoxinas se utilizaron las columnas Detoxi-Gel Endotoxin Removing Gel (Thermo), que aprovechan la habilidad de la Polimixina B de unirse a pirógenos presentes en la solución. Después de la diálisis y de la eliminación de las endotoxinas, se verificó la presencia de la proteína en geles de poliacrilamida y se cuantificó. Se utilizó el programa Quantity One 4.0.3 (Bio-Rad) para calcular el porcentaje de pureza de la TsCRT (Mendlovic et al. 2004).

### 6.3. Inmunización y reto

Hámsteres hembras de 3 y 9 meses de edad se dividieron en grupos de 5 a 10 animales y se inmunizaron por vía oral en 4 ocasiones, una vez por semana a través de una sonda esofágica. Como vacuna se utilizó 100  $\mu\text{g}$  de TsCRT y como adyuvante 10  $\mu\text{g}$  de toxina colérica (TC) por animal, mezclados y diluidos en bicarbonato de sodio 0.2 M con glucosa al 0.3%, en un volumen final de 0.5 ml. El primer grupo se inmunizó con TsCRT + TC, el segundo grupo con TsCRT, el tercer grupo con TC, el cuarto grupo con 100  $\mu\text{g}$  de las proteínas obtenidas de bacterias sin transfectar y el quinto grupo solo con el diluyente. Dos semanas después de la última inmunización se realizó el reto con 4 cisticercos de *T. solium* por animal y entre 15 y 20 días después de la infección (DPI) se realizó su eutanasia (Figura 4). Antes de la inmunización y para el sacrificio, los animales se anestesiaron por inhalación de sevoflurano (Sevorane, Abbott) y permanecieron sin alimento la noche antes de ser retados o sacrificados. Se colectaron muestras de sangre del plexo venoso

oftálmico y materia fecal de los animales, antes de la primera inmunización, antes del reto y durante el sacrificio, que se guardaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. Los grupos de hámsteres que fueron inmunizados pero no recibieron el reto, se sacrificaron una semana después de la última inmunización. Se realizaron 2 experimentos independientes de animales inmunizados y 5 experimentos independientes de animales inmunizados y retados.



**Figura 4.** Esquema de inmunización. Se realizaron cuatro inmunizaciones, una cada semana. Las flechas indican los días en que se tomaron las muestras de sangre y heces fecales.

#### 6.4. Necropsias

Los hámsteres se sacrificaron humanitariamente; durante la necropsia de cada animal, se extrajo el intestino delgado, se colocó en una caja de Petri grande y se abrió a todo lo largo. Con la ayuda de un microscopio estereoscópico o con una lupa se buscaron las tenias, se lavaron con PBS, se midieron, se registró el número, la longitud y la localización de la zona de anclaje al intestino respecto al píloro. El porcentaje de infección se definió como el número de animales infectados con una o más tenias y el porcentaje de recuperación como el número de tenias recuperadas después de infectar cada animal con 4 cisticercos. Los tejidos del bazo, nódulos linfáticos mesentéricos y del intestino delgado se colectaron asépticamente para histopatología, para ensayos de linfoproliferación y para la extracción de RNA. El porcentaje de protección debido a la vacunación se definió como  $\text{Protección} = \frac{\text{NTC} - \text{NTI}}{\text{NTC}}$ . NTC= Número de tenias en el grupo control. NTI= Número de tenias en el grupo inmunizado (Goud et al. 2004).

### 6.5. Evaluación de la respuesta inmune humoral

Las heces frescas se recolectaron y se prepararon extractos fecales solubles diluyendo 300 mg/ml de heces en PBS con inhibidores de proteasas (Complete, Roche) y 0.1% Tween 20 (PBS-T) (vol:vol), se agitaron en vortex y se guardaron toda la noche a 4°C. Al día siguiente, los extractos se centrifugaron a 3300 g durante 15 min a 4°C y se colectaron los sobrenadantes. Posteriormente se realizó una segunda centrifugación a 12000 g durante 5 min a 4°C para eliminar cualquier material precipitado, las proteínas se cuantificaron y la concentración se ajustó a 5-7 mg/ml.

Para identificar la IgA total en las heces del hámster utilizando el anticuerpo anti-IgA de ratón, se diluyeron 12 µg de los extractos fecales de ratón y de hámster en buffer de carga con 2-β-mercaptoetanol y se corrieron en un gel SDS-PAGE al 12%. Las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF la cual se bloqueó con albúmina al 1% en PBS-T durante 2 h a temperatura ambiente. Las membranas se incubaron con el anticuerpo anti-IgA de ratón acoplado a peroxidasa (Zymed, Invitrogen) 18 h a 4°C en diferentes diluciones. El anticuerpo se detectó por la adición de diaminobenzidina y peróxido de Hidrógeno, que se lavó cuando aparecieron las bandas. Después de cada incubación, las membranas se lavaron con PBS-T, 3 veces, 5 min cada una.

Para detectar anticuerpos IgG e IgA específicos anti-TsCRT se utilizó un ELISA indirecto. Se incubaron 100 µl/pozo de TsCRT a 5 µg/ml 18 h a 4°C en buffer de carbonatos pH 9.6. Las placas se lavaron 3 veces con PBS-T y se bloquearon 2 h con albúmina al 3% a 37°C. Después de 3 lavados se incubaron con 100 µl de los extractos fecales 3 h a temperatura ambiente (TA), o con 100 µl de los sueros diluidos en PBS-T (1:200) 2 h a 37°C. Después de 4 lavados se incubaron 1 h a 37°C con el anticuerpo anti-IgA de ratón acoplado a peroxidasa (Zymed, Invitrogen) en una dilución de 1:250 o con el anti-IgG biotinilado de hámster (eBioscience) a 1.35 µg/ml en PBS-BSA al 1%. Después de 4 lavados, se detectó el conjugado por la adición de 100 µl del sustrato OPD (Sigma), en el caso de IgA. Para detectar el anticuerpo anti-IgG de hámster se añadieron 100 µl por pozo de Strep-HRP (Invitrogen) 1:5000, 30 min a TA, se realizaron 4 lavados con PBS-T y se reveló con 100 µl por pozo de ABTS (Invitrogen) como cromógeno. Los valores de



absorbancia se registraron en un lector de ELISA (Bio-Rad) a 492 nm para detectar el IgA y 405 nm para el IgG. El punto de corte se determinó como el promedio más 3 veces la desviación estándar (DS) de la densidad óptica obtenida con el suero o los extractos fecales del grupo control.

#### **6.6. Evaluación de la respuesta inmune en la zona de anclaje del parásito**

Se colectaron biopsias de 3 mm justo en la zona de anclaje de las tenias en el intestino delgado. Como control negativo se tomaron muestras del intestino entre 2 y 3 cm alejadas de la zona de anclaje (zonas distales), ya que se ha documentado que estas zonas no presentan cambios durante la infección (Avila et al. 2002). Posteriormente, las biopsias se fijaron en amortiguador salino de fosfatos (PBS) adicionado con formaldehído al 10%, se deshidrataron en soluciones de alcohol etílico en concentraciones crecientes y finalmente se aclararon en xilol. A continuación se embebieron en parafina y se realizaron cortes de 3 $\mu$ m que se depositaron en portaobjetos Kling-on Hier (Biocare Medical) y se tiñeron con azul de toluidina durante 30 min. Para el conteo de células, las preparaciones se observaron en el microscopio de luz. Las células cebadas se reportaron por 10 criptas y las células caliciformes por 10 vellosidades. El conteo se realizó por dos observadores diferentes para cinco u ocho animales por grupo en dos experimentos independientes

#### **6.7. Extracción de RNA y PCR en tiempo real para el análisis de la expresión de las citocinas en el hámster**

La técnica de PCR en tiempo real se utilizó para determinar los cambios en la expresión del mRNA de las citocinas IFN- $\gamma$ , IL-12, IL-4 e IL-10 en la zona de anclaje de los parásitos en el intestino de los animales que fueron inmunizados con TsCRT y en los bazos de hámsteres que fueron inmunizados pero no retados. Después de la necropsia, las muestras se almacenaron a -70°C hasta su uso. Para extraer el RNA total las muestras se trataron con Trizol (Invitrogen, USA). Cada tejido se homogenizó y se añadieron 0.2 ml de cloroformo frío por cada ml de homogenizado. La muestra se agitó en vortex durante 30s y se centrifugó a 13000 rpm durante 15 min a 4°C. La fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo, se añadió isopropanol (Sigma) y el RNA se dejó precipitar 14 h a 4°C. Los precipitados de

RNA se lavaron con etanol absoluto, al 90% y al 80%. La concentración total de RNA se determinó por la absorbancia a 260 nm y la calidad se verificó por electroforesis en geles desnaturalizantes de agarosa. Las células de los nódulos linfáticos mesentéricos (NLM) de hámsteres control se estimularon con PMA-ionomicina (Sigma). Después de 24 h, las células se cosecharon y se almacenaron en Trizol. El RNA de los NLM fue usado como control positivo en los ensayos de RT-PCR y para la realización de las curvas estándar. El RNA total fue tratado con 5 unidades de DNase I (Invitrogen, USA). Posteriormente, se realizó la transcripción reversa a cDNA con el kit SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen, USA) utilizando 5 µg de RNA total. Las secuencias de oligonucleótidos empleadas se encuentran descritas en el siguiente cuadro:

**Cuadro 1.** Sondas utilizadas para los ensayos de RT-PCR

Gen	Oligonucleótidos	Tm °C	Tamaño del amplicon (pb)
HPRT	Sentido 5`-CATTATGGCCCTCTGTGTGCTGAAG-3` Antisentido 5`-GTTTTACCTTCAACAATCAAGACATTCTTTCC-3`	59.3 58	225
IFN-γ	Sentido 5`-GCCTTGAAGGACAACCAGGCC-3` Antisentido 5`-GGACGATTTCCACCCCAAAAC-3`	58.3 56.7	250
IL-12	Sentido 5`-GTAGCTCCTCTGATTCCCGGGC-3` Antisentido 5`-CTTGTGCTGGGCCTCCATCAC-3`	60.4 58.3	175
IL-4	Sentido 5`-CTGCCATCCTGCTCTGCCTTCTAG-3` Antisentido 5`-TCTTCAGGTCTTTGAGAACCCTGGAA-3`	60.8 58	275
IL-10	Sentido 5`-CTGCAGGACTTTAAGGGTACTTGGG-3` Antisentido 5`-GACGCCTTTCTCTTGGAGCTTATTAAG-3`	59.5 58.5	250

El análisis de la expresión relativa del mRNA se realizó utilizando el sistema LightCycler 480 (Roche) y con SYBR Green como técnica de detección. A la mezcla de reacción de PCR de 15 µl (LightCycler 480 SYBR Green I master, Roche) se le añadió 2 µl de cDNA y 5 pmol de la sonda sentido y antisentido. La reacción se llevó a cabo de la siguiente manera: un ciclo a 95°C 30 s y 50 ciclos de amplificación a 62°C 10 s para el alineamiento, 72°C por 10 s para la extensión y 95°C 10 s para la desnaturalización. Para IFN-γ la temperatura de alineamiento fue de 61°C, para IL-12 fue de 65°C y para IL-4 fue de 66°C. Después de la amplificación se realizaron curvas de disociación de 50°C a 95°C/

0.1°C con adquisición continua de fluorescencia. La eficiencia de la PCR se determinó para cada juego de oligonucleótidos a partir de la pendiente de la curva estándar, construida con diluciones seriadas del cDNA de interés. Las curvas de disociación indicaron la formación de un solo producto. Las diferencias en la expresión de los genes se calcularon con el método  $\Delta\Delta\text{Ct}$  (Livak and Schmittgen 2001). El cDNA de hámsteres inmunizados con el diluyente e inmunizados con TsCRT fue utilizado como muestra “de comparación” y muestra “problema” respectivamente. Los valores se corrigieron respecto a un gen control que en este caso fue HPRT generando un  $\Delta\text{Ct}$ . Los resultados se expresan como los grados de diferencia entre los valores  $\Delta\text{Ct}$  de la muestra “de comparación” y la muestra “problema”.

#### **6.8. Ensayos de proliferación linfocitaria en las células del bazo y los nódulos linfáticos mesentéricos (NLM)**

Para estos ensayos se utilizaron hámsteres de 9 meses de edad. Estos animales se inmunizaron pero no se retaron y fueron sacrificados una semana después de la última inmunización. Se inmunizaron con TsCRT + TC o con diluyente como grupo control. Durante el sacrificio se extrajo el bazo y los NLM en medio RPMI 1640 (Gibco, BRL). En condiciones de esterilidad, los órganos se maceraron en mallas de nylon con ayuda del émbolo de una jeringa. Se lavaron con 5 ml de RPMI, se centrifugaron a 1500 rpm 10 min. Las células recuperadas se resuspendieron en 1 ml de buffer de lisis ACK para lisar los eritrocitos. Se centrifugaron a 1500 rpm 10 min, se recuperó el precipitado y se contaron las células viables en un hematocitómetro por exclusión de azul tripan. Se sembraron  $3 \times 10^5$  células por pozo en triplicado en un volumen de 100  $\mu\text{l}$  en RPMI con 10% de suero bovino fetal (RPMIc) (Gibco, BRL) en placas de 96 pozos. En 100  $\mu\text{l}$  de RPMIc se adicionó TsCRT a una concentración final de 5 o 10  $\mu\text{g/ml}$ . Las células cultivadas sin tratamiento o con concanavalina A (Sigma) a 2  $\mu\text{g/ml}$  sirvieron como control negativo y positivo, respectivamente. Las células se incubaron a 37°C en una atmósfera de  $\text{CO}_2$  al 5% durante 3 días cuando el estímulo fue concanavalina A, o 5 días cuando fue TsCRT. Durante las últimas 18 h de cultivo se adicionó 1  $\mu\text{Ci/}$  pozo de [ $^3\text{H}$ ] timidina diluida en 20  $\mu\text{l}$  de RPMI. Las células se colectaron en filtros de fibra de vidrio y la cuantificación de la radioactividad

se realizó en un contador de centelleo. Los resultados se expresan como cuentas por minuto (cpm).

### **6.9. Análisis estadístico**

El análisis estadístico se realizó utilizando el programa GraphPad Prism 5. Los datos se analizaron por medio del test de Shapiro-Wilk para determinar su distribución normal. Dependiendo de la distribución de los datos, los resultados se analizaron por una prueba t de student para comparar entre dos grupos. La prueba de U de Mann-Whitney se utilizó para comparar las densidades ópticas en los ELISAs. Un valor de  $p < 0.05$  se consideró como diferencia estadísticamente significativa.

## 7. RESULTADOS

### 7.1. Modelo experimental para teniosis intestinal

#### Cisticercos

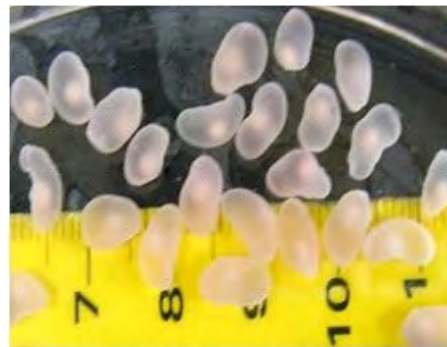
Durante el desarrollo de este proyecto se sacrificaron varios cerdos infectados de manera natural provenientes de diferentes regiones del país. En las necropsias, los cisticercos se midieron, se fotografiaron y por sus características macroscópicas se clasificaron en 2 grupos: algunos cerdos tenían parásitos rojizos de aproximadamente 1.5 cm de longitud con escolex y cuello desarrollados; otros tenían cisticercos blanquecinos, de alrededor de 0.5 cm de longitud y de escolex pequeño (Figura 5). Siempre antes de la infección se utilizaron algunos (5-10) cisticercos para valorar su viabilidad con base en la prueba de evaginación *in vitro* (Maravilla et al. 1998). Observaciones empíricas a lo largo de varios años han sugerido que el tamaño y el color de los cisticercos puede estar relacionado con el tiempo de infección: los más grandes y rojizos habrían estado más tiempo dentro del hospedero en comparación a los más pequeños y blanquecinos (Flisser A, comunicación personal).

#### Cisticercos Rojizos



Miden entre 1 y 1.5 cm  
Escolex y cuello visibles  
Color rojizo

#### Cisticercos Blanquecinos



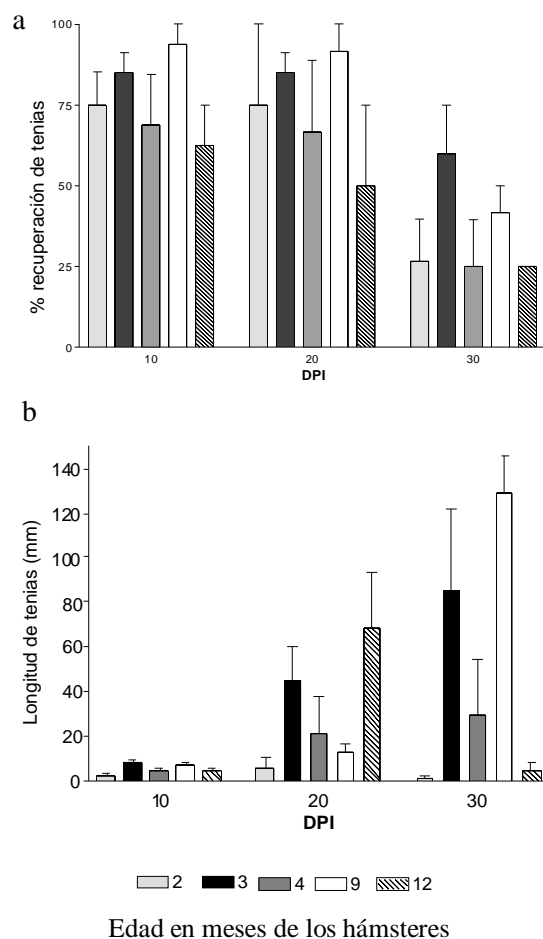
Miden entre 0.5 y 0.7 cm  
Escolex pequeño  
Color blanquecino o amarillento

**Figura 5.** Clases de cisticercos encontrados en cerdos infectados de manera natural  
Edad del hospedero y progreso de la infección

Con el objetivo de determinar las condiciones óptimas del modelo experimental de teniosis en el hámster dorado para así poder evaluar los efectos de la inmunización con TsCRT, se infectaron hámsteres de diferentes edades (2, 3, 4, 9 y 12 meses) con cisticercos rojizos obtenidos del mismo cerdo y se sacrificaron en diferentes días post infección (DPI). Los animales de todas las edades, tanto machos como hembras, fueron susceptibles a la infección por *T. solium* (Figura 6a) con porcentajes de recuperación que oscilaron entre el 60% y 95% a los 10 DPI. Sin embargo, el número de tenias recuperadas a los 10, 20 y 30 DPI fue mayor en los grupos de animales de 3 y 9 meses (85%-90%). Durante 30 días todos los animales permanecieron infectados con al menos un parásito, confirmando hallazgos anteriores que indican que el hámster es un modelo experimental adecuado para el desarrollo de la tenia adulta intestinal (Avila et al. 2006). No obstante, los porcentajes de recuperación disminuyeron después de los 20 DPI en todos los grupos. La disminución en el número de tenias a los 20 DPI se ha asociado a un aumento en el número de células caliciformes en el modelo de hámster, que es cuatro veces mayor que en los animales no infectados, así como el desarrollo de una respuesta inflamatoria en la mucosa que rodea a los escólices de las tenias (Avila et al. 2002). Por lo tanto, la evaluación de la protección en respuesta a la inmunización en el modelo experimental de teniosis en el hámster, debe llevarse a cabo antes de los 20 DPI, ya que en este tiempo inicia la expulsión de los parásitos de manera natural. En los animales de 2, 4 y 12 meses se encontraron los porcentajes de recuperación más bajos a los 30 DPI (25%).

El desarrollo de los parásitos se incrementó con el tiempo de la infección. La medición del tamaño de las tenias (Figura 6b) indicó que a los 10 DPI fueron pequeñas en todos los grupos, a partir de este día, empezaron a desarrollarse y se obtuvieron gusanos hasta de 166 mm a los 30 DPI en hámsteres de 3 meses. Sin embargo, este parámetro fue bastante variable ya que en el mismo animal pudieron desarrollarse algunas tenias de 4 mm y otras de 166 mm. En el grupo de animales de 2 meses de edad, los parásitos se desarrollaron muy poco y el gusano de mayor longitud fue de 18 mm. A pesar de la variabilidad, en los grupos de animales de 3 y 9 meses se encontraron las tenias de mayor longitud a los 30 DPI,  $85.1 \pm 81$  mm y  $129 \pm 28$  mm respectivamente. La variabilidad

podría explicarse debido al uso de hámsteres no singénicos y cisticercos provenientes de un cerdo infectado de manera natural. Aunque no hubo diferencias estadísticamente significativas, los grupos de 3 y 9 meses de edad tuvieron un mayor número de tenias a los 10, 20 y 30 DPI y en estos se desarrollaron las tenias de mayores tamaños, por ello fueron seleccionados para los ensayos de vacunación.



**Figura 6.** Infección con *T. solium* en hámsteres de diferentes edades. Porcentaje de recuperación de tenias a lo largo del tiempo después de la infección con 4 cisticercos por vía oral (a). Longitud de las tenias adultas encontradas en el intestino (b). Las barras representan el promedio + E.S. Los cisticercos utilizados en este experimento tuvieron más de un 95% de evaginación *in vitro* y fueron rojizos. Los hámsteres de 2, 4 y 9 meses de edad fueron machos y los de 3 y 12 meses fueron hembras. Se sacrificaron entre 3 y 5 animales de cada edad por día de infección.

Infecciones

Con el objetivo de evaluar las diferencias en la capacidad infectiva entre los dos tipos de cisticercos, se infectaron hámsteres hembras de 3 y 9 meses de edad con cisticercos rojizos o cisticercos blanquecinos y se sacrificaron a los 15-20 DPI en 7 experimentos independientes. Cuando los animales se infectaron con cisticercos rojizos, los porcentajes de recuperación de tenias fueron del 75% al 90%, por el contrario, cuando la infección se realizó con parásitos blanquecinos los porcentajes de recuperación fueron apenas del 25% al 27.5% independientemente de la edad del hospedero (Cuadro 1). En este estudio, todos los cisticercos que se utilizaron mostraron un 85% a 100% de evaginación que no estuvo relacionada con su capacidad de infección, como es el caso de los cisticercos blanquecinos. Nótese que aunque al retar con cisticercos rojizos los porcentajes de recuperación nunca alcanzaron el 100% todos los animales estuvieron infectados con al menos una tenia al momento del sacrificio. Es importante señalar que aunque el hámster no es el hospedero natural del estadio adulto de *T. solium*, el cisticerco puede transformarse en tenia, anclarse al intestino, desarrollarse y crecer algunos centímetros sin necesidad de inmunosuprimir al hámster. Estas características hacen que este modelo experimental sea útil para evaluar la protección inducida por la inmunización oral con TsCRT.

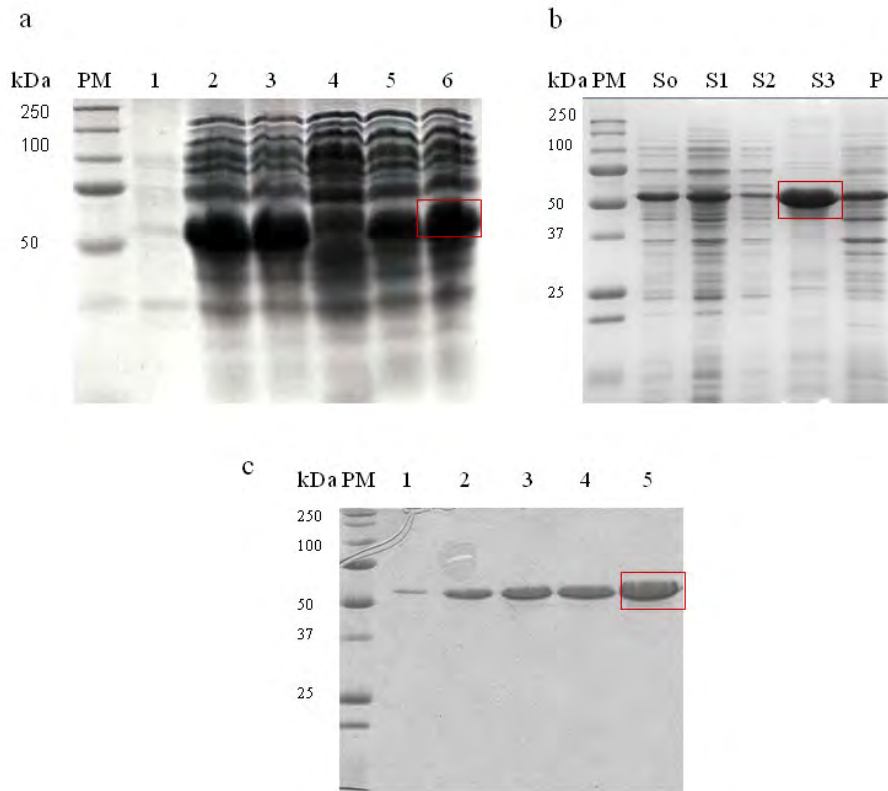
**Cuadro 1.** Recuperación de parásitos adultos de *T. solium* en hámsteres infectados con 4 cisticercos blanquecinos o rojizos a los 15-20 DPI.

Edad del hospedero	Tipo de cisticerco	Tenias recuperadas por hámster	# tenias/ # cisticercos	% recuperación
9	blanquecino	0,0,1,3	4/16	25
3	blanquecino	0,1,1,1,1,1,1,2,2	11/40	27.5
3 y 9	rojizo	3,3,3,3,4,4,4,4	28/32	87.5
9	rojizo	1,1,3,3,3,3,4,4,4,4	30/40	75
9	rojizo	2,2,3,4,4	15/20	75
9	rojizo	2,4,4,4,4	18/20	90
9	rojizo	2,4,4,4	14/16	87.5



## **7.2. Producción de TsCRT recombinante**

Se obtuvo el plásmido recombinante pET 23-a-CRT con resistencia a ampicilina que contiene el fragmento de cDNA que codifica para la TsCRT en suficiente cantidad para la secuenciación y subsiguiente transformación en un sistema de expresión. La secuenciación del plásmido mostró un 100% de identidad con el obtenido originalmente (Mendlovic et al. 2004). Para la expresión de la TsCRT se transformaron bacterias BL21 con el plásmido y se aislaron cinco clonas las cuales se indujeron con IPTG. Cuatro de las cinco clonas transformadas expresaron la TsCRT. Los resultados de la expresión se presentan en la Figura 7a. La TsCRT representa el componente principal del extracto de bacterias con un peso molecular aparente de 50 kDa.



**Figura 7.** Análisis por SDS-PAGE de la expresión de TsCRT en geles de poliacrilamida al 12% teñidos con azul de Coomassie. (a) Proteína total de 5 colonias de bacterias BL21 (carriles 2-6) transformadas con el plásmido recombinante pET23-aTsCRT y después de 4 horas de inducción con IPTG 1 mM. Solo la colonia 3 (carril 4) no expresó la proteína. (b) Extracción de la TsCRT, el cultivo de bacterias (S0) se lisó y se hicieron centrifugaciones diferenciales. Las fracciones solubles (S1, S2) se sonicaron para extraer las proteínas de membrana (S3) y el precipitado (P) se resuspendió para visualizar la eficiencia de la extracción. En el S3 se concentró la TsCRT con restos de algunas proteínas de la bacteria. (c) Diferentes concentraciones de TsCRT purificada por electroelución: 7  $\mu\text{g}$  (carril 1), 14  $\mu\text{g}$  (carril 2), 28  $\mu\text{g}$  (carril 3), 42  $\mu\text{g}$  (carril 4) y 56  $\mu\text{g}$  (carril 5). Pesos moleculares (PM)

Debido a que la mayor parte de la proteína se expresó en la fracción no soluble, se extrajo con facilidad por sonicación (Figura 7b). En el sobrenadante denominado S3 se observó una acumulación importante de la TsCRT la cual correspondió al 80% de proteínas totales al analizar el gel por densitometria. Con el objetivo de purificar aún más la TsCRT, la fracción S3 se sometió a electroelución. Después de la diálisis y de la eliminación de endotoxinas, al analizar las proteínas en geles de poliacrilamida se obtuvo una banda que correspondió al 96% de pureza (Figura 7c). Este método de purificación fue poco eficiente ya que tomó bastante tiempo y la cantidad de proteína que se obtuvo cada vez que se repitió el procedimiento fue poca, sin embargo, fue posible obtener la proteína pura y en cantidad suficiente para realizar los experimentos de inmunización.

### **7.3. Protección inducida por la inmunización oral con TsCRT**

Se realizaron 5 experimentos independientes para evaluar el efecto protector de la TsCRT, la edad del hospedero y el tipo de cisticercos utilizados al hacer el reto. En la mayoría de los experimentos se incluyeron de 8 a 10 animales por grupo, excepto en el primer y tercer experimento en donde se utilizaron 4 y 5 animales respectivamente. En el Cuadro 2 se muestran los resultados obtenidos.

**Cuadro 2.** Protección inducida contra el estadio adulto de *T. solium* por la vacunación oral con TsCRT.

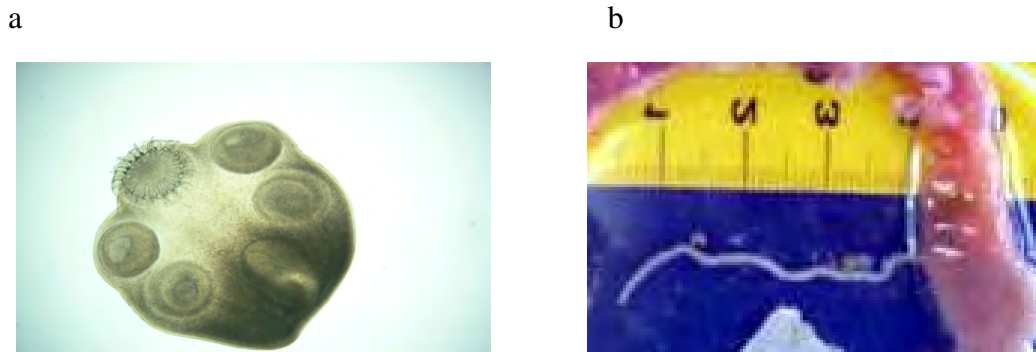
Vacuna	tenias / hamster	# de tenias/ # cisticercos	% protección	p
Experimento 1, hámsteres de 9 meses, cisticercos blanquecinos y pequeños				
TsCRT + TC	0,0,0,0	0/16	100	--
TsCRT	0,0,0,1	1/16	75	--
TC	0,1,2	3/12	0	--
Diluyente	0,0,1,3	4/16	--	--
Experimento 2, hámsteres de 9 meses, cisticercos rojizos y grandes				
TsCRT + TC	2,2,2,2,2,2,2,2	18/36	33	0.01*
TsCRT	0,1,1,2,2,2,2,3,3,3	19/40	36	0.02*
TC	1,2,2,2,3,3,3,3,4,4	27/40	1	--
Bacterias	0,3,3,3,3,4,4,4,4,4	32/40	0	--
Diluyente	1,1,3,3,3,3,4,4,4,4	30/40	--	--
Experimento 3, hámsteres de 9 meses, cisticercos rojizos y grandes				
TsCRT + CT	1,1,2,2,4	10/20	44	0.04
Diluyente	2,4,4,4,4	18/20	--	--
Experimento 4, hámsteres de 3 meses, cisticercos blanquecinos y pequeños				
TsCRT + TC	0,0,1,2,2,2,2,4,4	17/36	0	--
TC	0,0,0,0,0,1,3,4	8/32	9	--
Bacterias	0,1,2,2,2,3,3,3	16/32	0	--
Diluyente	0,1,1,1,1,1,1,1,2,2	11/40	--	--
Experimento 5, hámsteres de 3 meses, cisticercos rojizos y grandes				
TsCRT + TC	1,2,3,3,3,4,4,4,4,4	32/40	0	--
TC	2,3,3,3,3,3,3,4,4	28/36	0	--
Diluyente	2,2,2,2,2,3,4,4,4	25/36	--	--

\*Diferencias estadísticamente significativas respecto a los grupos control (ANOVA, seguido por t-Tukey)

Cuando los animales inmunizados oralmente con TsCRT + TC se retaron con los cisticercos blanquecinos, la protección fue hasta del 100% en los animales de 9 meses (experimento 1), sin embargo estos niveles de protección se observaron únicamente en este experimento, probablemente porque se utilizaron cisticercos blanquecinos y por lo tanto la eficiencia de infección fue menor. Adicionalmente, cuando el reto de los animales inmunizados se realizó con los cisticercos rojizos (experimentos 2 y 3) los porcentajes de protección fueron del 33% al 44%, encontrando diferencias significativas entre el número de tenias del grupo TsCRT + TC respecto al grupo inmunizado con el diluyente. La inmunización con TsCRT sin adyuvante también indujo una disminución en el número de parásitos aunque los resultados fueron más variables que al utilizar la TC (cuadro 2, experimento 3, Figura 9a). Los grupos inmunizados con TC, bacterias BL21 sin transfectar o diluyente tuvieron un número similar de tenias, que dependió del tipo de cisticerco usado durante el reto. Por el contrario, los animales de 3 meses inmunizados con TsCRT + TC (experimentos 4 y 5) no desarrollaron protección frente al reto con *T. solium* sin importar el tipo de cisticerco utilizado. Vale la pena resaltar que al retar con cisticercos blanquecinos los porcentajes de recuperación siempre fueron bajos, incluso en los grupos control. Esta característica de la infección en el modelo experimental debe tenerse en cuenta durante la evaluación de la protección.

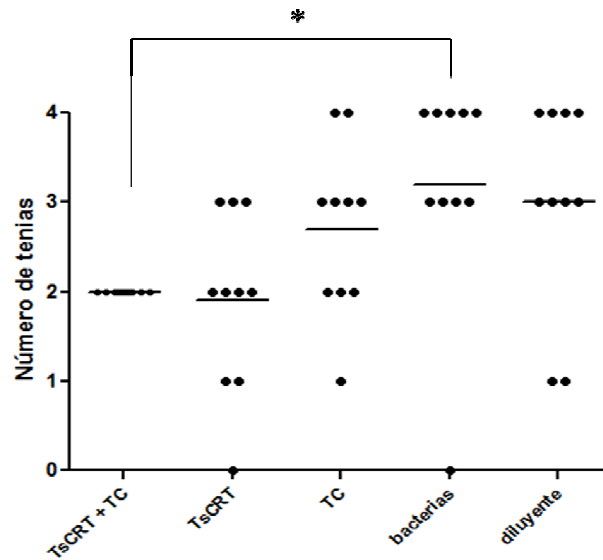
En general, los parásitos encontrados en los animales inmunizados con TsCRT+ TC o sin adyuvante, mostraron un escólex de apenas 2-3 mm de longitud anclado a la mucosa intestinal. Las tenias recuperadas de los grupos control, habitualmente midieron varios centímetros de longitud con un estróbilo bien desarrollado, aunque en algunos casos, por la variabilidad del modelo, también se detectaron tenias de 2 mm (Figura 8). Algunos autores sugieren que la respuesta inmune protectora contra los parásitos adultos intestinales se manifiesta no solo en una disminución en el número de parásitos, sino también en una reducción en tamaño, fecundidad y patología (Quinnell et al. 2004). Además, los escólex encontrados en los animales inmunizados con TsCRT+ TC o sin adyuvante, se encontraron localizados en una posición posterior respecto a los grupos control. Las tenias se ubicaron a los  $9.3 \pm 2.1$  cm en los animales inmunizados y a los  $7.2 \pm 1.3$  cm en los grupos control (Figura 9b). La localización posterior del parásito en el intestino del hospedero, se ha

relacionado con el desarrollo de una respuesta inmune protectora que induce un ambiente hostil para los gusanos en la mucosa (Wilkes et al. 2007). Por lo tanto la inmunización oral con TsCRT en hámsteres de 9 meses, indujo una reducción en el número de tenias adultas, inhibiendo su desarrollo y modificando su localización en el intestino.

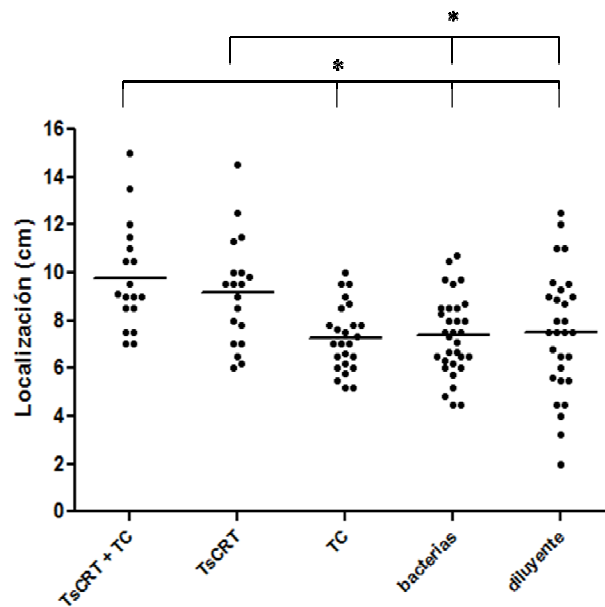


**Figura 8.** Parásito recuperado de un hámster inmunizado con TsCRT, no se observa el desarrollo del estróbilo, solo se distingue el escolex (a). Tenia de más de 4 cm de longitud recuperada de un hámster control (b).

a



b

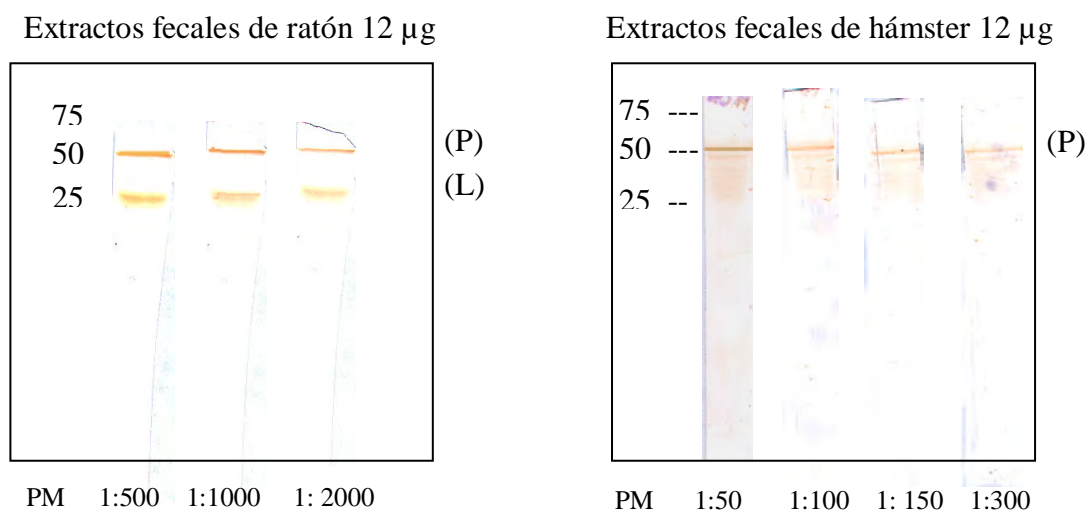


**Figura 9.** Efecto de la inmunización con diferentes tratamientos en el número de tenias (a) y su posición en el intestino (b) durante el experimento 2. Para determinar la localización se midió la distancia desde el píloro hasta donde se encontró anclada la tenia adulta. Las barras muestran los valores promedio. \*  $p < 0.05$  t de student.

#### 7.4. Evaluación de la respuesta inmune humoral

Identificación de anticuerpos IgA en heces de hámster.

Debido a la falta de reactivos comerciales para analizar la presencia de anticuerpos del tipo IgA en el hámster, se determinó si las inmunoglobulinas comerciales de ratón pueden servir para detectar estos anticuerpos en las heces del hámster. Se realizaron inmunoelectrotransferencias con los sobrenadantes obtenidos de las heces fecales y se sometieron a SDS-PAGE en condiciones reductoras para ser probados con el anti - IgA como se muestra en la Figura 10.



**Figura 10.** Reconocimiento de los extractos fecales de ratón y de hámster por el anticuerpo anti- IgA de ratón en diferentes diluciones acoplado a peroxidasa y analizado por western blot. (PM) pesos moleculares, (P) cadena pesada y (L) cadena ligera.

Como era de esperarse, el anti-IgA de ratón tuvo una reacción intensa con la cadena pesada y la ligera de la IgA con un peso de 52 kDa y 25 kDa respectivamente, en diluciones desde 1:500 hasta 1:2000. En el hámster, a estas diluciones no fue posible identificar ninguna banda, por esta razón se probaron diluciones desde 1:50 hasta 1:300 en donde se observó reacción con la banda de 52 kDa que corresponde a la cadena pesada de la IgA del hámster. Estos resultados son consistentes con estudios previos que sugieren que el anticuerpo anti-IgA de ratón es capaz de reconocer la cadena pesada de la IgA del hámster por lo que es un



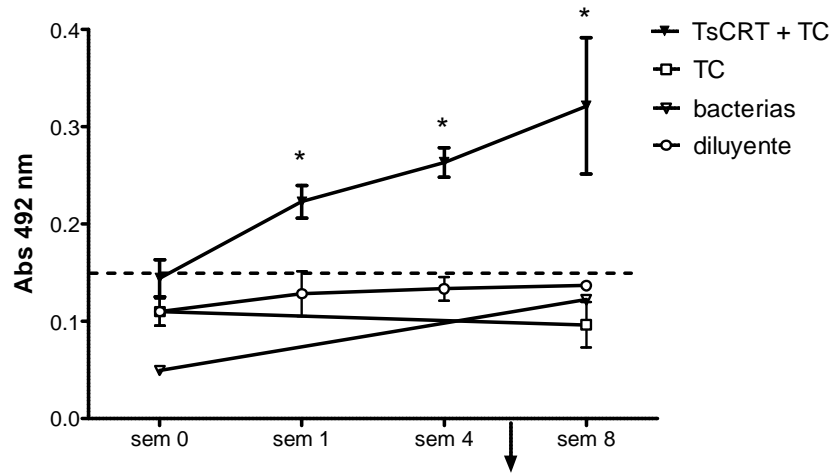
reactivo que puede ser utilizado para el análisis de las respuestas IgA en este modelo (Bungiro et al. 2008).

### ELISAs

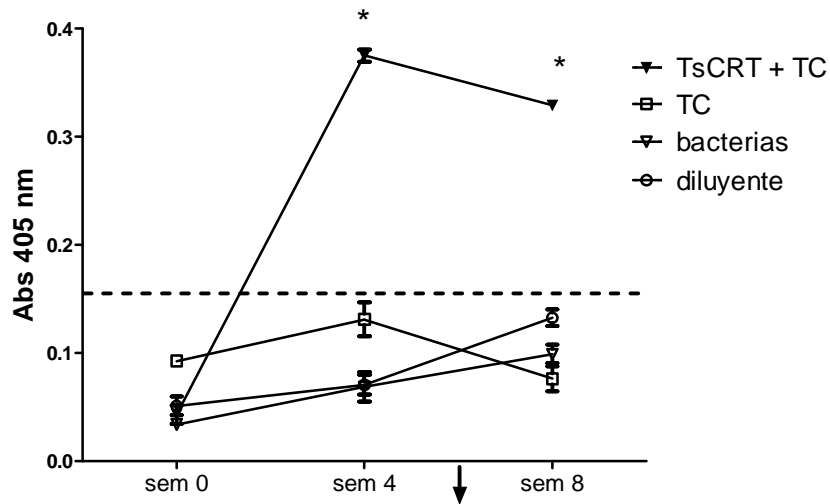
Con el propósito de analizar la respuesta de anticuerpos IgA específicos inducidos por la inmunización oral con TsCRT, se realizaron ELISAs utilizando extractos fecales de los hámsteres de 9 meses en donde se encontró protección. Los grupos de animales inmunizados con TsCRT + TC desarrollaron anticuerpos a partir de la segunda inmunización con un incremento significativo después del reto (Figura 11a). Por el contrario, ninguno de los animales inmunizados con CT, proteínas de bacterias sin transfectar o con el diluyente desarrolló anticuerpos.

En la Figura 11b, se observa que la inmunización oral también indujo la producción de anticuerpos IgG específicos detectados en suero después de cuatro inmunizaciones, la cual se mantuvo hasta el sacrificio. En los grupos control no se detectaron anticuerpos.

a



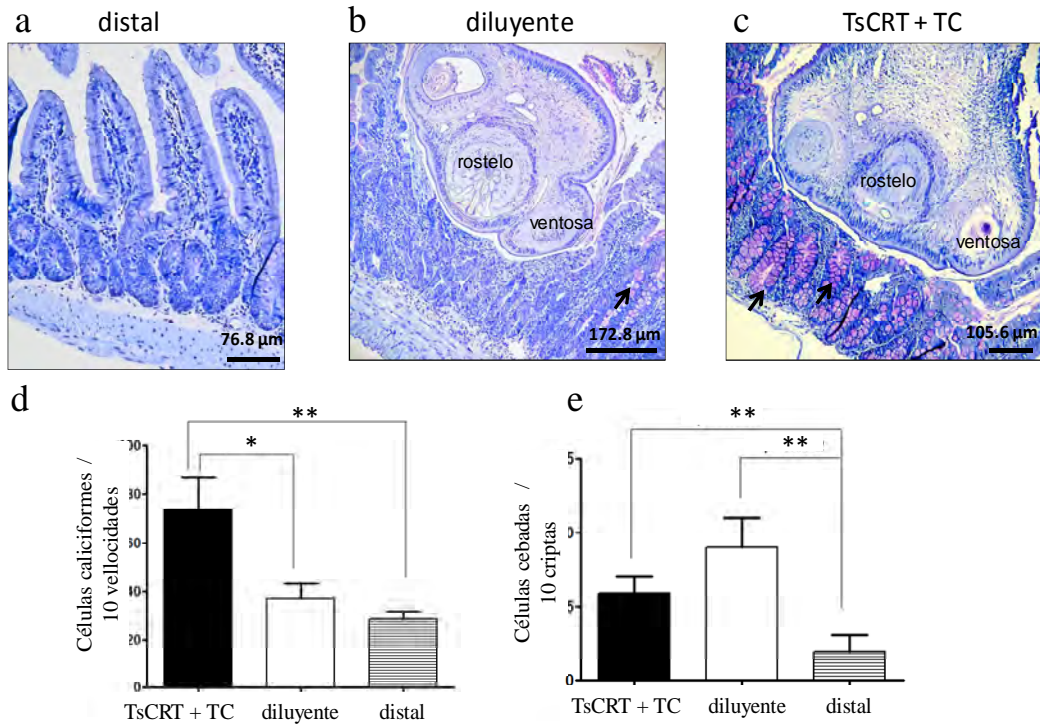
b



**Figura 11.** Respuesta de anticuerpos IgA (a) e IgG (b) específicos anti-TsCRT en hámsteres de 9 meses inmunizados con TsCRT + TC, TC, proteínas de bacterias BL21 o el diluyente. Las heces y los sueros fueron colectados antes de la primera inmunización (semana 0), después de 2 o 4 inmunizaciones (semanas 2 y 4) y durante el sacrificio (semana 8). La flecha negra representa el día del reto (semana 6). La línea punteada horizontal indica el punto de corte. \*  $p < 0.05$  U de Mann-Whitney.

### 7.5. Evaluación de la respuesta inmune en la zona de anclaje del parásito

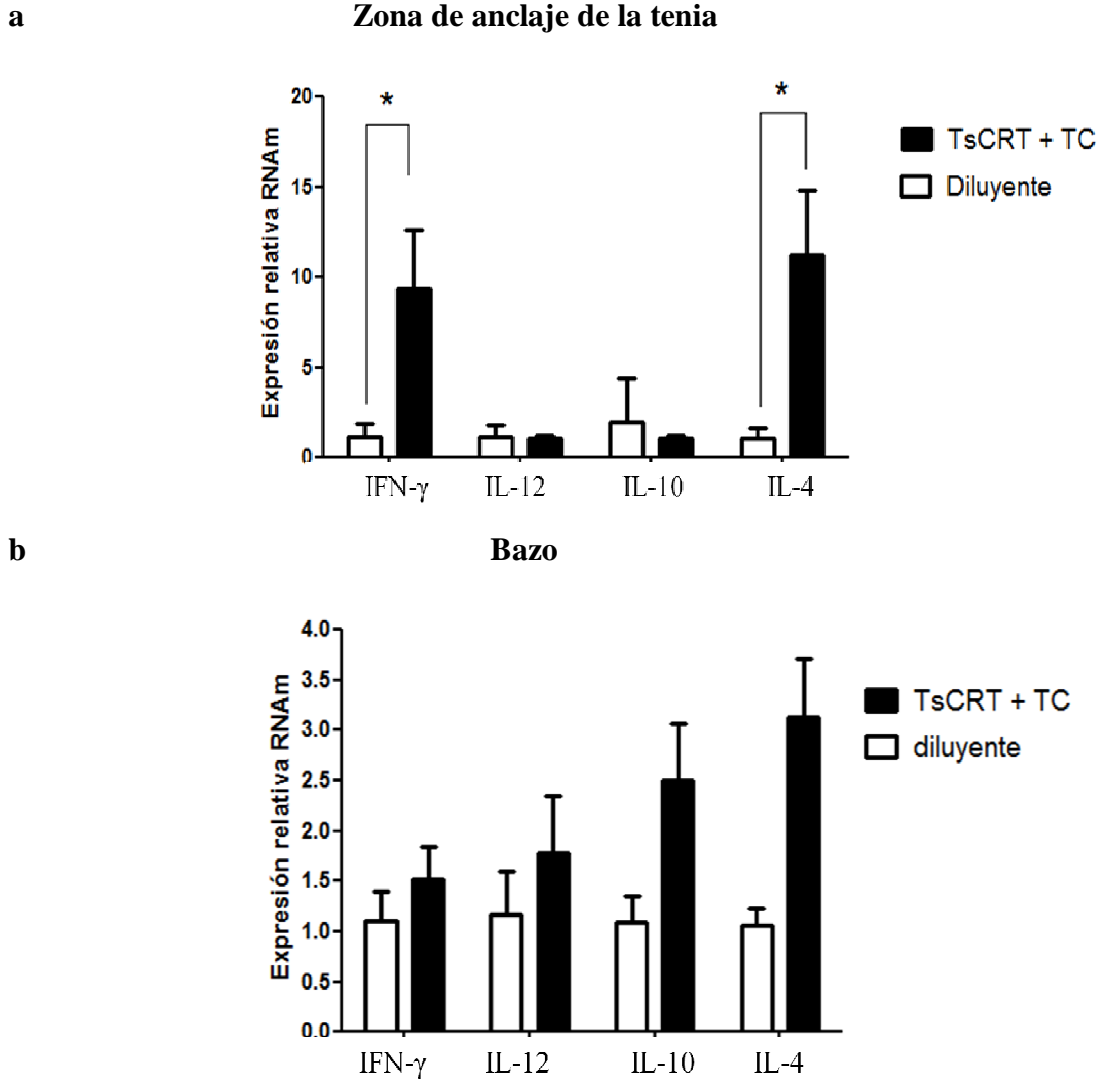
Para conocer si la inmunización oral con TsCRT + TC modifica la respuesta inmune en la mucosa, se cuantificó el número de células cebadas y caliciformes justo en la zona de anclaje de los parásitos que permanecieron en el intestino. Estas poblaciones celulares han sido ampliamente relacionadas con protección en contra de helmintos intestinales (Anthony et al. 2007). Como comparación, se utilizaron zonas distales del intestino que correspondieron a una parte de la mucosa en donde no se encontró el parásito. En la Figura 12a se observa que las zonas distales mantuvieron la estructura general del tracto gastrointestinal con vellocidades completas, alargadas, redondeadas y con pocas células cebadas y caliciformes. Por el contrario, en las zonas de anclaje de las tenias tanto de grupos control como inmunizados, se presentó la pérdida de la estructura de la mucosa y una alta producción de moco alrededor del parásito (Figura 12b y 12c). Además, se observó un incremento significativo en el número de las células caliciformes en el grupo que recibió la inmunización oral con TsCRT + TC respecto al grupo inmunizado con el diluyente ( $p < 0.04$ ). El número de células caliciformes y cebadas se presenta en la Figura 12d y 12e, respectivamente. La infiltración de las células cebadas en las zonas de anclaje de los parásitos de animales inmunizados con TsCRT + TC o diluyente incrementó de manera significativa en comparación a las zonas distales ( $p < 0.03$ ); sin embargo no se encontraron diferencias significativas al inmunizar con TsCRT + TC o diluyente.



**Figura 12.** Respuesta inmune en la zona de anclaje de *T. solium* en hámsteres de 9 meses inmunizados con TsCRT+TC o diluyente y retados con cuatro cisticercos. Infiltración celular en la zona distal (a) en la zona de anclaje de la tenia de un hámster inmunizado con el diluyente (b) y en un hamster inmunizado con TsCRT+ TC (c). Las ventosas y el rostelo de la tenia se pueden observar en las figuras b y c. Las flechas negras señalan las células caliciformes las cuales se observan de color lila. El número de las células caliciformes en 10 vellocidades  $\pm$  E.S (d) y el número de células cebadas en 10 criptas  $\pm$  E.S (e). \* $p < 0.04$ , \*\* $p < 0.03$  t de student.

### 7.6. Análisis de los cambios en la expresión de las citocinas en el hámster

Con el propósito de determinar si la inmunización oral con TsCRT + TC induce cambios en la expresión del mRNA de las citocinas IFN- $\gamma$ , IL-12, IL-10 e IL-4, el RNA extraído de las biopsias de las zonas de anclaje de las tenias se analizó por RT-PCR en tiempo real. Como se muestra en la Figura 13a, se detectó un incremento significativo en los niveles de IL-4 ( $p < 0.02$ ) e IFN- $\gamma$  ( $p < 0.05$ ) en la mucosa de los animales inmunizados con TsCRT + TC respecto al grupo control. Los niveles de IL-10 e IL-12 no cambiaron con la inmunización. Los cambios en la expresión de las citocinas a nivel sistémico inducidos por la inmunización oral, se evaluaron en las biopsias de los bazos obtenidas una semana después de la última inmunización. Aunque no se encontraron diferencias significativas, la expresión de IL-4 e IL-10 fue 3 y 2.5 veces mayor que en los animales que recibieron TsCRT + TC respecto al grupo control Figura 13b.



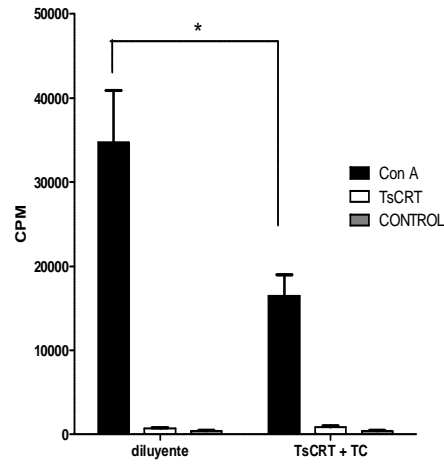
**Figura 13.** Cambios en la expresión de citocinas en respuesta a la inmunización con TsCRT. La expresión diferencial de los niveles de mRNA de IFN- $\gamma$ , IL-12, IL-10 e IL-4 relativa a la expresión del mRNA de HPRT, se analizó en la zona de anclaje de *T. solium* (a) y en el bazo (b) de los animales de 9 meses inmunizados con el diluyente o con TsCRT + TC en 4 ocasiones. Los resultados se expresan como las diferencias entre los valores  $\Delta C_t$  de los grupos “problema” (TsCRT) y “de comparación” (diluyente). Los datos representa el promedio  $\pm$  el E.S y son representativos de 2 experimentos independientes. \*  $p < 0.05$  t de student.

### **7.7. Proliferación linfocitaria en las células del bazo y los nódulos linfáticos mesentéricos (NLM) en respuesta a la inmunización**

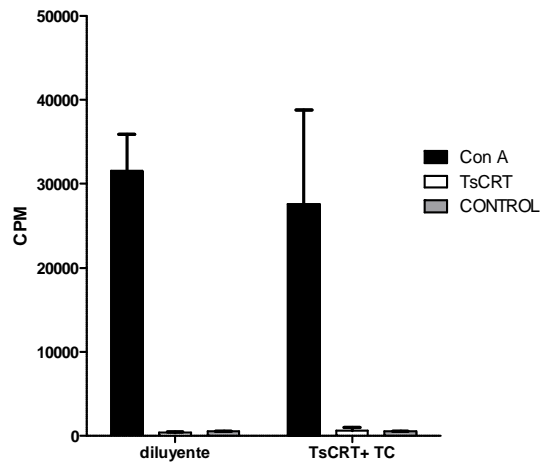
Con el objetivo de estudiar cambios en la respuesta inmune celular por efecto de la vacunación con TsCRT, se evaluó la capacidad proliferativa de linfocitos T obtenidos a partir de esplenocitos o NLM de los hámsteres de 9 meses, una semana después de la última inmunización. Los esplenocitos o las células de NLM de los animales inmunizados con TsCRT + TC no proliferaron en respuesta a la estimulación con ninguna dosis de TsCRT (5 o 10  $\mu\text{g}$ ) *in vitro*, a pesar de mantener el estímulo hasta cinco días. Los datos de la estimulación con 5  $\mu\text{g}$  se muestran en la figura 14a y 14b. Los grupos inmunizados con TC, bacterias sin transfectar o diluyente no proliferaron en respuesta a este estímulo. En los ensayos realizados con animales inmunizados y retados no se observó proliferación linfocitaria en respuesta a TsCRT.

Como era de esperarse, los linfocitos de los animales inmunizados y los grupos control proliferaron significativamente en respuesta a la concanavalina A, una proteína considerada como inductora de mitosis en estas células. Sin embargo, los valores con la estimulación de este mitógeno fueron significativamente más bajos en los esplenocitos de los hámsteres inmunizados con TsCRT + TC ( $p < 0.001$ ) como se observa en la figura 14a.

a



b



**Figura 14.** Respuesta proliferativa de células de bazo (a) o NLM (b) de animales de 9 meses inmunizados con TsCRT + TC o con el diluyente después de la estimulación *in vitro* con TsCRT 10 ug/ml, Con A 2 ug/ml o medio RPMI como control. La intensidad de la proliferación linfocitaria fue estimada por la incorporación de <sup>3</sup>H Timidina durante las últimas 18 h de cultivo. Los resultados se expresan como cuentas por minuto (cpm) +/- E.S. \* p < 0.05 t de student.



## 8. DISCUSIÓN

Aún en la actualidad, cerca de un tercio de la población mundial se encuentra infectada con una o más especies de helmintos. El mejoramiento en las condiciones de salubridad y la disponibilidad de agua potable contribuyen indiscutiblemente a detener la transmisión de estas enfermedades; sin embargo, debido a las dificultades socioeconómicas, principalmente en países en vías de desarrollo, parece no haber solución a corto plazo. La vacunación puede ser un mecanismo directo, útil para interrumpir la transmisión y controlar las enfermedades causadas por helmintos intestinales. No obstante, el desarrollo de vacunas tiene que superar varios obstáculos, como la falta de buenos modelos animales para parásitos que infectan a seres humanos y por ende la falta de conocimiento de la relación hospedero- parásito y de la dinámica de la infección. La teniosis es una enfermedad estrictamente humana de la cual se conocen pocos aspectos inmunológicos. Se sabe que las tenias viven en sus hospederos humanos por algún tiempo y se expulsan de manera espontánea, pero los mecanismos inmunes involucrados en este proceso aún son desconocidos.

Desde hace varios años se demostró que el hámster dorado es susceptible a la infección con cisticercos de *T. solium*, el tratamiento de animales con corticosteroides promueve la instalación y previene la expulsión temprana de las tenias (Maravilla et al. 1998). Sin embargo, son pocas las publicaciones que hacen referencia al ciclo infectivo de *T. solium* en animales no inmunosuprimidos (Maravilla et al. 1998; Avila et al. 2002; Cruz-Revilla et al. 2006), punto clave para la utilización del modelo experimental en la evaluación de una vacuna. Durante este trabajo se demostró que hámsteres de todas las edades y de ambos sexos son apropiados para la infección con *T. solium* sin necesidad de inmunosupresión. A pesar de ello, el éxito de la infección parece estar determinado por la clase de cisticercos que se utilice para hacer el reto. Se ha demostrado que existe una gran variabilidad en la capacidad que tienen los cisticercos obtenidos de diferentes cerdos infectados de manera natural de transformarse en tenias (García et al. 2001); sugiriendo que no todos los cerdos infectados y quizás no todos los cisticercos dentro del mismo cerdo participan en la transmisión. Durante el desarrollo de este proyecto se sacrificaron varios

cerdos y se identificaron dos clases principales de cisticercos: blanquecinos y rojizos. No existen reportes que indiquen una relación entre el tamaño o el color de los cisticercos con su tiempo de desarrollo en el cerdo. A pesar de ello, observaciones empíricas a lo largo de varios años, sugieren que los cisticercos rojizos podrían llevar más tiempo infectando al cerdo debido a su tamaño y color, tal vez asociado con la incorporación de hemoglobina del hospedero, lo cual podría estar relacionado con su mayor capacidad infectiva (Flisser A, comunicación personal). Por el contrario, los cisticercos blanquecinos pueden ser producto de una infección reciente. Todos los grupos de cisticercos utilizados durante este proyecto tuvieron porcentajes de evaginación mayores del 90%, lo cual no estuvo relacionado con los porcentajes de infección obtenidos. Hasta la fecha, la evaluación de la evaginación *in vitro* ha sido un parámetro ampliamente utilizado que nos permitió darnos una idea de la viabilidad de los cisticercos, pero al parecer este parámetro no es suficiente para determinar la habilidad de un cisticerco de transformarse en tenia en el intestino. Esta variabilidad en la eficiencia de infección es un punto clave en la estandarización del modelo experimental y por ende en su utilización para la evaluación de una vacuna contra teniosis.

La vacunación exitosa contra helmintos intestinales se ha considerado difícil de lograr (Lightowlers 2006). En la actualidad no existe ninguna vacuna de uso humano contra helmintiasis y la mayoría de los aspectos inmunológicos en la relación hospedero-parásito son desconocidos. Debido a que el intestino es el sitio inicial donde ocurre la presentación de antígenos durante la infección por *T. solium* adulta, la estimulación directa del tejido linfóide asociado a la mucosa intestinal por la administración oral de antígenos, puede resultar una vía adecuada para inducir una respuesta inmune protectora. En este proyecto, la inmunización oral con TsCRT con TC como adyuvante indujo una disminución en el número de parásitos adultos en el intestino que estuvo relacionada con la edad del hámster y con el tipo de cisticerco utilizado durante el reto. Esta es la primera vez que se busca la asociación de la infección por un cisticerco con sus características morfológicas. Cuando se emplearon cisticercos rojizos, la disminución en el número de tenias en el intestino fue del 33% al 44% en los animales inmunizados, sugiriendo una vez más que estos parásitos tienen una mayor capacidad infectiva. Cuando el reto de los animales inmunizados se realizó con los cisticercos blanquecinos, los porcentajes de infección fueron muy bajos,

incluso en los grupos control. Por lo tanto, la inmunización oral con TsCRT es capaz de inducir un nivel significativo de protección cuando el reto se hace con cisticercos con una alta capacidad infectiva.

Varios reportes de inmunización de mamíferos contra helmintos intestinales indican que es posible conferir protección con antígenos recombinantes aunque los resultados varían considerablemente (Geldhof et al. 2007); por ejemplo, al inmunizar perros con las proteínas Ac-APR-1 y Ac-CP-2 de *Ancylostoma caninum* se obtiene una disminución del 32% y el 85% respectivamente, en el número de parásitos adultos encontrados en el intestino, así como una reducción significativa en la producción de huevos después del reto con *A. caninum* (Pearson et al. 2009). La inmunización de ratones con tetraspaninas que son proteínas integrales de membrana de *Schistosoma mansoni*, induce una reducción del 32% al 64% en el número promedio de gusanos adultos y una disminución del 69% en el conteo de huevos en las heces (Tran et al. 2006). Aunque en nuestro modelo experimental no fue posible determinar la producción de huevos por parte del parásito adulto debido a que no se desarrolla a gravidez en los hámsteres, la disminución en el tamaño de las tenias encontradas en los animales inmunizados, sugiere que puede ser producto de una respuesta inmune que interfiere con el desarrollo de los parásitos. Se sabe que la reducción en el tamaño de los parásitos intestinales, así como en las tasas de fecundidad y finalmente su expulsión, son consecuencia de la inmunidad protectora contra helmintos gastrointestinales (Onah and Nawa 2000). En *Strongyloides ratti* y *Trichinella spiralis* la respuesta inmune del hospedero se manifiesta en una reducción del tamaño del parásito adulto, disminución en la fecundidad y la adopción de una posición posterior en el intestino del hospedero (Kennedy 1980; Kennedy and Bruce 1981; Wilkes et al. 2007). Además, se ha sugerido que cuando los parásitos intestinales se encuentran bajo presión, son incapaces de mantener su posición en el intestino y se localizan en una posición posterior (Wilkes et al. 2007). En el caso de *T. solium*, la disminución en el número y en el tamaño de los parásitos y el cambio de la posición en el intestino después de la inmunización con TsCRT, sugiere que la vacunación está induciendo una respuesta inmune protectora contra el parásito que culmina con la falta de desarrollo de la tenia o su expulsión.

Se ha demostrado que la edad es un factor importante en el desarrollo de la respuesta inmune (Miller 1996), con consecuencias en las infecciones por parásitos. El hecho de que los hámsteres de 3 meses de edad no desarrollaron protección después de la inmunización con TsCRT, sugiere que las respuestas inmunológicas están relacionadas con la edad. Por ejemplo, los monos Rhesus jóvenes tienen una menor producción de anticuerpos IgG, IgM e IgA específicos después de la infección con *Schistosoma mansoni*, así como, una menor producción de las citocinas IL-4 e IL-5 en comparación con los adultos, sugiriendo que los animales jóvenes tienen una capacidad menor de producir citocinas de tipo 2 las cuales son importantes para la resolución de esta infección (Fallon et al. 2003). Aunque no se conocen bien las diferencias en la respuesta inmune en hámsteres de edades distintas, la cinética de la infección con *Leishmania donovani* y la producción de anticuerpos específicos, cambia en hámsteres jóvenes y adultos (Singh et al. 2007). Esto sugiere que las diferencias en protección que encontramos con la inmunización con TsCRT entre los animales de 3 y 9 meses, pueden deberse a que los hámsteres más jóvenes no desarrollan la respuesta inmune requerida para provocar la expulsión de los parásitos, sin embargo, la respuesta inmune con relación a la edad no se analizó durante el desarrollo de este proyecto.

En este trabajo se evaluó la respuesta inmune inducida por la inmunización oral con TsCRT en los hámsteres de 9 meses. Se demostró, que el tratamiento con TsCRT tiene efecto sobre la producción local de citocinas modulando la respuesta inmune humoral y celular en el intestino. Se observó un incremento en la transcripción del mRNA para las citocinas IL-4 e IFN- $\gamma$  en la mucosa de los animales inmunizados. El incremento en los niveles de IL-4 es consistente con reportes previos que demuestran la habilidad de la CRT de algunos parásitos de inducir la producción de citocinas de tipo Th2 (Rzepecka et al. 2006). Estudios anteriores en el laboratorio, han demostrado que las células de los nódulos linfáticos mesentéricos de los ratones inmunizados oralmente con TsCRT producen IL-4 e IL-5 en respuesta a la estimulación *in vitro* con esta proteína, sugiriendo un perfil de tipo Th2 (Fonseca-Coronado et al. 2011). Sin embargo, durante este proyecto se detectó un incremento de IFN- $\gamma$  en la mucosa de los animales inmunizados con TsCRT, mostrando la expresión tanto de citocinas Th1 como Th2. Las citocinas IFN- $\gamma$ , IL-4 e IL-13 han sido

detectadas en la mucosa de los hámsteres infectados con *T. solium* en el momento de la expulsión de los parásitos (Avila et al. 2008), sugiriendo que tienen un papel importante en protección. La inmunización oral con TsCRT puede estar reforzando la producción de estas citocinas a nivel local. Este es el primer reporte que muestra los cambios en la expresión de las citocinas en la zona de anclaje de los parásitos en el intestino en respuesta a la inmunización con CRT.

Durante la expulsión de *T. solium* los hámsteres infectados presentan un incremento en el número de las células caliciformes así como en la producción de moco en las zonas de anclaje de las tenias (Avila et al. 2002). Además, la presencia de las células caliciformes y la producción de mucinas se ha relacionado con la expulsión de *Nippostrongylus brasiliensis*, *Trichuris muris* e *Hymenolepis diminuta* (Horii et al. 1993; Nawa et al. 1994; Artis et al. 2004; Webb et al. 2007). Existen evidencias que indican que la proteína RELM $\beta$  secretada por las células caliciformes, es capaz de unirse al sistema quimiosensorial de algunos nematodos afectando su función (Artis et al. 2004). Un resultado interesante de este proyecto, fue que la inmunización oral con TsCRT indujo un incremento significativo en el número de las células caliciformes en las zonas de anclaje de los parásitos. El incremento en los niveles de IL-4 en la mucosa de los animales inmunizados con TsCRT, sugiere que la inmunización con esta proteína puede inducir la producción de citocinas Th2 que estimulan la hiperplasia de las células caliciformes y la producción de moco favoreciendo la expulsión de las tenias. La IL-4 a su vez, podría estar estimulando a células de origen no linfocítico como las del músculo liso intestinal, células epiteliales y macrófagos alternativamente activados promoviendo un entorno hostil para los parásitos en el intestino.

A pesar de que las células cebadas cumplen un papel importante en la inmunidad protectora frente algunos parásitos (Betts and Else 1999; Knight et al. 2008), no se encontraron diferencias significativas en el número de células cebadas en la zona de anclaje de las tenias entre los animales inmunizados y los grupos control. Estudios anteriores en el laboratorio, han demostrado la hiperplasia de células cebadas y caliciformes así como la secreción de histamina en la mucosa de jerbos infectados con *T. solium*. Por el contrario, los hámsteres infectados no desarrollan mastocitosis aunque se detecta hiperplasia de

células caliciformes en el momento de la expulsión de las tenias (Avila et al. 2002), sugiriendo que las células cebadas no son determinantes para la eliminación de estos parásitos en el hámster. Algunos autores han sugerido que la expulsión de nematodos intestinales puede llevarse a cabo a través de mecanismos dependientes o independientes de las células cebadas (Maizels and Holland 1998). Por ejemplo, un incremento en la expresión de IL-9 una citocina que activa a las células cebadas y aumenta la producción de IgE en ratones infectados con *Trichinella spiralis*, permite la eliminación más rápida de los parásitos. Además, la mastocitosis y la expulsión de *T. spiralis* es bloqueada al administrar anticuerpos contra el receptor Kit, lo cual impide la maduración de las células cebadas, estableciendo una relación directa entre estas células y la expulsión del parásito (Faulkner et al. 1997). Por otra parte, ratones genéticamente deficientes en IL-13 infectados con *N. brasiliensis*, no presentan hiperplasia de células caliciformes ni producción de mucinas ocasionando un retraso en la eliminación de los parásitos (McKenzie et al. 1998). En cestodos como *H. diminuta*, se ha demostrado que ratones deficientes en el activador de la transcripción 6 (STAT-6) presentan una disminución en la respuesta de células caliciformes y en la producción de mucinas, lo cual está asociado con un mayor número de parásitos en el intestino (McKay and Khan 2003). Sin embargo, se necesitan estudios más detallados para determinar diferencias en la activación de las células cebadas entre los animales inmunizados con TsCRT y los grupos control, que nos permitan esclarecer el papel de estas células en la protección contra *T. solium*.

La respuesta inmune de las mucosas es generalmente débil frente a la administración oral de los antígenos solubles, lo cual hace que se requieran dosis frecuentes algunas veces resultando en tolerancia sistémica (Holmgren et al. 2003). Varios estudios han demostrado que la combinación de antígenos con la toxina colérica puede facilitar la inducción de la respuesta inmune a nivel de mucosas, incrementar la presentación de antígenos y la secreción de citocinas, así como promover el cambio de isotipo hacia IgA (deVos and Dick 1993; Jackson et al. 1993). Durante este estudio, la vacunación oral estimuló de manera eficiente la producción de anticuerpos IgA a nivel de la mucosa. Debido a que la TsCRT se expresa en las células subtegumentarias y musculares de las ventosas y el róstelo de la tenia, este antígeno puede ser un blanco adecuado para los

anticuerpos de tipo IgA. A pesar de que aún no se ha establecido la importancia que tienen los anticuerpos de tipo IgA específicos contra la tenia en protección, nuestros datos sugieren que estos anticuerpos podrían actuar en combinación con otros componentes de la respuesta inmune de mucosas, como la hiperplasia de las células caliciformes, generando un ambiente desfavorable para el mantenimiento de los parásitos en el intestino.

Otro aspecto interesante de los resultados obtenidos, fue la falta de proliferación antígeno- específica de los esplenocitos obtenidos de hámsteres inmunizados con TsCRT pese a la presencia de anticuerpos IgG e IgA específicos. Esta disminución en la respuesta proliferativa, ha sido documentada en ratones BALB/c tratados con la cistatina recombinante de *Litomosoides sigmodontis*, una molécula inmunomoduladora secretada por ciertos nematodos, en donde las células del bazo de los animales tratados no proliferan de manera antígeno-específica a pesar de producir anticuerpos específicos contra esta proteína (Pfaff et al. 2002). Una explicación posible, es la habilidad de ciertas cistatinas de interferir con la presentación y el procesamiento de antígenos por parte de las células presentadoras de antígeno (APC) (Hartmann and Lucius 2003). En algunas helmintiasis, la CRT se ha relacionado con la modulación de la respuesta inmune (Rzepecka et al. 2006; Suchitra et al. 2008; Rzepecka et al. 2009; Fonseca-Coronado et al. 2011). Además, se ha reportado que la CRT de *Heligmosomoides polygyrus* es capaz de unirse a los receptores de tipo carroñero en la superficie de las células dendríticas, sugiriendo que esta proteína podría interferir con la entrada y la presentación de antígenos (Rzepecka et al. 2009). En el presente trabajo se determinó que la inmunización con TsCRT disminuye la proliferación de esplenocitos en respuesta a concanavalina A, sugiriendo la capacidad inmunomoduladora de esta proteína. Algunas proteínas secretadas por nematodos, son capaces de inhibir la proliferación de linfocitos T y B ya que pueden interferir con las señales de transducción de las proteínas-cinasas que permiten la activación celular (Harnett et al. 1999), demostrando que productos secretados por helmintos pueden obstaculizar las señales de transducción en células inmunes. Podemos sugerir que la TsCRT podría actuar de manera similar. Sin embargo, se necesitan estudios adicionales para determinar como la TsCRT interactúa con APC, desencadena vías de señalización en las células inmunes y su relación con linfocitos T y B.

## 9. CONCLUSIONES

Una alternativa para el control de la neurocisticercosis, enfermedad que constituye un problema de salud pública en países en vías de desarrollo de todos los continentes, es evitar la teniosis, que es la infección por el parásito adulto que se alberga exclusivamente en el ser humano. La vacunación en contra de la tenia adulta podría prevenir la dispersión de miles de huevos, los que, una vez ingeridos por seres humanos y por cerdos, se transforman en cisticercos. Nuestros hallazgos indican que es posible conferir protección contra el estadio adulto de *T. solium* a través de la inmunización oral con TsCRT en el modelo experimental de teniosis en el hámster dorado. Sin duda un avance importante para detener la transmisión teniasis/cisticercosis. Durante este proyecto, se determinaron las características del modelo experimental de teniosis intestinal en el hámster dorado, en donde se establecieron relaciones entre las características morfológicas de los cisticercos y su capacidad de transformarse en tenias. Este aspecto resulta importante ya que el nivel de protección inducido por la vacunación estuvo relacionado con el tipo de cisticerco ingerido. Además, la protección no solo se manifestó como una reducción en el número de parásitos, sino también en la disminución del tamaño de las tenias y los cambios en la posición de estas a nivel intestinal, lo cual sugiere que la inmunización oral con TsCRT induce una respuesta inmune que interfiere con el desarrollo de los parásitos adultos. El análisis de la respuesta inmune a nematodos ha sido objeto de cuantiosos estudios tanto en humanos como en animales, sin embargo los detalles de la respuesta inmune a cestodos son menos conocidos. El hámster dorado es uno de los dos únicos roedores que permite el desarrollo de la fase adulta de *T. solium*. Aunque este modelo ha permitido realizar varias investigaciones en aspectos inmunológicos e histológicos de la relación hospedero-parásito en teniosis, presenta la limitante de contar con pocos reactivos inmunológicos comerciales, lo cual ha restringido el estudio detallado de la respuesta inmunológica en esta especie. Sin embargo, a pesar de estas limitaciones fue posible demostrar que los hámsteres producen una respuesta inmune específica a la inmunización oral con TsCRT. Nuestros resultados demuestran que la inmunización con TsCRT regula la producción local de citocinas estimulando la síntesis de IgA que, junto con la activación de las células caliciformes y la producción de mucinas, puede resultar en un ambiente poco favorable para los parásitos afectando su desarrollo y finalmente promoviendo la expulsión de manera más rápida que



en condiciones naturales. Sin embargo, se requieren estudios adicionales para identificar otras células efectoras involucradas en la protección inducida con TsCRT, en particular el estudio de las células productoras de IFN- $\gamma$  e IL-4 con el objeto de esclarecer los pasos iniciales en la activación de la respuesta inmune. Sin duda, entender estos mecanismos puede ser útil en el desarrollo de vacunas orales o agentes terapéuticos. La evidencia experimental presentada en este proyecto, resalta el hecho de que la utilización de vacunas orales para prevenir la teniosis intestinal es posible, e invita a la búsqueda de mejores adyuvantes y sistemas de liberación de antígenos que permitan el desarrollo de vacunas más efectivas.

## 10. ANEXOS

### Artículos publicados:

Leon-Cabrera, S., M. Cruz-Rivera, F. Mendlovic, G. Avila-Ramirez, J. C. Carrero, J.P.Laclette and A. Flisser (2009). "Standardization of an experimental model of human taeniosis for oral vaccination." *Methods* 49(4): 346-350.

Flisser, A., G. Avila, P. Maravilla, F. Mendlovic, S. Leon-Cabrera, M. Cruz-Rivera, A. Garza, B. Gomez, L. Aguilar, N. Teran, S. Velasco, M. Benitez and D. E. Jimenez-Gonzalez (2010). "Taenia solium: current understanding of laboratory animal models of taeniosis." *Parasitology* 137(3): 347-357.

Leon-Cabrera S (2011). Respuesta Protectora Inducida por la Calreticulina de *Taenia Solium*. *Biomédica. XV Congreso Colombiano de Parasitología y Medicina Tropical*. 31 (sup.3): 3-315.

### Artículos en revisión:

Leon-Cabrera, S., M. Cruz-Rivera, F. Mendlovic, G. Avila-Ramirez, M. Romero-Valdovinos, G. Vaughan and A. Flisser (2011). "*Taenia solium* calreticulin oral immunization regulates intestinal and systemic humoral and cellular immune responses in an experimental model of taeniosis". En preparación.

Leon-Cabrera, S and A. Flisser (2011). Are basophils important mediators for helminth-induced Th2 immune responses? A debate. *Journal of Biomedicine and Biothecnology*. En revisión.

**Premios:**

Keystone Symposia Global Health Travel Award 2009. Otorgado por la fundación Bill & Melinda Gates. Keystone Simposia. Pathogenesis and Immune Regulation in Helminth Infections. Febrero 1-5. Tahoe City, California. USA.

Travel Grant. 2010. Otorgado por National Foundation for Infectious Diseases. The Thirteenth Annual Conference on Vaccine Research. Abril 26-28. Bethesda, MD. USA

## 11. REFERENCIAS

- Allan, J. C., G. Avila, J. Garcia Noval, A. Flisser and P. S. Craig (1990). "Immunodiagnosis of taeniasis by coproantigen detection." *Parasitology* 101 Pt 3: 473-477.
- Allan, J. C., M. Velasquez-Tohom, C. Fletes, R. Torres-Alvarez, G. Lopez-Virula, P. Yurrita, H. Soto de Alfaro, A. Rivera and J. Garcia-Noval (1997). "Mass chemotherapy for intestinal *Taenia solium* infection: effect on prevalence in humans and pigs." *Trans R Soc Trop Med Hyg* 91(5): 595-598.
- Allen, J. E. and R. M. Maizels (2011). "Diversity and dialogue in immunity to helminths." *Nat Rev Immunol* 11(6): 375-388.
- Anthony, R. M., L. I. Rutitzky, J. F. Urban, Jr., M. J. Stadecker and W. C. Gause (2007). "Protective immune mechanisms in helminth infection." *Nat Rev Immunol* 7(12): 975-987.
- Artis, D., M. L. Wang, S. A. Keilbaugh, W. He, M. Brenes, G. P. Swain, P. A. Knight, D. D. Donaldson, M. A. Lazar, H. R. Miller, G. A. Schad, P. Scott and G. D. Wu (2004). "RELMbeta/FIZZ2 is a goblet cell-specific immune-effector molecule in the gastrointestinal tract." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(37): 13596-13600.
- Avila, G., L. Aguilar, S. Benitez, L. Yepez-Mulia, I. Lavenat and A. Flisser (2002). "Inflammatory responses in the intestinal mucosa of gerbils and hamsters experimentally infected with the adult stage of *Taenia solium*." *Int J Parasitol* 32(10): 1301-1308.
- Avila, G., L. Aguilar, M. Romero-Valdovinos, F. Garcia-Vazquez and A. Flisser (2008). "Cytokine response in the intestinal mucosa of hamsters infected with *Taenia solium*." *Ann N Y Acad Sci* 1149: 170-173.
- Avila, G., M. Benitez, L. Aguilar-Vega and A. Flisser (2003). "Kinetics of *Taenia solium* antibodies and antigens in experimental taeniosis." *Parasitol Res* 89(4): 284-289.
- Avila, G., N. Teran, L. Aguilar-Vega, P. Maravilla, P. Mata-Miranda and A. Flisser (2006). "Laboratory animal models for human *Taenia solium*." *Parasitol Int* 55 Suppl: S99-S103.
- Betts, C. J. and K. J. Else (1999). "Mast cells, eosinophils and antibody-mediated cellular cytotoxicity are not critical in resistance to *Trichuris muris*." *Parasite Immunol* 21(1): 45-52.
- Boa, M., S. Mukaratirwa, A. L. Willingham and M. V. Johansen (2003). "Regional action plan for combating *Taenia solium* cysticercosis/taeniosis in Eastern and Southern Africa." *Acta Trop* 87(1): 183-186.
- Bungiro, R. D., Jr., T. Sun, L. M. Harrison, C. B. Shoemaker and M. Cappello (2008). "Mucosal antibody responses in experimental hookworm infection." *Parasite Immunol* 30(5): 293-303.
- Cabezón, C., G. Cabrera, R. Paredes, A. Ferreira and N. Galanti (2008). "Echinococcus granulosus calreticulin: molecular characterization and hydatid cyst localization." *Mol Immunol* 45(5): 1431-1438.
- Cliffe, L. J., N. E. Humphreys, T. E. Lane, C. S. Potten, C. Booth and R. K. Grencis (2005). "Accelerated intestinal epithelial cell turnover: a new mechanism of parasite expulsion." *Science* 308(5727): 1463-1465.

- Cruz-Revilla, C., A. Toledo, G. Rosas, M. Huerta, I. Flores-Perez, N. Pena, J. Morales, J. Cisneros-Quinones, G. Meneses, A. Diaz-Orea, N. Anciant, F. Goldbaum, A. Aluja, C. Larralde, G. Fragoso and E. Sciutto (2006). "Effective protection against experimental *Taenia solium* tapeworm infection in hamsters by primo-infection and by vaccination with recombinant or synthetic heterologous antigens." *J Parasitol* 92(4): 864-867.
- deVos, T. and T. A. Dick (1993). "Trichinella spiralis: the effect of oral immunization and the adjuvancy of cholera toxin on the mucosal and systemic immune response of mice." *Exp Parasitol* 76(2): 182-191.
- El Gengehi, N., R. El Ridi, N. A. Tawab, M. El Demellawy and B. L. Mangold (2000). "A *Schistosoma mansoni* 62-kDa band is identified as an irradiated vaccine T-cell antigen and characterized as calreticulin." *J Parasitol* 86(5): 993-1000.
- Fallon, P. G., J. Gibbons, R. A. Vervenne, E. J. Richardson, A. J. Fulford, S. Kiarie, R. F. Sturrock, P. S. Coulson, A. M. Deelder, J. A. Langermans, A. W. Thomas and D. W. Dunne (2003). "Juvenile rhesus monkeys have lower type 2 cytokine responses than adults after primary infection with *Schistosoma mansoni*." *J Infect Dis* 187(6): 939-945.
- Fan, P. C., W. C. Chung and A. Ito (2004). "Immunization of rodents against *Hymenolepis* infections using non-viable homologous oncospheres." *Kaohsiung J Med Sci* 20(12): 575-579.
- Faulkner, H., N. Humphreys, J. C. Renauld, J. Van Snick and R. Grecis (1997). "Interleukin-9 is involved in host protective immunity to intestinal nematode infection." *Eur J Immunol* 27(10): 2536-2540.
- Fleury, A., Flisser, A., Flores-Rivera, J. and Corona, T (2009). Parasitic infections. 13. *Taenia solium*. Post-Infectious Sequelae and Long-Term Consequences of Infectious Diseases. J. L. Smith, Brogden, K. A. and Fratamico, P. USA, American Society for Microbiology Press: 229 - 243.
- Flisser, A. (1994). Taeniasis and cysticercosis due to *Taenia solium*. *Progress in Clinical Parasitology*. T. S. ed. Boca Raton FLA, CRC Press Inc. 4: 77 - 116.
- Flisser, A. (2002). Cestode Zoonoses: Echinococcosis and cysticercosis an emergent and global problem. *Epidemiological studies of taeniosis and cisticercosis in Latin America*. C. P. a. P. Z. Amsterdam, IOS Press. 341: 3-11.
- Flisser, A. (2006). *Epidemiología. Cisticercosis : guía para profesionales de la salud*. S. d. S. Biblioteca de la Salud, Fundación Mexicana para la Salud, and I. N. d. S. P. y. F. d. C. Económico. Mexico, D.F., Fondo de Cultura Económica: 87-97.
- Flisser, A., C. G. Gauci, A. Zoli, J. Martinez-Ocana, A. Garza-Rodriguez, J. L. Dominguez-Alpizar, P. Maravilla, R. Rodriguez-Canul, G. Avila, L. Aguilar-Vega, C. Kyngdon, S. Geerts and M. W. Lightowlers (2004). "Induction of protection against porcine cysticercosis by vaccination with recombinant oncosphere antigens." *Infect Immun* 72(9): 5292-5297.
- Flisser, A., I. Madrazo, A. Plancarte, P. Schantz, J. Allan, P. Craig and E. Sarti (1993). "Neurological symptoms in occult neurocysticercosis after single taeniocidal dose of praziquantel." *Lancet* 342(8873): 748.
- Flisser, A., R. Rodriguez-Canul and A. L. Willingham, 3rd (2006). "Control of the taeniosis/cysticercosis complex: future developments." *Vet Parasitol* 139(4): 283-292.

- Flisser, A., A. Vazquez-Mendoza, J. Martinez-Ocana, E. Gomez-Colin, R. S. Leyva and R. Medina-Santillan (2005). "Short report: evaluation of a self-detection tool for tapeworm carriers for use in public health." *Am J Trop Med Hyg* 72(5): 510-512.
- Fonseca-Coronado, S., K. Ruiz-Tovar, M. Perez-Tapia, F. Mendlovic and A. Flisser (2011). "Taenia solium: immune response against oral or systemic immunization with purified recombinant calreticulin in mice." *Exp Parasitol* 127(1): 313-317.
- Garcia, G., E. Sciutto, G. Fragoso, C. Cruz-Revilla, A. Toledo, N. Villalobos, I. Flores, A. Aluja, M. V. Jose and C. Larralde (2001). "Inhibitory role of antibodies in the development of Taenia solium and Taenia crassiceps toward reproductive and pathogenic stages." *J Parasitol* 87(3): 582-586.
- Garcia, H. H., C. A. Evans, T. E. Nash, O. M. Takayanagui, A. C. White, Jr., D. Botero, V. Rajshekhar, V. C. Tsang, P. M. Schantz, J. C. Allan, A. Flisser, D. Correa, E. Sarti, J. S. Friedland, S. M. Martinez, A. E. Gonzalez, R. H. Gilman and O. H. Del Brutto (2002). "Current consensus guidelines for treatment of neurocysticercosis." *Clin Microbiol Rev* 15(4): 747-756.
- Garcia, H. H., R. H. Gilman, A. E. Gonzalez, R. Pacheco, M. Verastegui and V. C. Tsang (1999). "Human and porcine Taenia solium infection in a village in the highlands of Cusco, Peru. The Cysticercosis Working Group in Peru." *Acta Trop* 73(1): 31-36.
- Garcia, H. H., R. H. Gilman, A. E. Gonzalez, M. Verastegui, S. Rodriguez, C. Gavidia, V. C. Tsang, N. Falcon, A. G. Lescano, L. H. Moulton, T. Bernal and M. Tovar (2003). "Hyperendemic human and porcine Taenia solium infection in Peru." *Am J Trop Med Hyg* 68(3): 268-275.
- Garcia, H. H., A. E. Gonzalez, C. A. Evans and R. H. Gilman (2003). "Taenia solium cysticercosis." *Lancet* 362(9383): 547-556.
- Garcia, H. H., A. E. Gonzalez, R. H. Gilman, L. H. Moulton, M. Verastegui, S. Rodriguez, C. Gavidia and V. C. Tsang (2006). "Combined human and porcine mass chemotherapy for the control of T. solium." *Am J Trop Med Hyg* 74(5): 850-855.
- Geldhof, P., V. De Maere, J. Vercruyssen and E. Claerebout (2007). "Recombinant expression systems: the obstacle to helminth vaccines?" *Trends Parasitol* 23(11): 527-532.
- Gilman, R. H., O. H. Del Brutto, H. H. Garcia and M. Martinez (2000). "Prevalence of taeniosis among patients with neurocysticercosis is related to severity of infection. The Cysticercosis Working Group in Peru." *Neurology* 55(7): 1062.
- Gonzalez, A. E., C. G. Gauci, D. Barber, R. H. Gilman, V. C. Tsang, H. H. Garcia, M. Verastegui and M. W. Lightowlers (2005). "Vaccination of pigs to control human neurocysticercosis." *Am J Trop Med Hyg* 72(6): 837-839.
- Goud, G. N., B. Zhan, K. Ghosh, A. Loukas, J. Hawdon, A. Dobardzic, V. Deumic, S. Liu, R. Dobardzic, B. C. Zook, Q. Jin, Y. Liu, L. Hoffman, S. Chung-Debose, R. Patel, S. Mendez and P. J. Hotez (2004). "Cloning, yeast expression, isolation, and vaccine testing of recombinant Ancylostoma-secreted protein (ASP)-1 and ASP-2 from Ancylostoma ceylanicum." *J Infect Dis* 189(5): 919-929.
- Guo, Y. J., S. H. Sun, Y. Zhang, Z. H. Chen, K. Y. Wang, L. Huang, S. Zhang, H. Y. Zhang, Q. M. Wang, D. Wu and W. J. Zhu (2004). "Protection of pigs against Taenia solium cysticercosis using recombinant antigen or in combination with DNA vaccine." *Vaccine* 22(29-30): 3841-3847.

- Harnett, W., M. R. Deehan, K. M. Houston and M. M. Harnett (1999). "Immunomodulatory properties of a phosphorylcholine-containing secreted filarial glycoprotein." *Parasite Immunol* 21(12): 601-608.
- Hartmann, S. and R. Lucius (2003). "Modulation of host immune responses by nematode cystatins." *Int J Parasitol* 33(11): 1291-1302.
- Herd, R. P., R. J. Chappel and D. Biddell (1975). "Immunization of dogs against *Echinococcus granulosus* using worm secretory antigens." *Int J Parasitol* 5(4): 395-399.
- Holmgren, J., C. Czerkinsky, K. Eriksson and A. Mharandi (2003). "Mucosal immunisation and adjuvants: a brief overview of recent advances and challenges." *Vaccine* 21 Suppl 2: S89-95.
- Horii, Y., A. I. Khan and Y. Nawa (1993). "Persistent infection of *Strongyloides venezuelensis* and normal expulsion of *Nippostrongylus brasiliensis* in Mongolian gerbils, *Meriones unguiculatus*, with reference to the cellular responses in the intestinal mucosa." *Parasite Immunol* 15(3): 175-179.
- Huerta, M., A. S. de Aluja, G. Fragoso, A. Toledo, N. Villalobos, M. Hernandez, G. Gevorkian, G. Acero, A. Diaz, I. Alvarez, R. Avila, C. Beltran, G. Garcia, J. J. Martinez, C. Larralde and E. Sciutto (2001). "Synthetic peptide vaccine against *Taenia solium* pig cysticercosis: successful vaccination in a controlled field trial in rural Mexico." *Vaccine* 20(1-2): 262-266.
- Ishikawa, N., Y. Horii, T. Oinuma, T. Sukanuma and Y. Nawa (1994). "Goblet cell mucins as the selective barrier for the intestinal helminths: T-cell-independent alteration of goblet cell mucins by immunologically 'damaged' *Nippostrongylus brasiliensis* worms and its significance on the challenge infection with homologous and heterologous parasites." *Immunology* 81(3): 480-486.
- Jackson, R. J., K. Fujihashi, J. Xu-Amano, H. Kiyono, C. O. Elson and J. R. McGhee (1993). "Optimizing oral vaccines: induction of systemic and mucosal B-cell and antibody responses to tetanus toxoid by use of cholera toxin as an adjuvant." *Infect Immun* 61(10): 4272-4279.
- Kandil, O. M. and H. A. Abou-Zeina (2005). "Effect of parenteral vitamin E and selenium supplementation on immune status of dogs vaccinated with subunit and somatic antigens against *Taenia hydatigena*." *J Egypt Soc Parasitol* 35(2): 537-550.
- Kasper, G., A. Brown, M. Eberl, L. Vallar, N. Kieffer, C. Berry, K. Girdwood, P. Eggleton, R. Quinnell and D. I. Pritchard (2001). "A calreticulin-like molecule from the human hookworm *Necator americanus* interacts with C1q and the cytoplasmic signalling domains of some integrins." *Parasite Immunol* 23(3): 141-152.
- Kennedy, M. W. (1980). "Effects of the host immune response on the longevity, fecundity and position in the intestine of *Trichinella spiralis* in mice." *Parasitology* 80(1): 49-60.
- Kennedy, M. W. and R. G. Bruce (1981). "Reversibility of the effects of the host immune response on the intestinal phase of *Trichinella spiralis* in the mouse, following transplantation to a new host." *Parasitology* 82(1): 39-48.
- Khalife, J., R. J. Pierce, C. Godin and A. Capron (1993). "Cloning and sequencing of the gene encoding *Schistosoma mansoni* calreticulin." *Mol Biochem Parasitol* 62(2): 313-315.

- Knight, P. A., J. K. Brown and A. D. Pemberton (2008). "Innate immune response mechanisms in the intestinal epithelium: potential roles for mast cells and goblet cells in the expulsion of adult *Trichinella spiralis*." *Parasitology* 135(6): 655-670.
- Larralde, C., E. Sciutto (2006). El control de la *Taenia solium* en México, quinientos años después de su llegada al nuevo mundo. Cisticercosis: Guía para profesionales de la salud. C. L. a. A. S. d. Aluja. México, D.F, Biblioteca de Salud, Fondo de Cultura Económica, Secretaría de Salubridad: 182-230.
- Lightowers, M. W. (2006). "Vaccines against cysticercosis and hydatidosis: foundations in taeniid cestode immunology." *Parasitol Int* 55 Suppl: S39-43.
- Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." *Methods* 25(4): 402-408.
- Maizels, R. M. and M. J. Holland (1998). "Parasite immunology: pathways for expelling intestinal helminths." *Curr Biol* 8(20): R711-714.
- Manoutcharian, K., A. Diaz-Orea, G. Gevorkian, G. Fragoso, G. Acero, E. Gonzalez, A. De Aluja, N. Villalobos, E. Gomez-Conde and E. Sciutto (2004). "Recombinant bacteriophage-based multiepitope vaccine against *Taenia solium* pig cysticercosis." *Vet Immunol Immunopathol* 99(1-2): 11-24.
- Maravilla, P., G. Avila, V. Cabrera, L. Aguilar and A. Flisser (1998). "Comparative development of *Taenia solium* in experimental models." *J Parasitol* 84(5): 882-886.
- McKay, D. M. and W. I. Khan (2003). "STAT-6 is an absolute requirement for murine rejection of *Hymenolepis diminuta*." *J Parasitol* 89(1): 188-189.
- McKenzie, G. J., A. Bancroft, R. K. Grencis and A. N. McKenzie (1998). "A distinct role for interleukin-13 in Th2-cell-mediated immune responses." *Curr Biol* 8(6): 339-342.
- Mendlovic, F., J. Carrillo-Farga, J. Torres, J. P. Laclette and A. Flisser (2006). "Differential expression of calreticulin in developmental stages of *Taenia solium*." *J Parasitol* 92(4): 789-795.
- Mendlovic, F., P. Ostoa-Saloma, C. F. Solis, J. Martinez-Ocana, A. Flisser and J. P. Laclette (2004). "Cloning, characterization, and functional expression of *Taenia solium* calreticulin." *J Parasitol* 90(4): 891-893.
- Merchant, M. T., L. Aguilar, G. Avila, L. Robert, A. Flisser and K. Willms (1998). "*Taenia solium*: description of the intestinal implantation sites in experimental hamster infections." *J Parasitol* 84(4): 681-685.
- Michalak, M., E. F. Corbett, N. Mesaeli, K. Nakamura and M. Opas (1999). "Calreticulin: one protein, one gene, many functions." *Biochem J* 344 Pt 2: 281-292.
- Michalak, M., R. E. Milner, K. Burns and M. Opas (1992). "Calreticulin." *Biochem J* 285 (Pt 3): 681-692.
- Miller, R. A. (1996). "The aging immune system: primer and prospectus." *Science* 273(5271): 70-74.
- Morgan, C., E. J. LaCourse, B. J. Rushbrook, D. Greetham, J. V. Hamilton, J. Barrett, K. Bailey and P. M. Brophy (2006). "Plasticity demonstrated in the proteome of a parasitic nematode within the intestine of different host strains." *Proteomics* 6(16): 4633-4645.
- Nakhasi, H. L., G. P. Pogue, R. C. Duncan, M. Joshi, C. D. Atreya, N. S. Lee and D. M. Dwyer (1998). "Implications of calreticulin function in parasite biology." *Parasitol Today* 14(4): 157-160.



- Nawa, Y., N. Ishikawa, K. Tsuchiya, Y. Horii, T. Abe, A. I. Khan, S. Bing, H. Itoh, H. Ide and F. Uchiyama (1994). "Selective effector mechanisms for the expulsion of intestinal helminths." *Parasite Immunol* 16(7): 333-338.
- Onah, D. N. and Y. Nawa (2000). "Mucosal immunity against parasitic gastrointestinal nematodes." *Korean J Parasitol* 38(4): 209-236.
- Paul, W. E. and J. Zhu (2010). "How are T(H)2-type immune responses initiated and amplified?" *Nat Rev Immunol* 10(4): 225-235.
- Pearson, M. S., J. M. Bethony, D. A. Pickering, L. M. de Oliveira, A. Jariwala, H. Santiago, A. P. Miles, B. Zhan, D. Jiang, N. Ranjit, J. Mulvenna, L. Tribolet, J. Plieskatt, T. Smith, M. E. Bottazzi, K. Jones, B. Keegan, P. J. Hotez and A. Loukas (2009). "An enzymatically inactivated hemoglobinase from *Necator americanus* induces neutralizing antibodies against multiple hookworm species and protects dogs against heterologous hookworm infection." *FASEB J* 23(9): 3007-3019.
- Petavy, A. F., C. Hormaeche, S. Lahmar, H. Ouhelli, A. Chabalgoity, T. Marchal, S. Azzouz, F. Schreiber, G. Alvite, M. E. Sarciron, D. Maskell, A. Esteves and G. Bosquet (2008). "An oral recombinant vaccine in dogs against *Echinococcus granulosus*, the causative agent of human hydatid disease: a pilot study." *PLoS Negl Trop Dis* 2(1): e125.
- Pfaff, A. W., H. Schulz-Key, P. T. Soboslay, D. W. Taylor, K. MacLennan and W. H. Hoffmann (2002). "Litomosoides sigmodontis cystatin acts as an immunomodulator during experimental filariasis." *Int J Parasitol* 32(2): 171-178.
- Pritchard, D. I., D. S. Hooi, A. Brown, M. J. Bockarie, R. Caddick and R. J. Quinnell (2007). "Basophil competence during hookworm (*Necator americanus*) infection." *Am J Trop Med Hyg* 77(5): 860-865.
- Quinnell, R. J., J. Bethony and D. I. Pritchard (2004). "The immunoepidemiology of human hookworm infection." *Parasite Immunol* 26(11-12): 443-454.
- Rokeach, L. A., P. A. Zimmerman and T. R. Unnasch (1994). "Epitopes of the *Onchocerca volvulus* RAL1 antigen, a member of the calreticulin family of proteins, recognized by sera from patients with onchocerciasis." *Infect Immun* 62(9): 3696-3704.
- Rzepecka, J., R. Lucius, M. Doligalska, S. Beck, S. Rausch and S. Hartmann (2006). "Screening for immunomodulatory proteins of the intestinal parasitic nematode *Heligmosomoides polygyrus*." *Parasite Immunol* 28(9): 463-472.
- Rzepecka, J., S. Rausch, C. Klotz, C. Schnoller, T. Kornprobst, J. Hagen, R. Ignatius, R. Lucius and S. Hartmann (2009). "Calreticulin from the intestinal nematode *Heligmosomoides polygyrus* is a Th2-skewing protein and interacts with murine scavenger receptor-A." *Mol Immunol* 46(6): 1109-1119.
- Sarti-Gutierrez, E. J., P. M. Schantz, R. Lara-Aguilera, H. Gomez Dandoy and A. Flisser (1988). "*Taenia solium* taeniasis and cysticercosis in a Mexican village." *Trop Med Parasitol* 39(3): 194-198.
- Sarti, E., A. Flisser, P. M. Schantz, M. Gleizer, M. Loya, A. Plancarte, G. Avila, J. Allan, P. Craig, M. Bronfman and P. Wijeyaratne (1997). "Development and evaluation of a health education intervention against *Taenia solium* in a rural community in Mexico." *Am J Trop Med Hyg* 56(2): 127-132.
- Sarti, E., P. M. Schantz, A. Plancarte, M. Wilson, I. O. Gutierrez, A. S. Lopez, J. Roberts and A. Flisser (1992). "Prevalence and risk factors for *Taenia solium* taeniasis and cysticercosis in humans and pigs in a village in Morelos, Mexico." *Am J Trop Med Hyg* 46(6): 677-685.

- Sarti, E., P. M. Schantz, A. Plancarte, M. Wilson, O. I. Gutierrez, J. Aguilera, J. Roberts and A. Flisser (1994). "Epidemiological investigation of *Taenia solium* taeniasis and cysticercosis in a rural village of Michoacan state, Mexico." *Trans R Soc Trop Med Hyg* 88(1): 49-52.
- Sciutto, E., J. Morales, J. J. Martinez, A. Toledo, M. N. Villalobos, C. Cruz-Revilla, G. Meneses, M. Hernandez, A. Diaz, L. F. Rodarte, G. Acero, G. Gevorkian, K. Manoutcharian, J. Paniagua, G. Fragoso, A. Fleury, R. Larralde, A. S. De Aluja and C. Larralde (2007). "Further evaluation of the synthetic peptide vaccine S3Pvac against *Taenia solium* cysticercosis in pigs in an endemic town of Mexico." *Parasitology* 134(Pt 1): 129-133.
- Sciutto, E., G. Rosas, C. Cruz-Revilla, A. Toledo, J. Cervantes, M. Hernandez, B. Hernandez, F. A. Goldbaum, A. S. de Aluja, G. Fragoso and C. Larralde (2007). "Renewed hope for a vaccine against the intestinal adult *Taenia solium*." *J Parasitol* 93(4): 824-831.
- Singh, N., M. Samant, S. K. Gupta, A. Kumar and A. Dube (2007). "Age-influenced population kinetics and immunological responses of *Leishmania donovani* in hamsters." *Parasitol Res* 101(4): 919-924.
- Suchitra, S., K. A. Anbu, D. K. Rathore, M. Mahawar, B. P. Singh and P. Joshi (2008). "*Haemonchus contortus* calreticulin binds to C-reactive protein of its host, a novel survival strategy of the parasite." *Parasite Immunol* 30(6-7): 371-374.
- Tran, M. H., M. S. Pearson, J. M. Bethony, D. J. Smyth, M. K. Jones, M. Duke, T. A. Don, D. P. McManus, R. Correa-Oliveira and A. Loukas (2006). "Tetraspanins on the surface of *Schistosoma mansoni* are protective antigens against schistosomiasis." *Nat Med* 12(7): 835-840.
- Uber, C. L., R. L. Roth and D. A. Levy (1980). "Expulsion of *Nippostrongylus brasiliensis* by mice deficient in mast cells." *Nature* 287(5779): 226-228.
- Webb, R. A., T. Hoque and S. Dimas (2007). "Expulsion of the gastrointestinal cestode, *Hymenolepis diminuta* by tolerant rats: evidence for mediation by a Th2 type immune enhanced goblet cell hyperplasia, increased mucin production and secretion." *Parasite Immunol* 29(1): 11-21.
- Wilkes, C. P., C. Bleay, S. Paterson and M. E. Viney (2007). "The immune response during a *Strongyloides ratti* infection of rats." *Parasite Immunol* 29(7): 339-346.
- Winter, J. A., O. R. Davies, A. P. Brown, M. C. Garnett, S. Stolnik and D. I. Pritchard (2005). "The assessment of hookworm calreticulin as a potential vaccine for necatoriasis." *Parasite Immunol* 27(4): 139-146.
- Wolstenholme, A. J., I. Fairweather, R. Prichard, G. von Samson-Himmelstjerna and N. C. Sangster (2004). "Drug resistance in veterinary helminths." *Trends Parasitol* 20(10): 469-476.
- Wu, L., Z. Diao, X. Deng, J. Gao, Z. Zhou, Y. Liu and Y. Wang (2005). "DNA vaccine against *Taenia solium* cysticercosis expressed as a modified hepatitis B virus core particle containing three epitopes shared by *Taenia crassiceps* and *Taenia solium*." *J Nanosci Nanotechnol* 5(8): 1204-1210.