

92



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

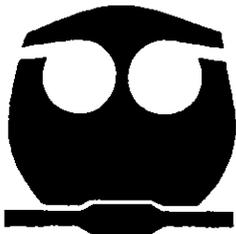
FACULTAD DE QUIMICA

“CLONACION Y CARACTERIZACION PARCIAL DEL eDNA QUE CODIFICA PARA LA PROTEINA DE SUPERFICIE GP2-3 DE LA LARVA DE Taenia solium”.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A :
TANYA PLETT TORRES



MEXICO, D.F.



283840

2000

SECRETARÍA DE PROFESIONES
FACULTAD DE QUIMICA



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado asignado:

Presidente	Prof. Oscar Velasco Castrejón
Vocal	Profra. Mireya Rodríguez Penagos
Secretario	Prof. Abraham Landa Piedra
1er sup.	Profra. Rosana Pelayo Camacho
2do sup.	Profra. Teresa de Jesús Olivera Flores

Sitio donde se desarrolló el tema:

Laboratorio de Biología Molecular de parásitos del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina. Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria. Este trabajo fue apoyado por el proyecto DGAPA (PAPIIT)-IN218198.

Asesor del tema:



Abraham Landa Piedra

Sustentante:



Tanya Plett Torres

You surely are,
a truly gifted kid,
but you're only as good as,
the last great thing you did...

If it's uphill all the way,
you should be used to it by now.

You must know me,
father is your son!,
and I know that you are proud
of everything I've done,
but is the one as I perform,
pulling rabbits out of hats,
when sometimes I'd prefer,
simply to wear them...

Paddy McAloon

DEDICATORIA

Dedico esta tesis con todo mi corazón a la memoria de mi padre, el Ing. Joseph Anton Plett Zauner, a quien se le tiene presente cada segundo del día y que seguramente es mi ángel de la guarda.

A mi madre, Antonia Torres Soto, por ser un ejemplo de fortaleza, honestidad y valentía.

A mi familia, en especial a los Del Valle y a las Torres, que siempre me han brindado su apoyo incondicional.

A Sheila, Isabel, Edurne y Alejandra, por su amistad en todo momento.

Al TGP (Rano, Martín, Raúl, Huesca, Texta, Mayeya, Ponchis, Ponch, Vikingo, Tata y Muégano), por ese primer semestre.

A Raúl, por los puentes y los ríos.

A Miguel, Alez, Gaby, Vero y Kikis, por ser excelentes compañeros, amigos y profesionistas.

A Diana, Marco, Aliesha, Mariana, Gina, Mike, Gus, Boby, Mayra, Helena, Jasso, Frida y Catalán, por hacer de la universidad algo muy divertido.

To The Williams School "fun department", for all the fun we had for three long years.

A Oscar, Alex, Ana, Alicia, Lucía, Norberto y Cuauhtémoc por sus sabios consejos, apoyo y buenos momentos durante mi estancia en el laboratorio.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Abraham Landa Piedra toda su paciencia, amistad, apoyo y sabiduría que lograron enrolarme en el mundo de la investigación científica.

Agradezco a la Biol. Ana Lilia Palma Cisneros y a la Biol. Alicia Ochoa Sánchez su excelente soporte técnico durante la realización de este trabajo.

Agradezco a la Biol. Lucía Jiménez, al Dr. Norberto Vibanco y al Dr. Agustín Plancarte por compartir su experiencia durante la elaboración de este trabajo.

Agradezco a todos los miembros del jurado por las sugerencias aportadas a este trabajo.

LISTA DE ABREVIATURAS

α -MMP	α -metil-D-manopiranosido
ADN	Ácido desoxiribonucleico
Con A	Concanavalina A
CPS	Examen coproparasitoscópico
EC	Extracto crudo
ECL	Extracto crudo de la larva de <i>T. solium</i>
ELISA	Ensayo inmunoenzimático
FGPS	Fracción de glicoproteínas afines a la Con A
FV	Fluido vesicular
GPS	Glicoproteínas
IEF	Inmunolectroforesis
IET	Inmunolectrotransferencia
IL-	Interleucina
LCA	Lectina de lenteja
LCR	Líquido cefalorraquídeo
LL-GPS	Glicoproteínas afines a la LCA
NCC	Neurocisticercosis
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPS	Organización Panamericana de la Salud
PI	Punto isoeléctrico
PCR	Reacción en Cadena de la Taq Polimerasa
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio

ÍNDICE

I.	Resumen	1
II.	Marco teórico	2
	1. Clasificación taxonómica de <i>Taenia solium</i>	2
	2. Morfología y ciclo biológico de <i>T. solium</i>	2
	3. Superficie del parásito	4
	4. Respuesta inmune del hospedero	8
	5. Mecanismos de evasión de la respuesta inmune	9
	6. Parasitosis causadas por <i>T. solium</i>	10
	7. Diagnóstico	11
	8. Tratamiento	18
	9. Vacunación de cerdos	20
	10. Epidemiología	20
	11. Impacto económico	22
	12. Prevención y control	23
III.	Justificación	25
IV.	Objetivos	26
V.	Materiales y métodos	27
VI.	Resultados	37
	1. Purificación de glicoproteínas del ECL	37
	2. Reacción cruzada entre GP2-3 y glicoproteínas diagnósticas de <i>T. solium</i>	38
	3. Evaluación del reconocimiento de la FGPS y de GP2-3 pura dado por sueros de humanos con NCC confirmada	40
	4. Especificidad de la FGPS y de GP2-3 pura (Reacciones cruzadas)	41
	5. Aislamiento y caracterización de las clonas que expresan a GP2 y/o GP3 recombinante	44
VII.	Discusión	47
VIII.	Bibliografía	54
IX.	Apéndice	73

I. RESUMEN

Las parasitosis humanas causadas por *Taenia solium* (teniosis/cisticercosis) son un problema de salud pública en México y en países en vías de desarrollo. La cisticercosis humana adquiere importancia cuando se establece en el sistema nervioso central, causando neurocisticercosis (NCC), ya que puede inhabilitar y poner en riesgo la vida del paciente. En contraste la teniosis, que es asintomática, convierte al hospedero definitivo (hombre) en un foco de infección para los que conviven con él.

Para el diagnóstico de la cisticercosis se han implementado todos los métodos disponibles, de los cuales, la tomografía axial computarizada (TAC) y el método serológico desarrollado por Víctor Tsang en 1989, han sido los más útiles a este respecto. Sin embargo, la TAC es poco accesible a la población debido a su alto costo y la prueba serológica, aunque es altamente sensible y específica con muestras hospitalarias, al ser aplicada a población abierta, el valor de estos parámetros disminuye.

En este estudio, se purificó una fracción de glicoproteínas (FGPS) por medio de Sefarosa 4B-Con A y se purificó a GP2-3 a partir de una fracción de proteínas de 100 kDa electroeluidas del extracto crudo de la larva de *T. solium* (ECL). Ambos antígenos, fueron confrontados por inmunoelectrotransferencia (IET) con sueros de personas con NCC confirmada y con sueros de personas con otras parasitosis. Los resultados indican, que la FGPS es 86 % sensible para el diagnóstico de cisticercosis humana y que el 72.2 % de los pacientes reconocen tanto a GP2-3 incluida en esta fracción y a GP2-3 pura. Asimismo, se observó que sueros de individuos con quiste hidatídico reconocen levemente a GP2-3, en comparación con sueros de pacientes con toxoplasmosis y loiosis, que no la reconocen. Por otro lado, utilizando anticuerpos anti-GP2-3, se aislaron 2 clones (112-3 y 111-3) de una biblioteca de cADN del parásito construida en el bacteriófago λ ZAP II, que expresan a Gp2 ó GP3 recombinante. Los análisis de la secuencia nucleotídica y de aminoácidos de la clona 111-3 indican que ésta codifica para una proteína de 20 kDa que contiene cuatro sitios de glicosilación y que no es similar a ninguna otra reportada.

II. MARCO TEÓRICO

1. Clasificación taxonómica de *Taenia solium*

Taenia solium es un parásito que, por sus características morfológicas, es clasificado taxonómicamente de la siguiente forma¹⁶⁷:

Reino	: Animalia
Subreino	: Metazoa
Phyllum	: Platyhelminthes
Clase	: Cestoidea
Subclase	: Cestoda
Orden	: Cyclophyllidea
Superfamilia	: Taenioidea
Familia	: Taeniidae
Género	: <i>Taenia</i>
Especie	: <i>solium</i>

2. Morfología y ciclo biológico de *T. solium*

La supervivencia de *T. solium* involucra al cerdo y al humano en las diversas etapas de su ciclo de vida. El humano actúa como hospedero definitivo (individuo teniosico) cuando alberga al gusano adulto después de ingerir carne de cerdo infectada con larvas viables del parásito. El cerdo parasitado actúa como hospedero intermediario, este se infecta al consumir heces de un teniosico que contienen huevos del parásito. Por otro lado, el humano también actúa como hospedero intermediario accidental, ya que puede desarrollar cisticercosis al ingerir los huevos del parásito¹⁶⁷ (Fig 1).

De esta forma, el foco de infección causante de la cisticercosis en el cerdo y en el humano es el individuo teniosico^{154, 32}. Éste, alberga a un gusano adulto que presenta una cabeza o escólex redondeado de 1 mm de diámetro que muestra cuatro ventosas y

una doble corona de 22 a 32 ganchos (rostelo), estructuras que utiliza para fijarse a la pared duodenal¹¹² (Fig 2 A). Inmediatamente debajo del escólex se encuentra el cuello, zona de donde parte el desarrollo del cuerpo o estróbilo del parásito¹¹³. Este último, mide de 2 a 7 m de largo y presenta segmentos llamados proglótidos que contienen órganos sexuales masculinos y femeninos, característica de un organismo hermafrodita. Cada proglótido, presenta testículos, un ovario trilobulado y un útero, de madurez relacionada con el sitio de su localización en el estróbilo. De esta forma, los proglótidos cercanos al cuello muestran órganos sexuales inmaduros, contrarios a los situados en la parte media del estróbilo, donde se muestran ya desarrollados (Fig 2 B). Por otro lado, los proglótidos situados al final del estróbilo se denominan grávidos y se encuentran repletos de huevos. Los proglótidos, llegan a presentar de 150 a 200 testículos y un útero con 7 a 10 ramificaciones donde se albergan hasta 60,000 huevos. Además, se desprenden espontáneamente del estróbilo y se arrojan de 4 a 5 diarios en heces donde se rompen para liberar a los huevos^{89,124}. Los huevos liberados son esféricos, miden de 30 a 40 μm de diámetro y son indistinguibles de los de *Taenia saginata* (Fig 2 C). Además, sobreviven a condiciones ambientales adversas ya que son resistentes a diversos agentes químicos y físicos. Están formados por una capa externa o vitelo, un embrióforo denso y una membrana embriofórica que rodean a la oncosfera o embrión hexacanto (3 pares de ganchos). Éste último, se activa con los jugos gástricos del hospedero que lo ingirió, eliminando a las estructuras que lo rodean⁴⁷. Asimismo, el embrión hexacanto ocupa sus 6 ganchos para fijarse al epitelio intestinal, para atravesarlo y para llegar al torrente sanguíneo, que lo transportará a cualquier tejido del hospedero. Así, cada embrión forma un cisticerco (larva) entre las 3 y 8 semanas de su llegada a ese sitio. El cisticerco usualmente se muestra como una vesícula de 0.5 a 1.5 cm de diámetro rellena de fluido, a través del cual, se observa un escólex idéntico al del gusano adulto (Fig 2 D). Dicho escólex, esta conectado a un canal espiral que tiene un poro excretor en contacto con el tejido circundante¹⁷⁸. Al mismo tiempo, el fluido vesicular (FV) que lo rodea presenta proteínas en suspensión, productos de excreción y secreción del parásito y componentes del suero del hospedero^{131, 178}. De esta forma, la morfología mencionada describe al cisticerco de tipo celuloso. El de tipo racemoso, por otro lado, es más grande y llega a medir hasta 10 cm

de diámetro, carece de escólex, muestra una vesícula en forma de racimo y solamente se ha encontrado en el cerebro del humano^{140, 141}.

Finalmente la larva, al ser ingerida por el hospedero definitivo, se activa con los jugos gástricos causando la evaginación del escólex para fijarse a la pared duodenal y, de esta forma, desarrollar un gusano adulto en 62 a 72 días, cerrando el ciclo biológico del parásito^{8, 89, 124}.

3. Superficie del parásito

Como los otros platelmintos, *T. solium* posee una superficie que consiste de un tegumento por donde se lleva a cabo el transporte de moléculas dentro y fuera del parásito, actividad que le permite alimentarse y secretar moléculas, ya que carece de aparato digestivo⁴³. El tegumento es una banda protoplásmica, continua y sincicial que presenta dos capas separadas por una lámina basal y células musculares. En la primera capa se encuentra un citoplasma formado por las células subtegumentales conectadas formando un sincicio. Éste, presenta una gran cantidad de vesículas con productos de secreción, de endocitosis y para la síntesis de diversas estructuras de la superficie parasitaria. Entre estas estructuras se encuentran las microtrícas, que son extensiones verticales y digitiformes del citoplasma distal que funcionan como barrera física contra las células del hospedero y amplían significativamente el área de absorción de nutrientes. Además, el citoplasma distal se encuentra rodeado por una membrana plasmática que, a su vez, se encuentra cubierta por el glucocáliz, una región abundante en glicoproteínas (GPS), glicolípidos y proteínas que intervienen en el equilibrio osmótico y de transporte de moléculas del parásito debido a su carácter aniónico^{89, 106}.

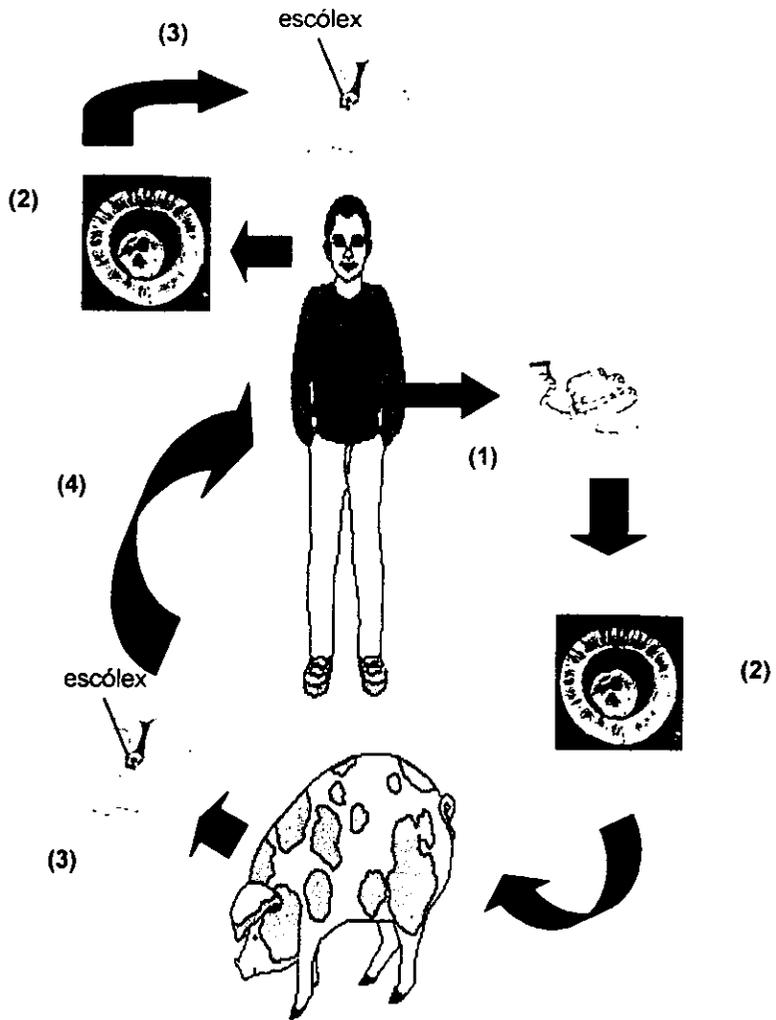


Fig. 1. Ciclo de vida de *T. solium*. El individuo tenioso (1) arroja huevos del parásito en heces (2) que pueden ser ingeridos por el cerdo (coprofagia) o por el humano en alimentos contaminados causándoles cisticercosis (3). El humano, al ingerir carne de cerdo con cisticercos e insuficientemente cocida (4), desarrolla el gusano adulto (1).

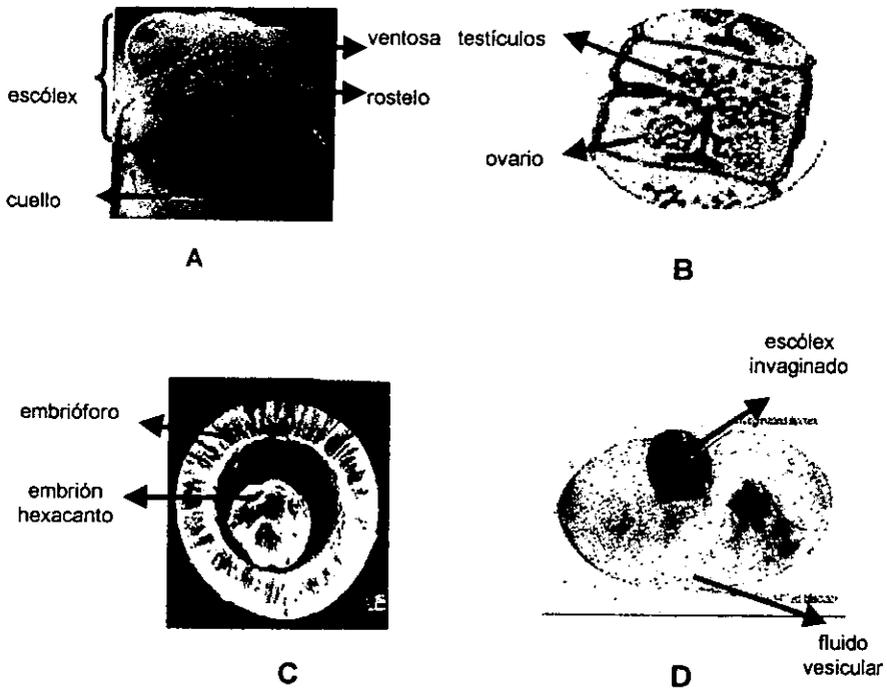


Fig. 2. Morfología de *T. solium*. (A) Escólex del gusano adulto. (B) Proglótido maduro. (C) Huevo. (D) Cisticerco.

3.1. Glicoproteínas (GPS) del tegumento

Ciertos carbohidratos como D-manosa, D-glucosa y N-acetil-glucosamina han sido detectados en la superficie de *T. solium*, *T. taeniaeformis*, *T. pisiformis*, *T. crassiceps* y *T. saginata* por medio de tinciones como la de Schiff y por afinidad a lectinas como la Concanavalina A (Con A) o la aglutinina de *Lens culinaris* (LCA) conjugadas con Peroxidasa, Ferritina o Isotiocianato de fluoresceína^{90, 93, 114, 151}. Asimismo, estos y otros carbohidratos se han encontrado unidos a proteínas (GPS) aparentemente involucradas en el transporte de iones y moléculas orgánicas útiles para el parásito, o como en el caso de *T. taeniaeformis*, en la que se han encontrado en mayor proporción en los sitios donde las células del hospedero se unen significativamente al parásito^{130, 151}. De igual forma, se ha encontrado que *T. crassiceps* renueva continuamente sus carbohidratos de superficie y que además, algunos están unidos a proteínas de 37, 85 y 97 kDa, de las cuales no se sabe su función^{90, 170}. Por otro lado, se ha observado que diversos ténidos comparten GPS tanto en su etapa larvaria como en su etapa adulta. Un ejemplo, es *T. solium*, cuyas GPS afines a Con A (analizadas en este trabajo), GP1, GP2-3, GP4, GP5, GP6 y GP7, se encuentran tanto en la superficie de la larva como en la del adulto de éste parásito, y excepto GP6, en el adulto de *T. saginata*. Al mismo tiempo, GP1 también se encuentra en el tegumento de la larva de *T. saginata*, *T. crassiceps* y *T. pisiformis*. No se conoce la función de seis de estas GPS pero, se ha demostrado, que todas son inmunogénicas para el humano y que la GP6 es la cadena pesada de la IgG de cerdo^{91, 93}. Este también es el caso de una GP de 70 kDa presente en el exterior de la superficie de la membrana plasmática del cisticerco de *T. solium*⁷⁹. Otra GP presente en éste y otros cestodos es el antígeno B (AgB) o paramiosina. Este antígeno es sintetizado por los citones tegumentales y secretada al tejido del hospedero. Además, tiene 12 % en carbohidratos, un peso molecular de alrededor de 100 kDa, y un punto isoeléctrico (pI) de 5.3^{67, 86, 103}. Este antígeno ha sido el más estudiado y sus funciones, como su utilidad diagnóstica, son mencionadas a lo largo de este trabajo.

4. Respuesta inmune del hospedero

4.1. Reacción inflamatoria

Células del hospedero como linfocitos, eosinófilos, granulocitos, macrófagos, fibroblastos, células epitelioides, células plasmáticas e histiocitos, son encontradas en la cápsula inflamatoria que limita a cisticercos encontrados en músculo de cerdo^{28, 46, 116, 117, 178}. Todas éstas células se han observado durante el proceso de degeneración de la larva en éste hospedero que incluye diversas etapas. La primera, es la coloidal, donde el FV del metacéstodo muestra un material gelatinoso y una cápsula blanquecina a su alrededor. La segunda es la granular-nodular, donde la pared vesicular del parásito es reemplazada por nódulos linfoides. Finalmente, la tercera o granular, muestra reemplazo del tejido destruido de la larva y del hospedero con la consecuente calcificación de la lesión^{116, 162, 168, 178, 179}. En general, no se sabe exactamente cual o cuales de las células encontradas en este proceso es clave para la eliminación del parásito¹²⁶.

4.2 Anticuerpos y Complemento

La respuesta inmune humoral y el complemento, han demostrado estar presentes tanto en la teniosis como en la cisticercosis. Un ejemplo es la presencia de anticuerpos en suero de teniosicos de tipo IgG1, IgM e IgA dirigidos contra productos de excreción y secreción del gusano adulto¹⁸⁰. Otro, es el de personas neurocisticercosas que presentan anticuerpos y complemento en suero que reducen significativamente la viabilidad de las oncosferas de éste parásito¹¹⁸. Éstas moléculas, también se han encontrado en larvas y fluidos corporales de personas con NCC en niveles proporcionales al grado de inflamación y relacionados al sitio de la lesión^{15, 146, 162, 185}. Por otro lado, existen individuos infectados que presentan niveles de anticuerpos no detectables en LCR e individuos con niveles de anticuerpos en suero detectables pese a que el parásito ha sido eliminado¹⁴³. De esta forma, la respuesta inmune humoral

generada por cada individuo ha demostrado diferir en la clase o subclase de inmunoglobulinas generadas y en su nivel en los distintos fluidos corporales lo que limita el uso práctico del inmunodiagnóstico en muchos casos^{143, 185}. Por otro lado, diversos estudios en cerdo han demostrado que aquellos vacunados con glicoproteínas de superficie del metacéstodo muestran resistencia a la reinfección que dura al menos 5 meses, tiempo en el cual, presentan anticuerpos en contra del parásito. Por desgracia, aún no se sabe el papel protector que éstos juegan en la respuesta inmune del hospedero²⁹.

5. Mecanismos de evasión de la respuesta inmune

Es necesario que un parásito sea capaz de sobrevivir y proliferar en sus hospederos. Para ello, inhibe los mecanismos de defensa del hospedero, cambia constantemente su composición antigénica, arroja antígenos a su alrededor para formar complejos inmunes a distancia o se cubre con antígenos del hospedero^{101, 162}. De esta forma, se ha observado la modulación antigénica en ténidos como *T. saginata*, cuya composición glicoproteica cambia durante su desarrollo de oncosfera a cisticerco⁷⁶. Por otro lado, los ténidos también son capaces de inhibir los mecanismos de defensa del hospedero de diversas formas. Algunas moléculas presentes en *T. solium* y en otros parásitos intervienen a nivel del complemento, como es el caso de glicosaminoglicanos sulfatados que lo consumen e inactivan, la taeniaestatina de *T. taeniaeformis* (proteína) que lo inhibe en ambas vías, el ácido siálico que inhibe al C₃b y el AgB que inhibe al C1q^{78, 87, 100, 177}. Por otro lado, enzimas proteolíticas como metaloproteasas, amidopeptidasas y endopeptidasas o enzimas que eliminan radicales libres de oxígeno como la Superóxido Dismutasa, Glutación-S-Transferasa, Glutación Reductasa y Glutación Peroxidasa, también participan en la estrategia de evasión^{100, 176, 177, 178}. Finalmente, otro mecanismo de defensa adoptado por estos parásitos ha sido la inhibición de la síntesis de citocinas como IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, TNF α e INF γ dada por moléculas como el MF (RNA-péptido) y la taeniaestatina. Este mecanismo inhibe la proliferación de linfocitos T, células B, diapedésis de macrófagos, de eosinófilos y de neutrófilos en forma significativa^{6, 13, 100, 119, 166}.

6. Parasitosis causadas por *T. solium*

La teniosis y la cisticercosis son enfermedades que difieren en sintomatología, severidad, diagnóstico y tratamiento.

6.1 Teniosis

La teniosis es una infección difícil de detectar ya llega a presentar síntomas ligeros no graves como dolor abdominal, hambre, indigestión, diarrea o pérdida de peso⁴.

6.2 Cisticercosis

La cisticercosis es una infección conocida desde la antigüedad que afecta de igual forma a hombres y a mujeres, en su mayoría entre las primeras cinco décadas de vida^{97, 124, 165}. Esta infección se puede presentar en ojo (Fig. 3 A), músculo, tejido subcutáneo, vísceras, espina dorsal y cerebro y se manifiesta con síntomas que dependen del número de parásitos y de la actividad de la lesión causada^{179, 184}. Por ejemplo, la cisticercosis espinal puede causar paraplejia si existe una elevada reacción inflamatoria en contra del parásito³⁷.

6.3. Cisticercosis en Sistema Nervioso Central o neurocisticercosis (NCC)

La NCC puede ser causada, en la mayoría de los casos, por cisticercos celulosos (54.2 % de los casos), por cisticercos racemosos (en menor proporción) o por ambos (9 al 13 %) que pueden situarse en diversos puntos del cerebro¹⁴¹. Entre los síntomas que expone esta enfermedad se han encontrado delirio, alucinaciones, insomnio, cefalea, migraña, epilepsia tardía, hipertensión endocraneal e hidrocefalia. El más frecuente es la epilepsia tardía (42-52 % de los casos) seguida de la hipertensión endocraneal (38-53 %) y la hidrocefalia (30 %) ^{30, 37, 52, 108, 161, 165}. De ésta manera, la NCC se ha clasificado en activa o inactiva y maligna o benigna con fines de diagnóstico y

tratamiento^{15, 165}. La NCC inactiva o benigna responde a una infección resuelta o calcificada manifestada, en algunos casos, por cefalea o epilepsia^{37, 165}. Por otro lado, la NCC activa es causada por parásitos vivos o no completamente destruidos que generan cierta inflamación en el sitio donde se alojan (Fig 3 B). Este tipo de NCC puede ser parenquimal (la más frecuente), encefálica, subaracnoidea o intraventricular y cursar con diversos síntomas y riesgos para el paciente. Por ejemplo, la NCC intraventricular puede causar hidrocefalia y la muerte del paciente^{143, 165, 179}. Por último, se han encontrado con frecuencia pacientes parasitados en distintos sitios del cerebro lo que complica su estado clínico y tratamiento.

7. Diagnóstico

7.1. Teniosis

El examen coproparasitológico (CPS) de un raspado perianal (Graham) o de tres muestras consecutivas de materia fecal tratadas por métodos de flotación o sedimentación, se utilizan rutinariamente para detectar huevos de *Taenia sp* con muy baja sensibilidad (60 %). Por otro lado, el tamizado de materia fecal de 24-72 h se indica para detectar proglótidos y el escólex del parásito que permiten determinar la especie infectiva en los casos que han recibido tratamiento cestocida^{5, 8, 20, 167}. La baja sensibilidad de estas técnicas ha llevado a la detección de antígenos parasitarios en heces (coproantígenos) por ELISA y Dipstick ELISA que han resultado ser hasta 98 % y 76 % sensibles respectivamente, pero sin llegar a diferenciar *T. solium* de *T. saginata*^{2, 3, 5}. Otros estudios, sugieren que se han resuelto ambos problemas en una misma técnica. Uno de ellos, desarrolló sondas radiactivas de ADN genómico de ambos parásitos que han llegado a detectar hasta un huevo en heces en forma muy específica^{22, 48, 69}. El más reciente, confrontó suero de personas teniosicas con productos de excreción y secreción del adulto de *T. solium* por IET que demostró ser 100 % específico y 95 % sensible, por lo tanto, es un buen candidato para diagnóstico inmunológico de teniosis¹⁸⁰.

7.2. Neurocisticercosis

Debido al pleomorfismo de la NCC, un examen clínico exhaustivo que comprenda desórdenes neurológicos, descripción de síntomas, haber expulsado proglótidos en heces, vivir con un tenioso, exámenes imageneológicos, determinación de proteínas, glucosa y células en líquido cefalorraquídeo (LCR) y detección de anticuerpos o antígenos en fluidos corporales, es necesario para dar un diagnóstico certero de la enfermedad¹⁴⁶.

a) Técnicas imagenológicas

Los métodos más utilizados para el diagnóstico de la NCC son la tomografía axial computarizada (TAC) (Fig. 3 B) y la resonancia magnética imagenológica (RMI) (Fig.3C). Desgraciadamente, la primera es 63 % sensible y llega a confundir las imágenes con granulomas tuberculosos. Por esta razón, a veces se prefiere el uso de la RMI, ya que muestra imágenes más detalladas de cisticercos vivos y de la reacción inflamatoria que ocasionan^{41, 47, 58} (Fig. 3 C). Ambas técnicas son poco accesibles para la mayor parte de la población ya que el equipo que se requiere es caro y sólo esta disponible en hospitales especializados de grandes ciudades.

b) Técnicas inmunológicas

Las técnicas inmunológicas son menos costosas y más accesibles que las imagenológicas para el diagnóstico de NCC. Estas técnicas detectan antígenos o anticuerpos con diferentes grados de sensibilidad y especificidad.

b.1. Búsqueda de antígenos en LCR

La presencia de antígenos de *T. solium* en LCR indica la infección inminente del cerebro por éste parásito. Entre los anticuerpos monoclonales que han dado mejores

resultados para detectar antígenos parasitarios por ELISA se encuentran el HP10 y el 1F11. El primero es de tipo IgM dirigida contra GPS de secreción de *T. saginata* y el segundo es IgG1, dirigido contra componentes de FV de *T. solium*. Ambos anticuerpos hacen el ELISA muy específico siendo 86 % y 82 % sensibles, respectivamente^{17, 21, 57, 70}. Este resultado, ha llevado a la separación de los antígenos parasitarios presentes en LCR por HPLC en un intento de mejorar utilidad de la técnica²⁶.

b.2. Búsqueda de Anticuerpos

La presencia de anticuerpos contra el parásito en cualquier fluido corporal no es concluyente para el diagnóstico de la enfermedad, solo indica que el individuo ha estado expuesto a antígenos del parásito³⁸. De esta forma, diversas técnicas se han desarrollado para dar un diagnóstico certero. Todas ellas han ocupado diversos antígenos que les han conferido cierta especificidad y sensibilidad y, solo algunas, han logrado ser útiles para concluir que un individuo está infectado por *T. solium*.

b.2.1. Extracto crudo de larva de *T. solium* (ECL)

El ECL ha sido ocupado en pruebas como la intradermoreacción, inmunoprecipitación, fijación del complemento (FC) y hemaglutinación indirecta (HAI), confiriéndoles baja sensibilidad y especificidad^{37, 108, 111, 124, 182}. Otras, como la inmunodifusión (ID) y la inmunolectroforesis (IEF), no detectan anticuerpos en suero en la mitad de los pacientes con NCC^{24, 39}. Por otro lado, el ELISA con el ECL ha demostrado ser hasta 95 % sensible y 100 % específico con LCR y 87 % sensible y 100 % específico con suero^{15, 38, 40, 122, 147}. En contraste, el ensayo inmunoenzimático (EIA) con saliva, ha mostrado baja sensibilidad y especificidad⁴⁴. De esta forma, se ha demostrado que el ECL es poco útil para el diagnóstico de NCC ya que algunos de sus componentes son reconocidos en inmunolectrotransferencia (IET) y ELISA por fluidos de personas con otras parasitosis^{64, 125, 129}

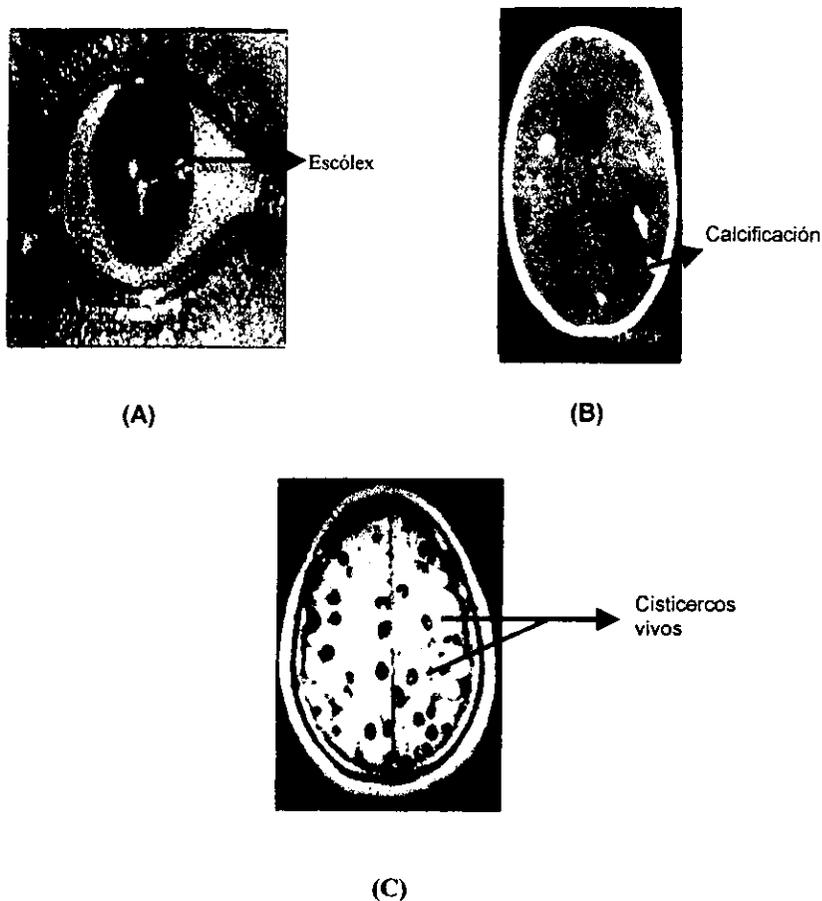


Fig. 3: Formas de la cisticercosis. (A) Cisticercosis ocular. (B) Tomografía axial computarizada de un cerebro humano con hidrocefalia y cisticercos calcificados. (C) Resonancia magnética imagenológica de un cerebro humano con lesiones múltiples.

b.2.2. Fluido vesicular (FV)

El FV es una mezcla de antígenos frecuentemente reconocidos por suero y LCR de personas con NCC. Además, es muy estable al desecarlo y almacenarlo en congelación o a 4°C. Este antígeno se ha ocupado en HA y ELISA que han llegado a ser hasta 90 % sensibles y 97.5 % específicas^{82, 95, 96, 99, 122}. Ambas técnicas han sido ocupadas en estudios seroepidemiológicos y una de ellas, el ELISA, ya ha sido comercializada libremente en Estados Unidos^{7, 34, 97, 164}. Por desgracia, este antígeno presenta el mismo problema que el ECL, sus componentes son reconocidos por fluidos de personas infectadas con *Echinococcus granulosus*, un ténido que también infecta al humano^{25, 96, 131, 142}. Estrategias como el fraccionarlo por enfoque isoelectrico han disminuido, pero no eliminado, dicha reactividad cruzada^{80, 81}.

b.2.3. Fracciones proteicas de la larva de *T. solium*

Muchas fracciones proteicas se han obtenido a partir de la larva de *T. solium* con el fin de aumentar la utilidad de las técnicas para el inmunodiagnóstico de la NCC. De las fracciones que se han obtenido del EC de escólex de la larva, se encuentra aquella con proteínas de 64 a 16 kDa que hace el ELISA con suero y LCR 91 % sensible y 100 % específico^{77, 123}. Por otro lado, numerosas fracciones antigénicas se han obtenido a partir del ECL y, algunas, no han resuelto la baja sensibilidad y especificidad de las técnicas que las ocupan^{23, 127}. Algunos de estos ensayos, demostraron la existencia de GPS de ECL frecuentemente reconocidas en IET por suero de personas con NCC, dieron la pauta para la utilización de estos antígenos en el inmunodiagnóstico de la enfermedad^{66, 131}. Como ejemplo tenemos a la fracción glicoproteica del ECL purificada por cromatografía de afinidad a Con A (FGPS) analizada en este trabajo. Como ya se mencionó (pág. 7), esta fracción esta compuesta por 6 GPS de pI de 6.45 a 3.0 presentes en el tegumento de *T. solium* y de otros ténidos. Estas glicoproteínas son reconocidas por sueros de personas con NCC en IEF, no reaccionan cruzadamente con el AgB y hacen el ELISA 98 % específico y 80 % sensible con suero y 98 % específico y

90 % sensible con LCR⁹¹. De esta forma, la FGPS ha demostrado tener utilidad en el inmunodiagnóstico de la NCC. Otra fracción glicoproteica (LL-GPS) que se ha purificado a partir de ECL, es aquella afín a la lectina de lenteja (LCA). Esta fracción está compuesta por 7 zonas o LL-GPS: GP50, GP42-39, GP24, GP21, GP18, GP14 y GP13 (el número corresponde a su peso molecular) que hacen el IET 100 % específico y 98 % sensible con LCR y suero de individuos con lesiones cerebrales múltiples^{171, 181}. Esta técnica es ocupada por los Centers of Disease Control and Prevention (CDC), en estudios seroepidemiológicos y, en forma comercial (Immunetics, Cambridge, MA), para confirmar el diagnóstico de la NCC cuando el suero o el LCR del paciente reconoce al menos una de las LL-GPS^{18, 61, 154, 161, 164}. Por otro lado, se sabe que el 91 % de los pacientes no reconocen más de tres LL-GPS, que el 47 % reconoce las siete y que las más reconocidas son GP50, GP42-39, GP24 y GP13^{44, 53, 160}. Al mismo tiempo, se ha demostrado que algunas de las proteínas anteriores presentan otras, como GP14 y GP10, que también tienen utilidad diagnóstica^{65, 139}. Una limitante de esta técnica es que no detecta anticuerpos en fluidos de individuos con una sola lesión o con lesiones calcificadas¹⁸¹. Otra, es que la fracción de LL-GPS ocupada es muy inestable y su preparación complicada. Estas razones han llevado a purificar GPS de 10-26 kDa por enfoque isoelectrico de ECL y FV de *T. solium*, que al ser utilizadas en IET con suero humano y porcino, lo hacen 100 % sensible y específico. Estas GPS ya se ocupan en estudios epidemiológicos en China, Bali, Papua Nueva Guinea y Ecuador⁷⁴.

b.2.4. Proteínas puras

Pocas proteínas se han logrado purificar para el inmunodiagnóstico de la enfermedad. La primera proteína en purificarse con este fin fue el AgB. Este antígeno, es el más frecuentemente reconocido por sueros de personas con NCC (85 %) en IEF pero, desafortunadamente, también es sintetizado con alto grado de homología por otros parásitos como *Schistosoma mansoni* y *E. granulosus*, que también infectan al hombre^{84, 85, 92, 103, 138}. El AgB hace el ELISA hasta 80 % sensible y 96 % específico con suero y 90 % sensible y 98 % específico con LCR^{38, 39, 91, 123}. Al mismo tiempo, es detectado en LCR de 12.5 % de los pacientes con NCC¹⁷. Por otro lado, se ha

observado que la GP24, una de las LL-GPS más frecuentemente reconocidas, al ser ensayada por Inmunopunto, éste es 100 % sensible y específico con suero y LCR¹³⁶. De la misma manera, se ha purificado una proteína de 150 kDa de FV de *T. solium* que fue encontrada en el 11.5 % de LCR de pacientes con NCC²⁵. Esta proteína está formada por una subunidad de 10 kDa reconocida por el 84.6 % de sueros de pacientes y ya ha sido obtenida su forma recombinante para ocuparla en el diagnóstico de la enfermedad^{27, 183}.

b.2.5. Antígenos heterólogos

Diversos antígenos de *T. crassiceps* se han ocupado para el diagnóstico de la NCC. Estos antígenos tienen elevada reactividad cruzada con los de *T. solium* y se pueden obtener en grandes cantidades en poco tiempo^{90, 104, 156}. Entre estos antígenos se encuentran FV y antígenos de membrana, que se han ocupado en técnicas como ELISA, Dot-ELISA, FC e IET. Estas pruebas han sido hasta 97 % de sensibles y 100 % de específicas^{12, 50, 98, 174}.

b.2.6. Antígenos recombinantes

Otra manera de resolver el problema de obtención constante de antígeno para diagnóstico, es produciendo un antígeno recombinante. Entre los antígenos recombinantes reconocidos y aislados, se encuentran proteínas de 118 a 132 kDa y el KETc12 de *T. crassiceps*. Este último, hace el ELISA 100 % específico y 87 % sensible con LCR de personas con NCC^{45, 71}. Por otro lado, antígenos aislados de la larva de *T. solium* como el NC-3 y el de 10 kDa presente en FV, han mostrado ser reconocidos serológicamente por la mayor parte de personas con NCC^{27, 72}.

7.3. Cisticercosis porcina

El diagnóstico de la cisticercosis porcina se hace *antemortem* o *posmortem*. El diagnóstico *antemortem* consiste en un examen visual o palpación de la lengua del

animal para observar la presencia de cisticercos. Esta técnica es 70.8 % sensible y 100 % específica⁶¹. Al mismo tiempo, se han buscado anticuerpos en suero del animal por ELISA con ECL (70 % sensible y 76 % específico), con antígenos de escólex (95 % sensible y 96 % específico) y con antígenos de *T. crassiceps* (100 % sensible y específico)^{9,81,83,132,135}. De igual forma, se ha experimentado con LL-GPS en IET, el cual ha sido 100 % sensible y específico y se ha encontrado el diferente reconocimiento de las LL-GPS de acuerdo al tiempo de la infección en este animal^{62, 81, 144, 149, 171, 172}. Por otro lado, el diagnóstico *posmortem* se realiza en rastros al examinar cortes de músculos y vísceras del cerdo¹⁵². A pesar de los resultados anteriores, se ha demostrado que ninguna de las técnicas mencionadas es adecuada para el diagnóstico en cerdos levemente infectados¹⁵⁷.

8. Tratamiento

8.1. Teniosis

El fármaco de primera elección para el tratamiento de la teniosis es la Niclosamida. Este fármaco es capaz de eliminar al gusano adulto con una dosis de 40 mg/kg sin ser tóxico para el humano. Además, solo afecta al gusano adulto deteriorando su escólex y proglótidos al inhibir la fosforilación oxidativa de las mitocondrias^{63, 94, 152, 167}. La siguiente elección es el Praziquantel, fármaco que se administra en una dosis de 10 mg/kg y que elimina el parásito al causarle parálisis espástica por incremento de la permeabilidad membranar a cationes como el Calcio^{50, 63}. Este fármaco, ataca tanto al gusano adulto como al cisticerco. Para cualquiera de los dos fármacos, todas las personas tratadas deben ingerir también un laxante, como el aceite de castor o sulfato de magnesio, 2 h después de la administración del cestocida para estimular el peristaltismo y facilitar la expulsión del parásito^{34, 43}. A los niños que requieren de tratamiento cestocida, se les administra generalmente Albendazol por tres días seguidos. Este fármaco, afecta el consumo de glucosa de la mayoría de los helmintos por lo que es usado en contra de una amplio espectro de parasitosis intestinales¹⁵². En cualquier caso, es importante que se arroje el escólex del parásito, si

esto no ocurre, el individuo parasitado arrojará proglótidos de 2 a 3 meses después del tratamiento^{43, 167}. Por último, debe considerarse seriamente la administración de Praziquantel o Albendazol ya que ambos afectan también al cisticerco y pueden complicar el estado clínico de la persona portadora del parásito en ambas etapas de desarrollo⁴.

8.2. Tratamiento de la neurocisticercosis

Existen dos factores que determinan la terapia a seguir para esta enfermedad: la actividad de la infección y la localización del cisticerco en el cerebro^{30, 165}. Pacientes con calcificaciones necesitan tratamiento para controlar la secuela, por ejemplo, la epilepsia se controla con anticonvulsivos. Aquellos con cisticercos viables con poca evidencia de inflamación generalmente se tratan con Praziquantel (50 mg/kg por 8 o 15 días), Albendazol (15 mg/kg diarios por 8 o 30 días)^{54, 63, 104, 179} o Fluobendazol (40 mg/kg diarios por 10 días), todos efectivos a los 3 meses de tratamiento⁴⁹. En ocasiones, el paciente presenta cefalea, vómito y convulsiones debido a la respuesta inmune que genera contra el parásito en destrucción. Estos síntomas se controlan con analgésicos, antiepilépticos y esteroides^{30, 165}. Por otro lado, pacientes con hidrocefalia requieren de drenado de LCR y en ciertos casos, la extracción de la larva^{37, 54, 143, 179}. De igual manera, la cirugía se ocupa para eliminar la compresión que causa la larva en la masa intramedular en casos de NCC espinal ya que el uso de cestocidas puede aumentar la respuesta inflamatoria y generar una lesión mayor^{30, 37}. Finalmente, el tratamiento se complica en pacientes con NCC mixta, cuyo caso debe ser estudiado cautelosamente para disminuir la secuela de la enfermedad^{41, 54}.

8.3. Cisticercosis ocular, muscular y subcutánea

La cisticercosis ocular se trata generalmente con cirugía o con fotocoagulación con rayo láser. Por otro lado, la cisticercosis muscular y subcutánea se eliminan con tratamiento cestocida con Praziquantel en dosis diaria de 75 mg/kg por 12 meses⁴⁷.

8.4. Cisticercosis porcina

Realmente, el tratamiento cestocida no se aplica a cerdos, aunque ha demostrado ser útil en la destrucción del parásito aún con un solo día de tratamiento⁴⁶. De esta forma, el Código Sanitario ordena el decomiso de la carne infectada, la cual se incinera si está intensamente infectada o se cepilla y fríe en "carnitas" si está levemente^{1, 153}.

9. Vacunación de cerdos

Diversos productos parasitarios han sido ocupados en experimentos de vacunación en este hospedero. Algunos ensayos han incluido ECL y productos de excreción y secreción de oncosferas de *T. solium* que le han conferido del 95 al 100 % de protección contra la infección^{115, 116, 133}. Otros experimentos con FV y ADN de *T. crassiceps* y antígenos recombinantes de *T. ovis* han conferido 96.8 %, 76 % y 93 % de protección, respectivamente^{19,31,68,75,102,109,137}.

10. Epidemiología

Las infecciones causadas por *T. solium* constituyen un problema importante de salud en diversos países subdesarrollados. La OMS calcula que existen 50 millones de personas infectadas por teniosis/cisticercosis alrededor del mundo, 4 millones albergan a la tenia adulta, 50 mil personas mueren cada año por NCC y que por cada teniosico hay 10 personas con cisticercosis^{158,179}.

10.1. Cisticercosis porcina

La venta clandestina de cerdos infectados en países subdesarrollados no ha permitido establecer la prevalencia mundial real de la infección en este hospedero. Se sabe que Zaire es una zona hiperendémica donde hasta el 30 % de los cerdos están

infectados⁶⁰. Por otro lado, países latinoamericanos como Honduras, Guatemala, Costa Rica, El Salvador, Nicaragua y Perú, han detectado que hasta el 21.3 % de los cerdos en sus rastros presentan cisticercosis y, que en ciertas zonas rurales, la seroprevalencia porcina por IET llega a ser hasta del 64 %^{4, 35, 56, 61, 107, 149}. México ha mostrado prevalencia de la infección en cerdo del 1 al 23 % por inspección de lengua y seroprevalencia del 4 al 39 % por IET^{115,116,144,145,154}. Al mismo tiempo, se han presentado frecuencias del 0.004 al 12.6 % en rastros donde se han llegado a detectar hasta 200,000 cerdos infectados en un año^{14, 28, 134, 144}.

10.2. Teniosis

Dadas las características de la teniosis, diversos estudios han concluido que su prevalencia mundial es subestimada. Se sabe que en zonas de África, la prevalencia de la infección es hasta del 2.5 % y que en países como Guatemala ha llegado a ser hasta del 3.5 %^{4, 60}. Investigaciones científicas en zonas rurales de nuestro país han encontrado una prevalencia de la enfermedad del 0.3 al 3.4 %^{33, 51, 145, 152, 154}. Por otro lado, estadísticas oficiales han encontrado hasta 8,000 infectados por *Taenia sp.* al año¹⁵².

10.3. Cisticercosis humana

Entre los países asiáticos con problemas por esta infección se encuentran India, Indonesia, China y Corea, donde la seroprevalencia ha llegado hasta el 9.3 %. Además, algunos de estos países son endémicos para *Taenia Asiática*, una variante de *T. saginata* capaz de causar cisticercosis en humano^{73, 107, 163, 173}. Por otro lado, zonas de África han reportado prevalencia del 7 % en autopsias y seroprevalencia del 0.23 al 2.49 %^{107, 128}. Países como Brasil, Perú, Colombia y Chile, han registrado incidencias de NCC hasta del 1.3 % en hospitales¹⁶¹. Específicamente Perú, muestra seroprevalencia del 18 % en zonas rurales y del 11 % en pacientes neurológicos por IET^{52, 55, 56, 59}. Por estos resultados, se sospecha que la endemia de cisticercosis en México presenta una situación similar a la de Latinoamérica. Hospitales especializados en Neurología y

Neurocirugía en nuestro país han reportado frecuencias de NCC hasta del 8.6 % y se ha descubierto la infección en el 3.6 % de las autopsias y en el 35 % de las craneotomías¹²⁴. Además, del 5 al 10 % de pacientes expuestos a cirugía cerebral ha sido por esta infección³⁴. Diversos estudios seroepidemiológicos se han llevado a cabo en nuestro país con la utilización de diversas técnicas inmunológicas con el fin de determinar factores de riesgo de adquirir la enfermedad y de relacionar la seropositividad con el nivel socioeconómico y cultural. Dichos estudios han determinado que la seropositividad en la República Mexicana es del 1.2 % al ser medida por HAI⁹⁷. Además, las zonas del país con mayor seropositividad son las del Bajío y el Pacífico que involucran a estados como Guerrero, Zacatecas, Guanajuato, Jalisco, Nayarit y el D.F.^{33, 51, 145}. Al mismo tiempo, se ha relacionado a la seropositividad con el nivel socioeconómico y bajo nivel cultural de la población de forma muy ambigua ya que se ha demostrado que la endemia de las infecciones causadas por *T. solium* esta íntimamente ligada a los malos hábitos de higiene, educación e infraestructura sanitaria^{152, 154}.

En Europa, se erradicaron las infecciones causadas por *T. solium* a principios del siglo XX gracias a mejoras en las condiciones sanitarias, hábitos de higiene y a la intensificación de la inspección de la carne de cerdo¹²⁴. Desgraciadamente, en países desarrollados como Estados Unidos (EUA) cada día son más frecuentes los casos de personas con NCC debido a la constante migración de personas de países endémicos a este país. De esta manera, del 69 al 96 % de las personas documentadas con NCC en EUA son latinoamericanas, la mayor parte, mexicanas^{37, 148}. Asimismo, se ha observado que personal latino de limpieza portador del gusano adulto, ha causado cisticercosis en individuos que nunca han consumido carne de cerdo por sus creencias religiosas^{121, 159}. Por éstas razones, se sospecha que el número de personas afectadas por ésta enfermedad en EUA asciende a 1,000 cada año¹⁷⁹.

11. Impacto económico

Un individuo tenioso trabaja normalmente mientras que es un foco de infección para aquellos que lo rodean. Por otro lado, la calidad de vida de un paciente con NCC

se ve afectada considerablemente ya que, si su estado es grave, puede permanecer en casa u hospitalizado por más de un mes disminuyendo su ingreso mensual^{161, 175}. Adicionalmente, solo el 45 % de los pacientes sometidos a cirugía se recupera, aquellos que no lo logran, sufren de graves alteraciones monetarias y familiares¹⁶¹. El costo del tratamiento de la teniosis ha llegado a ser hasta 150 veces menor al de la NCC ya que no requiere de hospitalización¹³⁴. Le ha costado al gobierno de México hasta 14.5 millones de dólares atender a 2,700 personas con NCC y ha perdido hasta 45 millones de dólares por la eliminación de cerdos infectados por este parásito¹⁷⁵. De igual forma, se cree que anualmente se pierde hasta la mitad de la inversión nacional en la industria porcina^{14, 158}, aunque aquí es necesario mencionar, que este punto es discutible ya que en ciertas zonas de la República Mexicana la crianza rústica de cerdos es la mayor fuente de ingresos para la mitad de la población¹⁴⁴. De esta forma, la venta de carne de cerdo infectada y cepillada en forma de "carnitas" es común porque evita pérdidas económicas a los dueños de cerdos infectados¹.

12. Prevención y control

12.1. Factores de riesgo

Malos hábitos como el fecalismo al aire libre, promueven la cisticercosis en cerdos de crianza rústica que usualmente se alimentan de basura y heces humanas al deambular libremente alrededor de las viviendas. Asimismo, un individuo teniosico que no acostumbra lavarse las manos antes de preparar alimentos y después de ir al baño, pone en riesgo la salud de aquellos con los que convive^{34, 61, 94, 97, 159}. Lo anterior, combinado con la completa ignorancia del ciclo de vida del parásito y la ingesta frecuente de carne de cerdo infectada casi cruda, de vegetales crudos sin lavar y de agua sin hervir, diseminan las infecciones causadas por éste parásito a lo largo del país^{42,51,145,154}.

12.2. Medidas de control

Diversas estrategias han sido propuestas por la OMS para el control y erradicación de la teniosis y de la cisticercosis. Estas estrategias incluyen una apropiada legislación para la inspección y disposición de la carne de cerdo infectada en rastros, educación sanitaria intensiva a la población en general, modernización de la crianza de cerdos, utilización de letrinas, estandarización de técnicas diagnósticas inmunológicas útiles en estudios epidemiológicos, tratamiento humano masivo con cestocidas y vacunación de cerdos^{134, 158}. Algunas de estas estrategias han sido implementadas aisladamente, como el tratamiento humano masivo cestocida y la educación sanitaria. Esta última, ha demostrado reducir la prevalencia de la cisticercosis porcina a casi el 0 % en poblaciones rurales de México gracias a la adopción de buenas prácticas de higiene personal, mejoramiento en la infraestructura de drenaje, fosas sépticas y en la mejora en las condiciones de la crianza rústica de cerdos. Sin embargo, este tipo de medidas arrojaron resultados desconcertantes ya que meses después de haber realizado estos estudios la prevalencia resultó ser mayor que al inicio^{4, 34, 62, 152, 155} tal vez por el abandono en las buenas prácticas de higiene personal y por la confianza del tratamiento cestocida "curativo". Estos hechos, han llevado a proponer a la vacunación de cerdos como una mejor estrategia^{115, 116}. De cualquier forma, se sugiere implementar todas estas propuestas al mismo tiempo, como se hizo en Europa a principios del siglo XX, para lograr la eliminación del parásito.

III. JUSTIFICACIÓN

La prueba serológica para el diagnóstico de la NCC estandarizada por V. Tsang en 1989, es altamente específica (100 %) y sensible (98 %) al ser aplicada a pacientes parasitados con más de un cisticerco en cerebro¹⁸¹ y que, por su condición clínica, son atendidos en alguna institución médica. Estos resultados, han llevado a pensar que el inmunodiagnóstico de la NCC por este método es la mejor opción. Sin embargo, esta prueba disminuye el valor de su sensibilidad y especificidad al ser aplicada en estudios seroepidemiológicos en poblaciones definidas^{157, 154}, donde no solo se consideran individuos con sintomatología sugerente a NCC, sino también se consideran individuos sanos en contacto con antígenos del parásito, individuos parasitados que no han presentado sintomatología alguna y que no presentan anticuerpos en circulación e individuos con calcificaciones sin anticuerpos en contra del parásito en niveles detectables. Por otro lado, al método de Tsang requiere de la utilización de una fracción de glicoproteínas (LL-GPS) obtenida por cromatografía de afinidad a LCA, método laborioso y a veces poco eficiente que, sumado a los problemas de reactividad cruzada presentados por la presencia de los residuos de carbohidrato en estos antígenos, hacen a esta prueba algo cara y difícil de implementar.

Por otro lado, la fracción de glicoproteínas del ECL (FGPS) purificadas por el método de cromatografía de afinidad a Con A (similar al de la obtención de las LL-GPS) que contiene seis GPS de la superficie del cisticerco de *T. solium*: GP1, GP2-3, GP4, GP5, GP6 y GP7 de 180, 103-96, 69, 60, 55 y 45 kDa, respectivamente, también presenta un potencial en el inmunodiagnóstico de la NCC⁹¹. De estas GPS, fue necesario determinar que la GP2-3 es la GP con mayor potencial diagnóstico en la FGPS, aún cuando presenta cierto grado de reactividad cruzada con otros antígenos probablemente por los residuos de carbohidrato presentes en su estructura. De esta forma, al obtener a GP2-3 en su forma recombinante (sin residuos de carbohidrato), podemos eliminar gran parte de las reacciones cruzadas que presenta su forma nativa además de poder obtenerla fácilmente, en mayor cantidad y en menor tiempo para su utilización como antígeno en el inmunodiagnóstico de la NCC.

IV. OBJETIVOS

III.1. Objetivo general

- Evaluar a la GP2-3 de *T. solium* en el diagnóstico de la neurocisticercosis humana y clonar y caracterizar el cADN que la codifica.

III.2. Objetivos particulares

- Purificar la GP2-3 a partir de proteínas de 100 kDa del ECL.
- Demostrar el valor diagnóstico de GP2-3 por IET.
- Aislar las clonas que codifican para la GP2-3.
- Caracterizar y analizar las clonas aisladas.

V. MATERIALES Y MÉTODOS.

A. MATERIALES BIOLÓGICOS Y QUÍMICOS

Los cisticercos o metacéstodos de *T. solium* fueron obtenidos por disección del músculo esquelético de cerdos naturalmente infectados provenientes de diversas zonas del país. Los cisticercos fueron almacenados a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

Los sueros de humanos con NCC confirmada (7532 al 8229), los sueros de pacientes con otras parasitosis y las IgG's anti-GP24 fueron amablemente aportados por el Dr. Agustín Plancarte Crespo del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina de la UNAM. Otros sueros de humanos con NCC confirmada (02-02 al 45-03), fueron amablemente aportados por el Dr. Norberto Vibanco Pérez de la Dirección de Investigación Científica de la Universidad Autónoma de Nayarit. Las IgG's anti-GP2-3 y anti-GP50 fueron aportadas por el Dr. A. Landa Piedra el Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina de la UNAM, C.U. Las IgG's anti-IgG de humano y anti-IgG de conejo conjugados con peroxidasa y fosfatasa alcalina fueron obtenidos de Zymed Laboratories.

Todos los reactivos para la electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE), para la electroelución de proteínas y para la inmunoelectrotransferencia a membranas de nitrocelulosa, fueron obtenidos de Bio-Rad Laboratories. La sefarosa 4B- Con A, la sefarosa 4B para preparación de plásmido y los marcadores de peso molecular proteicos preteñidos, fueron obtenidos de GIBCO BRL. La RNAsa y DNAsa fueron obtenidas de Research Organics. El estuche para la secuenciación de ADN plasmídico T7 Sequenase V 2.0 y el $\alpha\text{-S}^{35}$ dATP fue obtenido de Amersham Life Science. El estuche para la reacción en cadena de la Taq Polimerasa (PCR) fue obtenido de Biotecnologías Universitarias®. El fago ExAssist I y los iniciadores T3 / T7 fueron obtenidos de Stratagene. El marcador de peso molecular para ADN fue obtenido de Life Technologies.

Los medios de cultivo SOBm; LB y 2XYT fueron preparados con reactivos de grado bacteriológico obtenidos de las casas comerciales DIFCO y Baker. Todos los demás reactivos usados fueron de grado analítico así como los demás materiales fueron de la mejor calidad disponible comercialmente.

B. MÉTODOS

1. Preparación de extracto crudo de cisticerco (ECL).

Diez gramos de cisticercos de *T. solium* fueron homogeneizados en 50 mL de solución de extracción en frío (apéndice), utilizando un Polytron® dando 3 pulsos de 1 min. a velocidad 6. Posteriormente, el homogeneizado se centrifugó por 30 min. a 15,000 r.p.m., se extrajo cuidadosamente el sobrenadante que se dializó en contra PBS 1X pH 7.4 (apéndice) por 12 h cambiando la solución cada 6 h. Al ECL resultante, se le determinó su concentración proteica por el método de Lowry (Lowry OH, 1951), se analizó su integridad en SDS-PAGE 10% y se almacenó a -20 °C en alícuotas de 5 mL hasta su uso.

2. Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE 10 %)

Los SDS-PAGE al 10 % de 0.75 mm y de 1.5 mm de grosor; se prepararon con el propósito de visualizar proteínas, para transferirlas a membranas de nitrocelulosa y para la electroelución de proteínas, respectivamente. Cada gel fue preparado (apéndice), montado y corrido en el equipo Mini-Protean® II Electrophoretic Cell de Bio-Rad[®]. Las proteínas a separar fueron diluidas en el amortiguador de cargado de electroforesis 2X (apéndice) y calentadas por 3 min a 100 °C. Todos los geles fueron corridos por 1.5 h a 100 V en solución amortiguadora para SDS-PAGE 1X fresca (apéndice). Finalmente, las proteínas separadas fueron teñidas con una solución de

azul brillante de Coomassie 0.05 % por 10 min. y desteñidas con ácido acético 10 % (apéndice).

3. Purificación de glicoproteínas de la larva de *T. solium* (ECL).

3.1. Purificación de la fracción de glicoproteínas (FGPS)

El ECL obtenido se diluyó 1:2 en PBS 1X pH 7.0 y se centrifugó a 10,000 r.p.m. antes de pasarse por 2.5 mL columna de sefarosa 4B-Con A con una capacidad de unión de 5 mg/mL de gel. La columna se equilibró con 10 mL de PBS 1X y se pasaron 10 mL del ECL diluido 1:1. La columna se lavó con 30 mL de la solución de equilibrio y las GPS unidas a Con A, se eluyeron con α -metil-D-manopiranosido 0.1M (α -MMP) (apéndice). La columna se lavó con 4 volúmenes de PBS 1X antes de volverla a usar, o bien, se equilibró con una solución de almacenaje (apéndice) para guardarse a 4°C. La FGPS eluida fue dializada y concentrada por ultrafiltración a 4 °C (Amicon) hasta obtener un volumen final de 1.5 mL. De igual manera que para el ECL, se determinó la concentración proteica de la FGPS y se observó su integridad en SDS-PAGE.

3.2. Purificación de GP2-3.

Se preparó un SDS-PAGE 10 % preparativo de 1.5 mm de grosor donde se cargaron 8.1 mg de ECL y 3 μ L de marcadores de peso molecular proteicos preteñidos. Una vez terminado el corrimiento electroforético, el gel se lavó por 2 min. con agua bidestilada y se colocó en 100 mL de solución de Imidazol 0.2M-SDS 0.1 % (apéndice) por 30 min. en agitación constante. Posteriormente, se lavó dos veces con agua bidestilada y se colocó en 100 mL de sulfato de zinc 0.2 M (apéndice) en agitación constante hasta observar el patrón de bandas en el ECL y cortar la zona proteica de 100 kDa (P-100 kDa). Finalmente, se eliminó el zinc de las bandas cortadas con una solución de EDTA 0.5 M pH 8.0 (apéndice) antes de someterlas a electroelución o almacenarlas a -20 °C.

La electroelución de P-100 kDa del ECL fue llevada a cabo según la técnica para Electro-Eluter ® Model 422 de Bio-Rad. Estas proteínas fueron obtenidas en un volumen de 400 µL y dializadas por 12 h contra PBS 0.1X-Tritón 0.01 % con cambio de solución cada 6h. Posteriormente, la fracción P-100 kDa fue pasada por la columna de sefariosa 4B-Con A de igual forma que el ECL. El eluido conteniendo la GP2-3, se manejó de igual forma que la FGPS.

4. Inmunoelctrotransferencia (IET)

Se cargó 1 µg/mm de gel del ECL, 360 ng/mm de la FGPS, 4.6 ng/mm de la GP2-3 y 3 µL de pesos moleculares proteicos preteñidos en SDS-PAGE 10% preparativos de 0.75 mm de grosor. Una vez terminado el corrimiento electroforético de cada gel, las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa según el manual de Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell de Bio-Rad a 100 V, por 1 h en baño de hielo. Posteriormente, se marcó el gel concentrador de cada transferencia y se almacenó a -20 °C cubierta en papel filtro empapado en PBS 1X.

Para los ensayos de evaluación diagnóstica de GP2-3, cada transferencia con FGPS, ECL y GP2-3 se descongeló y se cortó en tiras de 2 mm de ancho. Posteriormente, cada tira se bloqueó por 15 min. en 500 µL de solución B (apéndice) y se incubó, por 1 h, con la dilución del anticuerpo o suero a utilizar: 1:100 para sueros de humanos con NCC confirmada, para sueros de humanos con otras parasitosis (hidatidosis, toxoplasmosis o loiosis) y para suero de humano sano. Una dilución de 1:500 fue utilizada para IgG's anti-GP2-3, anti-GP50, anti-GP24 e IgG's normales de conejo. Terminado el tiempo de incubación, cada tira se lavó 3 veces con 500 µL de solución A (apéndice) por 5 min. A continuación, a cada tira se le agregaron 500 µL del anticuerpo conjugado con peroxidasa comercial a necesitar (anti-IgG de conejo 1:2000 o anti-IgG de humano 1:1000) diluido en solución A y se incubaron por 1 h. Finalizado este tiempo, cada tira se lavó 3 veces con 500 µL de solución A por 5 min y se reveló por 3 min mediante la reacción inmunológica con 1 mL de la solución reveladora para peroxidasa recién preparada³⁶ (apéndice).

5. Obtención de clonas de fagos que expresan a GP2 o GP3 recombinante

5.1. Adsorción para obtener IgG's específicas anti-GP2-3.

Para preparar las membranas utilizadas en este ensayo, se sembró la cepa de *E. coli*, XL1-Blue, en 50 mL de medio de cultivo líquido LB-Tetraciclina 12.5 mg/mL (apéndice) y se incubó a 37 °C en agitación constante toda la noche. El cultivo se centrifugó a 4,000 r.p.m. por 10 min. a 4 °C y se resuspendió en 30 mL de PBS 1X estéril. La mezcla se homogeneizó en baño de hielo con ayuda del Polytron® en 3 pulsos de 1 min. a velocidad 6 y se almacenó a -20 °C hasta su uso (EC de *E. coli*). Posteriormente, se colocaron 3 filtros de nitrocelulosa de 8.5 cm diámetro en el EC de *E. coli* por 10 min. en agitación constante. Se voltearon los filtros, se incubaron por otros 10 min. y se lavaron 4 veces en 50 mL de TBS 1X por 10 min. cada vez. Terminado este tiempo, se le colocó un filtro con EC de *E. coli* a 50 mL de una dilución 1:10 en TBS 1X- Leche 5 % (apéndice) de IgG's (anti-GP2-3, anti-GP50 y anti-GP24) y se incubó por 30 min. La dilución fue recuperada y probada por IET con EC de *E. coli* hasta no observar reacción evidente contra la bacteria. Finalmente, las IgG's (anti-GP2-3, anti-GP50 y anti-GP24) adsorbidas fueron almacenadas a -20 °C hasta su uso.

5.2. Tamizaje de la biblioteca de cADN

Para llevar a cabo el tamizaje de la biblioteca de cADN construida en el vector de clonación λ Zap II, primero requirió de su titulación. La bacteria XLI-Blue utilizada en este ensayo, se sembró en 50 mL medio líquido LB-Tetraciclina 12.5 μ g/mL y se incubó a 37 °C en agitación constante toda la noche. El cultivo se centrifugó a 3,500 r.p.m. por 10 min. a 4 °C y se resuspendió la pastilla bacteriana en 8 mL de Sulfato de magnesio 10 mM estéril (apéndice). Posteriormente, se prepararon diluciones 10^{-2} , 10^{-4} y 10^{-6} en medio SM (apéndice) de la suspensión de fagos a tamizar. Se utilizaron 10 μ L de cada una y se colocaron por separado en 300 μ L de XLI-Blue resuspendida. Cada infección

se incubó por 20 min. a 37 °C y, posteriormente, se le agregó 3 mL de LB Top Agar (apéndice) que después de mezclarse, se vertió a cajas con medio LB sólido con Tetraciclina 12.5 µg/mL (apéndice). Finalmente, se contó el número de placas líticas presentes en cada dilución después de incubar cada cultivo toda la noche a 37 °C.

El tamizaje primario se llevó a cabo sembrando 45,000 fagos, para lo cual 300 µl de bacterias XLI-Blue se infectaron con 15,000 fagos como ya se mencionó anteriormente. Todas las infecciones se incubaron a 37 °C por 20 min. Terminado este tiempo, se agregaron a las bacterias infectadas 7 mL de SOBMTop Agar que se vertió en 3 cajas Petri de 18 cm de diámetro con medio SOBMT sólido. Este cultivo se incubó a 37 °C hasta la aparición de placas líticas, llegado este punto, se colocó un filtro de nitrocelulosa previamente impregnado con IPTG (inosín-β-para-tiogalactósido) 10 mM (apéndice) a cada caja marcándolo con tinta china para orientarlo correctamente y continuando la incubación por 3.5 h más. Al terminar este tiempo, se retiraron los filtros y se colocó otro (duplicado) también impregnado con IPTG que se marcó e incubó de igual forma que el anterior. Los filtros se lavaron 2 veces en 50 mL de solución T1 (apéndice) por 30 min. y se bloquearon en 100 mL de solución T2 (apéndice) por otros 30 min. Finalizado este tiempo, se lavaron los filtros 2 veces con 50 mL de solución T3 (apéndice) por 15 min. y se les agregó la dilución 1:10 de IgG's anti-GP2-3 específicas. Estos filtros se incubaron toda la noche a 4 °C en agitación constante. A continuación, se lavaron 2 veces con solución T3 por 10 min. cada vez y una con TBS 1X (apéndice). Un segundo anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado a fosfatasa alcalina diluido 1:2,000 se agregó a cada filtro en 50 mL de solución T1 y se incubó por 2 h en agitación constante. Los filtros fueron lavados con solución T3 antes de agregárseles 50 mL del revelador para fosfatasa alcalina (apéndice), que se retiró a los 10 min. de la incubación. Finalmente, cada filtro fue lavado varias veces con TBS 1X y puesto a secar para determinar la localización de las placas líticas en original y duplicado. Este procedimiento se realizó por 3 ocasiones hasta obtener placas de fagos recombinantes perfectamente aisladas. Las placas líticas aisladas fueron recolectadas con una pipeta Pasteur estéril y colocadas en 1 mL de medio SM para su titulación y propagación (Plate Stock).

5.3. Propagación de clonas (Plate Stock)

Para mantener en forma estable una buena concentración de las clonas de fagos obtenidas en el tamizaje, fue necesaria su propagación o preparación de su Plate Stock. Para esto, se infectaron 200 μL de XL1-Blue con 5×10^6 fagos de la clona mantenida en SM. Esta infección se incubó a 37°C por 15 min., se le agregaron 3 mL de SOMB Top Agar y se vertió en una caja Petri con medio SOBMAgarosa (apéndice). Este cultivo se incubó a 37°C toda la noche. Terminada la incubación, se adicionaron 5 mL de medio SM a la superficie del cultivo y se agitó lentamente 1 h a temperatura ambiente para recuperar los fagos propagados. Este medio se recuperó y se agregaron otros 2 mL del mismo, agitando constantemente el cultivo por 10 min. más. A los fagos recuperados en SM se le agregaron 200 μL de cloroformo, se agitó en vórtex y se centrifugó a 3,500 r.p.m. por 10 min. Finalmente, el sobrenadante (Plate Stock) se colocó en un tubo nuevo con 40 μL de cloroformo antes de almacenarlo a 4°C ¹⁵⁰.

6. Transformación de fago a plásmido

Las bacterias X-SOLR se cultivaron en 50 mL de medio líquido LB-Kanamicina (50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) y las bacterias XL1-Blue en 50 mL de medio líquido LB-Tetraciclina (12.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). Se infectaron 200 μL de XL1-Blue con 100 μL del Plate Stock de la clona de λ Zap II a transformar y 10 μL del bacteriófago ExAssist I por 5 min. a 37°C . A la mezcla se le adicionaron 3 mL de medio 2XYT (apéndice) e incubó a 37°C en agitación constante por 2.5 h. Terminado este tiempo, el cultivo se incubó por 20 min. a 75°C y se centrifugó a 4,500 r.p.m. por 20 min. El sobrenadante recuperado conteniendo un fago híbrido (10 μL) fue utilizado para infectar 200 μL de bacterias X-SOLR por 15 min. a 37°C . Por último, se sembraron el 50 % y el 20 % de la infección en cajas Petri con medio LB-Ampicilina (100 mg/mL) durante toda la noche a 37°C . Finalmente, se extrajo el ADN plásmidico de 3 colonias aisladas de cada clona transformada para determinar la

eficiencia de transformación por medio de la Reacciones en Cadena de la Taq Polimerasa (PCR).

7. Preparación alcalina grande de ADN plasmídico

El ADN plasmídico se preparó a partir de 50 mL de un cultivo de la clona bacteriana de interés incubada toda la noche a 37 °C en medio líquido LB-Ampicilina 100 mg/mL. Este cultivo, se centrifugó a 3,000 r.p.m. por 10 min. a 4 °C. y se resuspendió la pastilla bacteriana en 5 mL de solución I (apéndice) con agitación vigorosa. Posteriormente, la mezcla se incubó a temperatura ambiente por 10 min. y se le agregaron cuidadosamente 9 mL de solución II fresca (apéndice), procurando resbalarla por la pared del tubo y agitando con solo invertirlo. Después de incubar la mezcla por 10 min. en baño de hielo, se le adicionaron 7.5 mL de solución III (apéndice) fría, se agitó vigorosamente y se mantuvo de nuevo en hielo por otros 10 min. A continuación, la mezcla resultante se centrifugó a 3,000 r.p.m. a 4 °C por 10 min. El sobrenadante, se colocó en un tubo limpio y estéril donde se le adicionaron 15 mL de isopropanol frío e incubó en baño de hielo por 10 min. para permitir la precipitación de los ácidos nucleicos. Éstos, se recuperaron centrifugando la mezcla anterior a 3,000 r.p.m. a 4 °C por 10 min., desechando el sobrenadante volteando el tubo. La pastilla se secó a temperatura ambiente, se resuspendió en 200 µL de TE, y se incubó con 2 µL de RNAsa 10 mg/mL a 37 °C por 1 h. Posteriormente, se adicionaron 200 µL de fenol saturado con TE (apéndice) para extraer las proteínas presentes en la suspensión. Esta mezcla se agitó vigorosamente por 5 min. Después, se le agregaron 200 µL de cloroformo y se agitó de nuevo. La emulsión resultante se centrifugó a 14,000 r.p.m. por 3 min. para separar ambas fases. La fase acuosa fue transferida a un tubo nuevo con 200 µL de cloroformo, se agitó y se centrifugó de nuevo a 14,000 r.p.m. por 1 min. La fase acuosa (200 µL) fue transferida cuidadosamente a una columna de sefarosa 4B previamente equilibrada con TE. De esta columna, se colectaron 8 fracciones, la primera de 1 mL y las 7 siguientes de 0.5 mL. Se tomaron 5 µL de cada una de las fracciones, se mezclaron con solución de cargado de ADN 2X (apéndice) y se corrieron en un gel de Agarosa-TAE 1 % (apéndice) por 15 min. a 80 mA. Las fracciones donde

se eluyó el plásmido fueron tratadas con 40 μL de acetato de sodio 3 M pH 5.5 (apéndice) y 1 mL de etanol absoluto frío para precipitar el plásmido en suspensión. Cada fracción se colocó a $-70\text{ }^\circ\text{C}$ por 20 min. y se centrifugó a 14,000 r.p.m. a $4\text{ }^\circ\text{C}$ por 10 min. Finalmente, el ADN plasmídico precipitado se secó y se resuspendió en 30 μL de TE¹⁰.

8. Reacción en Cadena de la Taq Polimerasa (PCR)

Se utilizaron los iniciadores T3 / T7 y universales para M13 para cada reacción, siguiendo la técnica descrita por Tecnologías Universitarias®. Para todos los ensayos, se prepararon 100 μL de una mezcla de reacción que incluyó lo siguiente: 100 ng de templado, 10 μL de amortiguador 10 X con cloruro de magnesio 20 mM, 10 μL de desoxinucleótidos 2 mM, 25 pm de iniciadores, una dilución 1:10 del ADN plasmídico problema, 1 U de Amplificasa y c.b.p. de agua bidestilada desionizada estéril (ddH₂O). Como control positivo se ocupó ADN de M13 incluido en el estuche. Todas las reacciones se llevaron a cabo en el termociclador M.J. Research Inc. PTC – 100, utilizando el siguiente programa: 1 ciclo (3 min. a $95\text{ }^\circ\text{C}$ + 1 min. a $50\text{ }^\circ\text{C}$ + 2 min. a $72\text{ }^\circ\text{C}$), 30 ciclos (1 min. a $95\text{ }^\circ\text{C}$ + 1 min. $50\text{ }^\circ\text{C}$ + 2 min. $72\text{ }^\circ\text{C}$), 1 ciclo (1 min. a $50\text{ }^\circ\text{C}$ + 5 min. a $72\text{ }^\circ\text{C}$), 1 ciclo (12 h a $4\text{ }^\circ\text{C}$). Los productos de reacción (2 μL de muestra mezclados con 2 μL de solución de cargado 2 X para ADN) se visualizaron en geles de Agarosa-TAE 2 % (apéndice) a 80 mA hasta la llegada del colorante al borde del gel. Para determinar el tamaño aproximado de los insertos obtenidos se cargaron los marcadores de peso molecular del fago λ digerido con Hind III y/o del plásmido pBR 322 digerido con Msp I.

9. Secuenciación de ADN

La secuenciación se llevó a cabo siguiendo la técnica para la secuenciación de ADN de doble cadena (plásmido) de Amersham Life Science, utilizando el estuche de la Sequenase Version 2.0, T7 DNA. Describiendo brevemente, se colocaron 2.5 μL de

cada didesoxinucleótido (ddNTP) (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) en tubos eppendorf por separado por cada muestra de plásmido a secuenciar. Posteriormente, se diluyeron 2 μL de la mezcla de marcaje en 8 μL de ddH_2O y se preparó la solución de alineación del iniciador mezclando 22 μl de ddH_2O con 4 μL de NSA 10 X (apéndice) y 2 μL de HCL 1N (apéndice). Posteriormente, se preparó en baño de hielo la mezcla maestra al incluir 2 μL de Ditiotreitolo (DTT), 8 μL de la mezcla de marcaje diluida y 2 μL de $\alpha\text{-S}^{35}$ dATP. A continuación, se colocaron 200 ng (2.5 μL) del ADN plasmídico a secuenciar, 0.5 μL de NaOH 1N (apéndice) y 1 μL (3pm) del iniciador T3, T7 e iniciador interno 111-3-I TCA-CAC-TGT-TAT-CCC-TG (GIBCO BRL) diseñado a partir de secuencias nucleótidas previas (GIBCO-BRL). Esta mezcla se incubó en baño seco a 37 °C por 10 min. Terminado este tiempo, se adicionaron 7 μL de la solución de alineación sin sacar la reacción del baño de incubación, donde permaneció por 5 min. más. En este lapso de tiempo, se agregaron a la mezcla maestra 1 μl de la enzima Sequenase V 2.0, 7 μL del buffer de dilución y 0.5 μL de Pirofosfatasa. Finalizados los 5 min., se colocaron 5.5 μL de la mezcla maestra en cada la reacción de secuencia y se incubó por 5 min. a temperatura ambiente. A continuación, se adicionaron rápidamente 3.5 μL de la reacción a cada ddNTP y se incubó a 45 °C por 5 min. Por último, la reacción se paró con 4 μL de solución de término. Las reacciones fueron calentadas a 75°C por 10 min. y cargadas para su separación electroforética en un gel de secuencia (apéndice). Cada gel fue corrido a 50 W en solución TBE 1X en el tiempo indicado para la longitud de la reacción a leer. Finalizado el corrimiento, el gel se fijó al cristal por 15 min con solución fijadora del gel de secuencia de ADN (apéndice), se secó por 12 h a 60 °C (apéndice) y fue expuesto a -70 °C por 48 h a placas radiográficas X-OMAT (KODAK) de 35.6 X 43.2 cm. La secuencia obtenida fue leída y analizada en el Programa de PC/GENE de Intelligenetic Corp. y fue comparada con la de otras proteínas reportadas en bancos de datos disponibles por Internet como GenBank.

VI. RESULTADOS

1. Purificación de glicoproteínas del ECL

El carril 1 de la figura 4A muestra que el ECL está formado por una mezcla compleja de proteínas. El carril 2, muestra que la FGPS purificada a partir del ECL por medio de cromatografía de afinidad a Con A, contiene 7 glicoproteínas denominadas GP1, GP2, GP3, GP4, GP5, GP6 y GP7 con pesos moleculares de 180, 103, 96, 68, 60, 55 y 45 kDa, respectivamente. Todas éstas, excepto GP4, han sido purificadas a partir de la FGPS por electroelución y, GP2 y GP3, han sido purificadas juntas dado su corrimiento electroforético similar⁹³. De esta forma, al inicio del proyecto, la purificación de GP2-3 involucró la técnica del trabajo reportado, sin obtener resultados satisfactorios. Posteriormente, electroeluímos la región de proteínas de aproximadamente 100 kDa del ECL, P-100 kDa, mostrada en el carril 3. Esta fracción, fue pasada por la columna de sefarosa 4B-Con A para eluir a GP2-3 (103 y 96 kDa) que se muestran en el carril 4 junto con una banda de 30 kDa que probablemente corresponde a la Con A.

La figura 4B, muestra la IET de ECL, la FGPS, P-100 kDa y GP2-3 enfrentadas con una fracción de inmunoglobulinas anti-GP2-3. Los anticuerpos contenidos en la fracción antes mencionada reconocieron a las GP2 y GP3 y a dos proteínas, una de 180 kDa y otra de 80 kDa en el ECL (carril 1) y a GP1 (180 kDa), GP2-3 (103 y 96 kDa), GP4 (68 kDa) y GP5 (65 kDa) en la FGPS (carril 2). En cuanto a la fracción que contiene a P-100 kDa del ECL, se observa que en esta fracción existen 4 bandas alrededor de los 100 kDa reconocidas por las IgG's anti-GP2-3 (carril 3). Asimismo, estas IgG's reconocen a GP2-3 pura (103 y 96 kDa) y a dos glicoproteínas de 80 y 70 kDa (carril 4). Por último, el control negativo del ensayo (carril 5), presenta una membrana que contiene la FGPS enfrentada con IgG's normales de conejo donde no existe reacción inmunológica alguna.

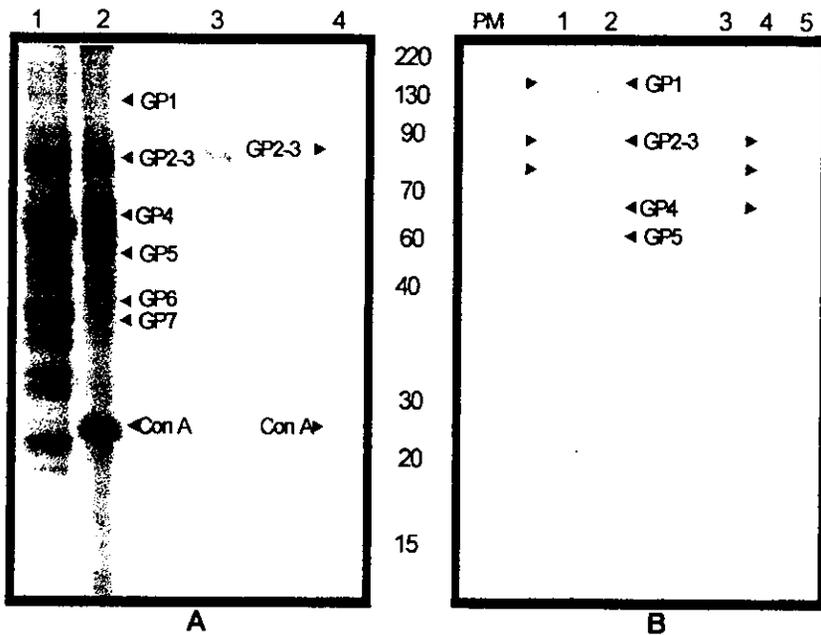


Fig. 4. A) Patrones electroforéticos (SDS-PAGE 10%) de las fracciones obtenidas en la purificación de FGPS y GP2-3 teñido con Azul de Coomassie: 1) ECL, 2) FGPS, 3) P-100 kDa y 4) GP2-3 pura. Fig. 4. B) patrones de IET de las mismas fracciones utilizando las IgG's anti-GP2-3. Como control negativo en IET se ocuparon IgG's normales de conejo enfrentadas con la FGPS (carril 5).

2. Reacción cruzada entre GP2-3 y glicoproteínas diagnósticas de *T. solium*.

La figura 5 muestra que las IgG's de conejo dirigidas contra la GP24 reconocen fuertemente a la GP24 y débilmente a 2 proteínas, una de alrededor de 100 kDa y a otra de 80 kDa contenidas en ECL (carril 1A). Estos anticuerpos, también reconocen débilmente a GP2-3 (103 y 96 kDa) y a la GP1 (180 kDa) en la FGPS (carril 1B) y a GP2-3 pura (carril 1C). Asimismo, las IgG's dirigidas contra la GP50 reconocen a esta

proteína y otras de 100, 80, 65, 60, 50 y 35 kDa en el ECL (carril 2A). Además, reconocen fuertemente proteínas de 180 (GP1), 103 (GP2), 96 (GP3), 80, 70 (GP4) y 50 (GP6) kDa en la FGPS (carril 2B) y a GP2-3 pura (carril 2C), donde también reconocen a una proteína de 80 kDa. Por otro lado, los anticuerpos anti-GP2-3 reconocen fuertemente a dos proteínas, una de 103 kDa (GP2) y otra de 96 kDa (GP3), y débilmente a proteínas de 80, 65 y 50 kDa en el ECL (carril 3A). Al mismo tiempo, estos anticuerpos también reconocen fuertemente a dos proteínas de 103 kDa (GP2) y 96 kDa (GP3), débilmente a las proteínas de 180 (GP1), 70 kDa (GP4), 60 kDa (GP5) y 55 kDa (GP6) en la FGPS (carril 3B) y reconocen a GP2-3 pura donde también reconocen a bandas de 80, 70 kDa y 60 kDa (carril 3C). Finalmente, como control negativo se utilizó una fracción de IgG's normales de conejo que no reconocen antígenos en la FGPS (carril 4B).

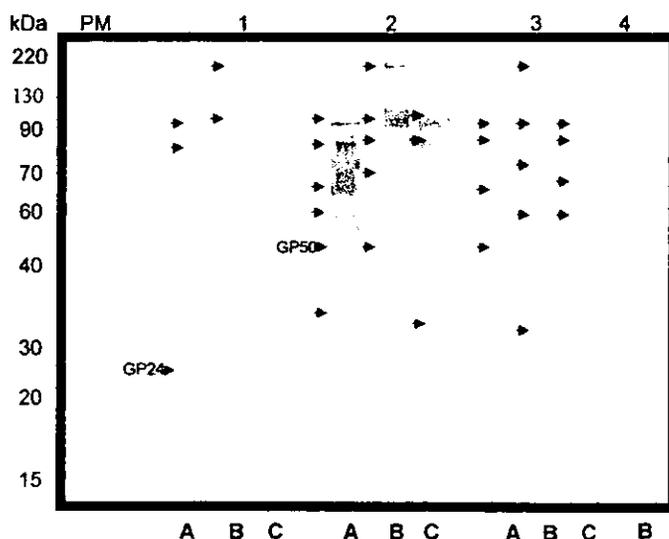


Fig. 5. Inmunolectrotransferencia que muestra el patrón de reconocimiento inmunológico de las IgG's anti-GP24 (1), anti-Gp50 (2) y anti-GP2-3 (3) enfrentadas contra: A) ECL, B) FGPS y C) GP2-3. Como control negativo se utilizaron IgG's normales de conejo (4) enfrentada con B) FGPS.

3. Evaluación del reconocimiento de la FGPS y de GP2-3 pura dado por sueros de humanos con NCC confirmada

La tabla I muestra la frecuencia y el patrón de reconocimiento de las GPS en la FGPS dado por sueros humanos con NCC confirmada por clínica, TAC y serología. Al ocupar la FGPS en el inmunodiagnóstico de la cisticercosis, se obtuvo una sensibilidad del 86 %, similar a la reportada⁹¹. Por otro lado, se observa que 13/18 sueros (72.2 %) que reconocen a alguna glicoproteína en la FGPS, reconoce a IGP2-3 pura y en la fracción. Asimismo, 11/18 sueros (61.1 %) reconocen a la GP1 y GP5, 10/18 (55.5 %) reconocen a la GP4, 6/18 (33.3 %) a la GP7 y 4/18 (22.2 %) a la GP6. Además, se observa que la mayoría de los patrones de reconocimiento incluyen a GP1 y/o a GP2-3, siendo el más frecuente GP1 + GP2-3 + GP4, dado por 3/18 sueros (16.7 %). Otros patrones observados son GP1 + GP2-3 + GP4 + GP5, las anteriores más GP7, GP5 + GP6 + GP7 o GP2-3 solamente dado por 2/18 sueros (11.1 %). Asimismo, 1/18 sueros (5.6 %) mostró reconocer a GP1 + GP2-3 + GP5, GP1 + GP4, GP4 + GP5, GP2-3 + GP6, GP2-3 + GP5 o GP1 + GP5. De esta forma, 3/21 sueros probados (14.3 %) no reconocen a ninguna GP, 2/18 sueros que reconocen a alguna banda en la FGPS (11.1 %) reconocen a una, 5/18 (27.8 %) reconocen a dos, 6/18 (33.3 %) reconocen a tres (en su mayoría GP1 y GP2-3), 2/18 (11.1 %) reconocen a cuatro o a cinco GPS, ninguno reconoce a seis y 1/21 (5.6 %) reconoce a las siete GPS. Por otro lado, las IgG's anti-GP2-3 ocupadas como control positivo, reconocen a GP2-3 y GP4 en la FGPS y a GP2-3 pura, el suero hiperinmune de conejo anti-ECL también ocupado como control positivo, reconoció a todas las GPS encontradas en la FGPS y a GP2-3 pura. Por último, los controles negativos, suero normal de conejo y suero humano negativo, no reconocieron a ninguna glicoproteína en la FGPS y ni en GP2-3 pura.

La frecuencia de reconocimiento de las diferentes GPS presentada en la tabla II, fue analizada estadísticamente para determinar si existen diferencias significativas entre el reconocimiento de las GPS y así, fundamentar la posibilidad de que algunas de ellas tengan una estructura antigénica similar. De esta forma, aunque el análisis estadístico de la diferencia entre las proporciones de dos poblaciones efectuado requiere de un

número de muestra mayor o igual a 30 para que los resultados sean representativos, se elaboró dicho análisis. De esta forma, la tabla III, muestra que no existe diferencia significativa entre el reconocimiento de GP1, GP2-3, GP4 y GP5. De igual forma, se observa que no existe diferencia significativa entre el reconocimiento de las cuatro anteriores y la GP6 y tampoco entre GP6 y GP7.

4. Especificidad de la FGPS y de GP2-3 pura (Reacciones cruzadas)

La tabla III, muestra sueros de humanos infectados con diversas parasitosis enfrentados con FGPS y GP2-3. Dos sueros de pacientes con quiste hidatídico (*E. granulosus*) poseen anticuerpos que reconocen a GP2-3 en la FGPS así como a GP2-3 pura, además, uno de ellos reconoce también a GP1 y GP4 en la FGPS. Por otro lado, sueros de individuos infectados con *Toxoplasma gondii* (2 sueros) y *Loa loa* (4 sueros) no reconocen a GP2-3, pero si reconocen débilmente a la GP4 en FGPS. Por otro lado, el control positivo (suero de humano con NCC confirmada) reconoce fuertemente a la GP2-3 y a la GP4 en la FGPS y a GP2-3 pura. El suero humano negativo no reconoció a ninguna GP en este ensayo.

Tabla I: Frecuencia y patrones de reconocimiento de las GPS en FGPS así como de GP2-3 pura en IET dado por 21 sueros de personas con NCC confirmada.

suero	Glicoproteína					
	GP1	GP2-3 (pura y en la FGPS)	GP4	GP5	GP6	GP7
7532	+	+	+	-	-	-
7809	+	+	+	-	-	+
8064	+	+	+	+	-	-
8065	+	+	+	+	-	+
8126	-	-	-	+	+	+
8140	+	+	+	+	+	+
8213	+	+	+	+	-	-
8223	-	-	-	+	+	+
8229	-	+	-	-	-	-
02-02	+	+	-	+	-	-
15-05	-	-	-	-	-	-
22-04	+	-	+	-	-	-
23-01	-	-	-	-	-	-
24-03	-	-	+	+	-	-
25-01	+	+	+	+	-	+
25-05	-	+	-	-	+	-
26-00	-	+	-	+	-	-
27-02	+	+	+	-	-	-
30-00	-	+	-	-	-	-
45-02	+	-	-	+	-	-
45-03	-	-	-	-	-	-
Negativo	-	-	-	-	-	-
Anti-GP2-3	+	+	+	-	-	-
Total +	11	13	10	11	4	6

* +: reconoció. -: no reconoció

Tabla II. Diferencias en la frecuencia de reconocimiento entre GP1, GP2-3, GP4, GP5, GP6 y GP7 obtenido por la diferencia entre las proporciones de dos poblaciones.

DIFERENCIA	GLICOPROTEÍNAS
NO	Entre GP1, GP2-3, GP4 y GP5
SI	Entre (GP1, GP2-3, GP4, GP5)* y GP6
NO	Entre GP4 y GP7
NO	Entre GP6 y GP7

*(GP1, GP2-3, GP4 y GP5) como grupo.

Tabla III. Reacción cruzada de sueros de pacientes con parasitosis como hidatidosis, toxoplasmosis y loiosis frente a la FGPS y a GP2-3 pura mediante IET.

Suero	Glicoproteína					
	GP1	GP2-3 (pura y en la FGPS)	GP4	GP5	GP6	GP7
QH	+	+	+	-	-	-
QH	+	+	-	-	-	-
Toxo	-	-	+	-	-	-
Toxo	-	-	+	-	-	-
Loa	-	-	+	-	-	-
Loa	-	-	+	-	-	-
Loa	-	-	+	-	-	-
Loa	-	-	+	-	-	-
8213 (positivo)	+	+	+	+	-	-
Negativo	-	-	-	-	-	-

QH = Quiste hidatídico; Toxo = Toxoplasmosis; Loa = Loiosis

disponibles en Internet como GenBank, mostraron que no existe una proteína similar o idéntica reportada a la GP2-3 secuenciada.

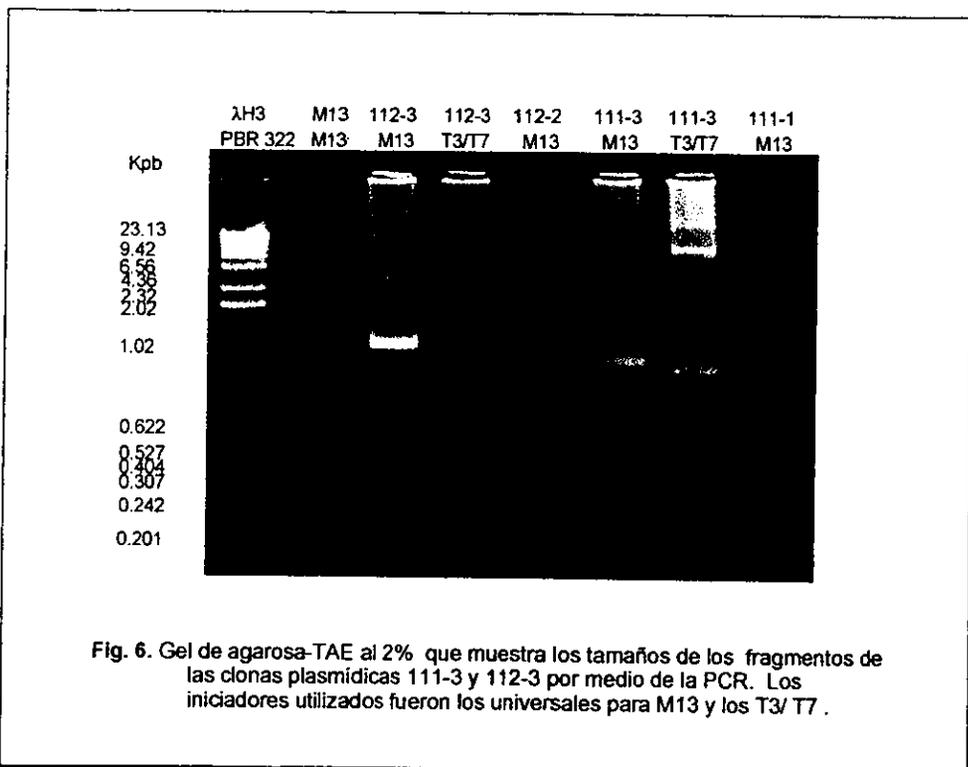


Fig. 6. Gel de agarosa-TAE al 2% que muestra los tamaños de los fragmentos de las clonas plasmídicas 111-3 y 112-3 por medio de la PCR. Los iniciadores utilizados fueron los universales para M13 y los T3/ T7 .

AGTCTCGATGCAAATATAAGTAGTAAATTAATCATTAAATTAGTAATTATATTATACAAT
 S L D A N I S S K L I I K L V I I L Y N
 TATTTCTCAGGGTCCTTCCGCTCTGTTTATTA AAAACATTCTAGTTTAATAATAACTAGT
 Y F S G S F R L F I K N I S S L I I T S
 AGTGCCTGCCAGTGTTTTTTGAAATGAATAAATGGCCGCAGTATATTGACTGTGCAAAG
 S A C P V F F E M N K W P Q Y I D C A K
 GTAGCAATAATTAATGCCTTTTAATTGGGGGCTTGTTTGAATGGTTTGACGTGAGAGAT
 V A I I N C L L I G G L F E W F D V R D
 GCGAATATTAGTATTAATTTGAATTTGGTGTAGGGATACAGAATTCCTTAATGTTTAAT
 A N I S I N L N L V L G I Q N S L M F N
 AAGACGGAAAGACCCTGGGATCTTTTTTTTCGCTTGGGGCAAGTTTCATTATTTCAATG
 K T E R P W D L F F S L G A S F I I S M
 AAATTAGGAATCTTAAGTATAGATTATTGGGTTAAGTTACCC **CAGGGTAACAGTGTGATA**
 K L G I L S I D Y W V K L P **Q G N S V** I
 ATTAATAAGAGATCTTATCGAATTAATGTTTGCACCTCGATGTGACTTAGGTTTAGAA
 I N K R **S Y R I N C L P P R C D L G L E**
 TTTAGGTGTAGTAGCTTAGATTTATGGTCTGTTTCGACCGTATTGACCTTCATGAGTTGAG
 F R C **S S L D L W S V R P Y -**
 TTAAGACCGGTGTGAGCCAGGTCGGTCTTATCTATTGTAGAAGTTTATCAGTACGAAAG
 GATAGTAAGCTTTTTTATTA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

Fig. 7. Secuencia nucleotídica y de aminoácidos del inserto de la clona 111-3 (0.8 kpb) aislada de la biblioteca de cDNA de *T. solium*. En el recuadro se muestra el iniciador 111-3-I diseñado para la secuencia nucleotídica, en negritas se muestran los cuatro sitios de N-glicosilación y en negritas cursiva los posibles sitios de O-glicosilación presentes en la secuencia de aminoácidos. En cursivas, se muestra el codón de término TGA y la cola de poli adenilación.

VII. DISCUSIÓN

La presencia de glicoproteínas en el ECL reconocidas por anticuerpos en suero de pacientes con NCC, se ha reportado en estudios como el realizado por Grogl en 1985 y Parkhouse en 1987. Estos resultados, han propuesto la purificación de las GPS de *T. solium* para utilizarlas como antígenos en el inmunodiagnóstico de la cisticercosis humana y porcina. Entre las técnicas de purificación implementadas para la obtención de estos antígenos, se encuentran el enfoque isoeléctrico⁷⁴, la cromatografía de afinidad a anticuerpos monoclonales¹²³ y la cromatografía de afinidad a lectinas como LCA¹⁷¹ y Con A⁹¹. Esta última estrategia, nos permitió obtener una fracción rica en glicoproteínas (FGPS) de composición más simple que el ECL (Ver Fig. 4), formada por siete GPS, de las cuales, GP2 (103 kDa) y GP3 (96 kDa) fueron el tema de estudio. El comovimiento electroforético similar entre estas dos GPS, llevó a purificarlas conjuntamente a partir de la fracción de proteínas de P-100 kDa electroeluida del ECL. Esta estrategia nos permitió disminuir la cantidad de glicoproteínas compitiendo por la Con A (en comparación con lo que ocurre con el ECL completo) y mejorar el rendimiento de la purificación, de tal forma, que obtuvimos a la GP2-3 en cantidad suficiente (0.7 µg) para la evaluación de su potencial diagnóstico.

Para determinar que la GP2-3 purificada por el método propuesto no sufre alteración antigénica, se realizaron ensayos de IET enfrentando la fracción de IgG's anti-GP2-3 con la FGPS y la GP2-3 pura. Los resultados de la Fig. 4 B muestran que los anticuerpos reconocen a una gran variedad de proteínas en el ECL y en la FGPS. Sin embargo, se observa que el patrón de reconocimiento se va simplificando a medida que se purifican los antígenos. Por ejemplo, se observa que 4 bandas proteicas son fuertemente reconocidas por el anti-GP2-3 en la fracción de P-100 kDa, pero solo se reconocen 2 (103 y 96 kDa) en la GP2-3 pura. Resultados similares se han observado en otros estudios, donde la obtención de fracciones glicoproteicas^{131, 171} y glicoproteínas puras a partir del ECL^{91, 136}, ha disminuido las reacciones cruzadas que se presentan al ocupar este último como antígeno en pruebas inmunodiagnósticas. Por

otro lado, las IgG's anti-GP2-3 reconocen a una banda de 180 kDa y a otras de 80, 68 y 65 kDa en el ECL y en la FGPS. El que estos anticuerpos reconozcan varias proteínas por arriba y por debajo de los 103 y 96 kDa se puede explicar de 2 maneras. La primera, podría indicar que las GPS de peso molecular por debajo de la GP2-3 son productos de degradación de la misma y, la segunda, que existen residuos de carbohidratos comunes entre las diferentes GPS estudiadas.

Las LL-GPS purificadas por V. Tsang en 1989 más frecuentemente reconocidas por personas con NCC son la GP50 (84 a 85 %) y la GP24 (67 a 94 %) ^{44, 160, 171, 172}. Éstas, son obtenidas por cromatografía de afinidad a LCA, lectina que al igual que Con A, reconoce secuencias de α -D-manosa y α -D-glucosa. De esta forma, se podría pensar que alguna de las LL-GPS son similares a las de la FGPS ⁹¹, o bien, que poseen una elevada reacción cruzada entre ellas por la similitud en su composición de carbohidratos. Los resultados demuestran que IgG's anti-GP50 reconocen diversas bandas proteicas en el ECL de peso molecular entre 100 y 30 kDa, así como a GP1 (180 kDa) y a GP2-3 (103 y 96 kDa) en la FGPS y a la GP2-3 pura. Al respecto, se puede pensar que la GP50 es un fragmento proteolítico de una proteína de mayor peso molecular o, que por su composición de carbohidratos, cruza inmunológicamente con aquéllos de la GP1 y GP2-3. Asimismo, IgG's anti-GP24 reaccionan levemente en la región de P-100 kDa en el ECL y reconocen muy levemente a la GP2-3 en la FGPS y a la GP2-3 pura. Al respecto, también observamos que IgG's anti-GP2-3 no reconocen bandas de menos de 50 kDa en el ECL y en la FGPS. De esta forma, podríamos pensar que la GP24 no esté relacionada con la GP2-3 y GP50 y que la débil reacción se deba a componentes carbohidratos que se compartan entre ellas. Cabe mencionar, que no se incluyó el antígeno B en los ensayos anteriores pese a que es el antígeno más frecuentemente reconocido y con un peso molecular similar al de GP2-3. La razón por la cual no se llevó a cabo este experimento fue porque previamente se demostró por IEF e IET que este antígeno no existe en la FGPS obtenida por medio de Sefarosa 4B-Con A ⁹¹. Este resultado, dio la pauta para estudiar el potencial del uso de la GP2-3 en el inmunodiagnóstico de la cisticercosis ya que, dadas las características mencionadas del AgB, éste no presenta gran utilidad diagnóstica ^{39, 67, 85, 103, 138}.

El disponer de la GP2-3 pura y en la FGPS, permitió realizar ensayos de IET utilizando sueros de personas con NCC confirmada. Los resultados demostraron que la FGPS es 86 % sensible en IET, resultado similar al obtenido con anterioridad por ELISA (85 %), donde no se pudo determinar cuales GPS son las más frecuentemente reconocidas. En este proyecto, determinamos que la glicoproteína más frecuentemente reconocida en la FGPS es la GP2-3, por 13/18 sueros (72.2 %) inmunoreactivos. Además, la GP2-3 se reconoce con la misma frecuencia en su forma pura y en la FGPS. Por otro lado, existe una gran heterogeneidad en los patrones de reconocimiento de las FGPS y, en general, cada paciente reconoce a diferentes glicoproteínas probablemente por su condición clínica específica, número de parásitos, su localización y viabilidad. Estas condiciones, se sabe que son responsables de la variabilidad en los patrones de reconocimiento de las LL-GPS¹²⁵. Es decir, se ha comprobado que el método de Tsang es hasta 98 % sensible en personas que poseen lesiones múltiples, sin embargo este valor disminuye hasta 34 % en pacientes con un cisticerco viable y no detecta anticuerpos en suero de personas con calcificaciones¹⁸¹. Además, se ha observado que en estudios de campo, donde se incluye a personas con, sin o secuelas de la NCC, los valores de sensibilidad y especificidad de la prueba diagnóstica disminuyen considerablemente¹⁵⁴. Asimismo, al inicio de la infección experimental en cerdo, se ha observado que la primera GP reconocida es GP97 cuyo reconocimiento desaparece a medida que progresa el tiempo de la infección y se comienzan a reconocer GP42-39, GP50 y GP24, glicoproteínas que inducen al desarrollo de anticuerpos que se presentan hasta los 5 meses de la infección^{29, 144, 172}. También, se ha observado que este método es 100 % sensible y específico para cerdos experimentalmente infectados, pero este valor baja a 64.7 % y 59.1 %, respectivamente, para cerdos naturalmente infectados con carga parasitaria baja^{144, 157}.

De acuerdo con los resultados obtenidos al comparar las diferencias significativas entre las frecuencias de reconocimiento de las diferentes GPS, observamos que no existen diferencias significativas entre las frecuencias de reconocimiento de GP1, GP2-3, GP4 y GP5. Este resultado lleva a pensar seriamente

en la existencia de secuencias de residuos de carbohidrato muy semejantes entre estas glicoproteínas o sugiere que son productos proteolíticos de alguna GP de mayor peso molecular. Finalmente, la similitud de las frecuencias de reconocimiento de GP1, GP2-3, GP4 y GP5 dado por sueros de personas con NCC es concuerda al observado con las IgG's anti-GP2-3 en la fig. 4 B, donde estos anticuerpos reconocen tanto a GP1 como a GP2-3, GP4 y GP5 en la FGPS.

Las reacciones cruzadas entre antígenos de *T. solium* y los de otros parásitos son bien conocidas, especialmente con antígenos del céstodo *E. granulosus*, agente etiológico de la hidatidosis^{23, 44, 64, 96, 120, 129, 131}. Previo a este estudio, se sabía que anticuerpos en suero de algunas personas con hidatidosis reconocen algún componente en la FGPS por ELISA, sin embargo suero de personas con otras parasitosis (loiosis, toxoplasmosis, ascariosis, oncocercosis, strongiloidosis, y triquinosis) no reconocen nada en la FGPS⁹¹. En el presente estudio, se observó por IET que existen anticuerpos en suero de personas con quiste hidatídico que reconocen débilmente a GP1, GP2-3 y GP4, probablemente por los residuos de carbohidratos comunes que estas presentan. El punto a considerar es que, la probabilidad de que se presenten falsos positivos al ocupar a la FGPS o GP2-3 para el diagnóstico serológico de la cisticercosis en México es muy baja, ya que esta parasitosis es endémica en países especialmente productores de ganado ovino y se han reportado casos muy aislados de ella en nuestro país¹⁶⁷. Por otro lado, el que anticuerpos en suero de personas parasitadas con un protozooario como *T. gondii* o una filaria como *L. loa* también reconozcan a GP4, indican que ésta proteína no es útil para uso diagnóstico. Al respecto también es necesario recordar que la loiosis no se presenta en nuestro país ya que se limita a las selvas ecuatorianas pantanosas y oscuras, y a zonas vecinas de África y América^{11, 43, 110} y que la toxoplasmosis, aunque es común en México, solo se indica su diagnóstico cuando pone en riesgo la vida del feto o de personas infectadas con el virus de la Inmunodeficiencia Humana (HIV)¹⁶⁹.

En resumen, las glicoproteínas GP2 y GP3, poseen un corrimiento electroforético similar y son reconocidas simultáneamente por los sueros y anticuerpos ensayados. Asimismo, son reconocidas por el 72.2 % de sueros inmunoreactivos de pacientes con NCC confirmada, muestran débil reacción cruzada con suero de pacientes parasitados por *E. granulosus* y no son reconocidas por sueros de pacientes con otras parasitosis. Este último acontecimiento posiblemente está dado por los carbohidratos, evento que se elimina, al aislar una clona de expresión del cADN que codifica solamente para la parte proteica de esta glicoproteína. Los resultados mencionados, también nos sugieren que GP3 es un producto de degradación de GP2, o bien, que ambas proteínas son péptidos que forman parte de otra más grande. Así pues, el disponer de un anticuerpo específico anti-GP2-3 y de una biblioteca de expresión construida en el vector λ Zap II, nos permitió aislar el cADN que codifica para GP2 y/o GP3. Los resultados obtenidos de la secuencia nucleotídica del cADN constan de 639 nucleótidos que codifican para una proteína de 20 kDa, que es muy pequeña si consideramos el tamaño de la GP2-3 (100 kDa). Asimismo, debemos considerar que no encontramos el codón de inicio (ATG) y que solo encontramos el codón de terminación TGA y la señal y residuos poliadenilación (parte carboxilo), lo que sugiere que la clona no está completa. De esta forma, el análisis de la secuencia de aminoácidos dada por el cADN aislado indican esta proteína posee, al menos, 4 sitios de N-glicosilación con la secuencia consenso Asparagina (N)-Xaa-Serina (S)/ Treonina (T), donde Xaa es cualquier aminoácido excepto Prolina (P). Esta proteína también presenta 6 residuos de Tirosina (Y), 13 residuos adicionales de Serina y uno de Treonina, que pueden formar parte de sitios potenciales de O-glicosilación. Asimismo, muestra 6 residuos de Cisteína (C) que pueden participar en la creación de puentes de disulfuro y 6 residuos de Prolina (P), que por su rigidez molecular, pueden cambiar drásticamente la dirección de la proteína en su estructura secundaria formando giros β . Además, 115/174 aminoácidos de la proteína son aminoácidos no polares, distribuidos en grupos de 2 a 7 separados por 1 o 6 aminoácidos polares. Las características antes mencionadas y en particular los sitios de glicosilación y el reconocimiento por los anticuerpos anti-GP2-3 de la proteína de

fusión expresada por la clona 111-3, sugieren que disponemos de una parte de la proteína GP2-3.

El problema del inmunodiagnóstico de la cisticercosis seguirá retando día con día a todos aquellos involucrados en la búsqueda de antígenos altamente específicos y sensibles. Uno de los problemas a afrontar es la heterogeneidad de los niveles de anticuerpos circulantes anti-cisicercos en individuos con NCC, que como se mencionó, dependen del individuo mismo, del número y sitio donde se albergan los cisticercos, de su viabilidad y del tiempo que lleven parasitando al hospedero^{126, 143, 181}. Asimismo, es necesaria la purificación de antígenos que no reaccionen cruzadamente con los de otros parásitos, principalmente con los de *E. granulosus*, ya que se ha observado que la utilización de ECL y FV de *T. solium* no resuelven este problema^{25, 64, 96, 120, 125, 129, 131, 142}. Por otro lado, el desarrollar pruebas serodiagnósticas implica mantener sus valores de sensibilidad altos aún al aplicarla a población abierta¹⁵³ y, que el antígeno ocupado, sea accesible y fácilmente purificable. Al respecto, se han implementado diferentes métodos para la purificación de antígenos, especialmente glicoproteínas, y hasta ahora solo técnicas como la cromatografía de afinidad a lectinas y el enfoque isoeléctrico han facilitado su obtención. Por desgracia, la primera, como se pudo corroborar en este estudio, es laboriosa e implica varias etapas en donde existe frecuente manipulación de la muestra y la segunda, aunque solo abarca un solo paso, requiere de equipo especial y de reactivos caros^{73, 74}. De esta forma, la producción de antígenos recombinantes como la proteína de 10 kDa de FV de *T. solium*²⁷ van a permitir obtener grandes cantidades del antígeno específico puro de composición definida que permitirá estandarizar la cantidad de antígeno en los métodos diagnósticos y resolver problemas de sensibilidad y especificidad con técnicas más sencillas.

En este estudio, observamos que la GP2-3 es un antígeno potencialmente útil para el inmunodiagnóstico de la cisticercosis por *T. solium*. Asimismo, observamos que anticuerpos específicos en contra de GP2-3, reconocen a la GP50 (antígeno diagnóstico reconocido por el 85 % de pacientes) de la fracción de LL-GPS de V. Tsang, probablemente porque GP50 posee epítopes carbohidratos y/o proteicos

similares a GP2-3. Estos resultados, respaldados con el reconocimiento de la clona 111-3 dado por IgG's anti-GP50 y con la débil reacción de GP2-3 con suero de personas parasitadas con el céstodo *E. granulosus* observada en este trabajo, pero no con otros parásitos, nos llevó a concluir la utilidad de GP2-3 como proteína de fusión para el diagnóstico de la cisticercosis humana y porcina. De esta manera, el disponer de GP2-3 como proteína de fusión, abre las posibilidades de mejorar el inmunodiagnóstico de esta parasitosis, ya que se disminuyen problemas como las reacciones cruzadas dadas por los residuos de carbohidratos y la limitante de antígeno específico para la estandarización de las técnicas actuales.

Finalmente, este trabajo presenta la identificación del antígeno GP2-3, la clonación de su cADN y la producción de su forma recombinante (parte carboxilo) con potencial de uso en el diagnóstico de la cisticercosis. Asimismo, el disponer de una región del gen que codifica para GP2-3, permitirá clonar al gen completo, lo que a su vez, permitirá producir las proteínas recombinantes completas o parciales de este antígeno que ayudarán a mejorar los métodos de diagnóstico disponibles actualmente.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Acevedo-Hernández A. **Economic impact of porcine cysticercosis.** En **Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives.** Eds. Flisser A, Willms K, Lacleste JP, Larralde C, Ridaura C, Beltrán F. New York, Academic Press: 63-7. 1982.
2. Allan JC, Ávila G, Garcia NJ, Flisser A, Graig PS. (1990). **Immunodiagnosis of taeniasis by coproantigen detection.** Parasitol. 101: 473-77.
3. Allan JC, Mencos F, Garcia NJ, Sarti E, Flisser A, Wang Y, Liu D, Craig PS. (1993). **Dipstick dot ELISA for the detection of *Taenia* coproantigens in humans.** Parasitol. 107: 79-85.
4. Allan JC, Velasquez TM, Fletes C, Torres AR, Lopez VG, Yurritia P, Soto de Alfaro H, Rivera A, García NJ. (1997). **Mass chemotherapy for intestinal *Taenia solium* infection: effect on prevalence in humans and pigs.** Trans R Soc Trop Med Hyg. 91: 595-98.
5. Allan JC, Velasquez TM, Torres AR, Yurritia P, Garcia NJ. (1996). **Field trial of the coproantigen-based diagnosis of *Taenia solium* taeniasis by enzyme-linked immunosorbent assay.** Am J Trop Med Hyg. 54 (4): 352-56.
6. Arechavaleta F, Molinari JL, Tato P. (1998). **A *Taenia solium* metacestode factor nonspecifically inhibits cytokine production.** Parasitol Res. 84: 117-22.
7. Baily GG, Mason PR, Trijssenar FEJ, Lyons NF. (1988). **Serological diagnosis of neurocysticercosis: evaluation of ELISA tests using cyst fluid and other components of *Taenia solium* cysticerci antigens.** Trans R Soc Trop Med Hyg. 82: 295-99.
8. Beltrán F. **Discussion: epidemiology and economic impact of cysticercosis.** En **Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives.** Eds. Flisser A, Willms K, Lacleste JP, Larralde C, Ridaura C, Beltrán F. New York, Academic Press: 99-103. 1982.

9. Biondi FG, Mucciolo RG, Nunes CM, Richtzenhain LJ. (1996). **Immunodiagnosis of swine cysticercosis by indirect ELISA employing heterologous antigen from *Taenia crassiceps* metacestode.** Vet Parasitol. 64: 261-66.
10. Boyer RF. **Modern experimental Biochemistry.** Benjamin/Cummings Publishing Co. Inc. USA. Chapter 6. 1993.
11. Brown WH, Neva AF. **Parasitología clínica.** Nueva Editorial Interamericana S.A. de C.V. México. Quinta Edición: 165-66. 1985
12. Bueno EC, Vaz AJ, Machado LD, Livramiento JA, Mielle SR. (2000). **Specific *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* antigenic peptides for neurocysticercosis immunodiagnosis using serum samples.** J Clin Microbiol. 38 (81): 146-51.
13. Burger CJ, Rikihisa Y, Lin YC. (1986). ***Taenia taeniaeformis*: inhibition of mitogen induced proliferation and Interleukin-2 production in rat splenocytes by larval *in vitro* product.** Exp Parasitology. 62: 216-22.
14. Carrasco JM. (1977). **La cisticercosis porcina en el estado de Sonora.** Salud Pública de México. 19 (2). 255-61.
15. Corona T, Pascoe D, González BD, Abad P, Landa L, Estañol B. (1986). **Anticysticercous antibodies in serum and cerebrospinal fluid in patients with cerebral cysticercosis.** J Neurol., Neurosurg and Psychiatry. 49: 1044-49.
16. Correa D, Dalma D, Espinoza B, Plancarte A, Rabiela MT, Madrazo I, Gorodezky C, Flisser A. (1985). **Heterogeneity of humoral immune components in human cysticercosis.** J Parasitol. 71 (5): 535-41.
17. Correa D, Sandoval MA, Harrison LJS, Michael R, Parkhouse E, Plancarte A, Meza LA, Flisser A. (1989). **Human neurocysticercosis: comparison of enzyme immunoassay capture techniques based on monoclonal and polyclonal antibodies for the detection of parasite products in cerebrospinal fluid.** Trans R Soc Trop Med Hyg. 83: 814-16.
18. Cruz I, Cruz ME, Teran W, Schantz PM, Tsang V, Barry M. (1994). **Human subcutaneous *Taenia solium* cysticercosis in an Andean population with neurocysticercosis.** Am J Trop Med Hyg. 51 (4): 405-7.

19. Cruz RC, Rosas G, Fragoso G, López CF, Toledo A, Larralde C, Sciutto E. (2000). ***Taenia crassiceps* cysticercosis: protective effect and immune response elicited by DNA immunization.** J Parasitol. 86 (1): 67-74.
20. Chacón RA, De la Cruz OMC, Gómez VA, Valencia RS, Wong CM. (1996). **Manual de técnicas para el diagnóstico de parasitosis intestinal.** Instituto Nacional de Pediatría, Servicio de Parasitología. México D.F. 1996.
21. Chang YW, Hong HZ, Ling YG. (1992). **A Mab-based ELISA for detecting circulating antigen in CSF of patients with neurocysticercosis.** Hybridoma. 11 (6): 825-27.
22. Chapman A, Vallejo V, Mossie KG, Ortiz D, Agabian N, Flisser A. (1995). **Isolation and characterization of species-specific DNA probes from *Taenia solium* and *Taenia saginata* and their use in an egg detection assay.** J Clin Microbiol. 33 (5): 1283-88.
23. Cheng RWK, Ko RC. (1992). **Purification of larval *Taenia solium* antigens by gel filtration.** Vet Parasitol. 43: 65-73.
24. Cheng RWK, Ko RC. (1991). **Cross-reactions between crude antigens of larval *Taenia solium* (*Cysticercus cellulosae*) and other helminths of pigs.** Vet Parasitol. 39: 161-70.
25. Cho SY, Kong Y, Kim SI, Kang SY. (1992). **Measurement of 150 kDa of *Taenia solium* metacestodes by antibody-sandwich ELISA in cerebrospinal fluid of neurocysticercosis patients.** Korean J Parasitol. 30 (4): 299-307.
26. Choromanski L, Estrada JJ, Kuhn RE. (1990). **Detection of antigens of larval *Taenia solium* in cerebrospinal fluid of patients with the use of HPLC and ELISA.** J Parasitol. 76 (1): 69-73.
27. Chung JY, Bahk YY, Huh S, Kang SY, Kong Y, Cho SY. (1999). **A recombinant 10-kDa protein of *Taenia solium* metacestodes specific to active neurocysticercosis.** J Inf Dis. 180: 1307-15.
28. De Aluja AS, Vargas G. (1988). **The histopathology of porcine cysticercosis.** Vet Parasitol. 28: 65-77.

29. De Aluja AS, Villalobos AN, Plancarte A, Rodarte LF, Hernández M, Zamora C, Sciutto E. (1999). **Taenia solium cysticercosis: immunity in pigs induced by primary infection.** *Vet Parasitol.* 81 (2): 129-35.
30. Del Brutto OH, Sotelo J. (1988). **Neurocysticercosis: an update.** *Rev Inf Dis.* 10 (6): 1075-87.
31. Dempster RP, Robinson CM, Harrison GBL. (1996). **Parasite vaccine development: large-scale recovery of immunogenic *Taenia ovis* fusion protein GST-45W (B/X) from *Escherichia coli* inclusion bodies.** *Parasitol Res.* 82: 291-96.
32. Despommier DD. (1993). **Tapeworm infection - The long and short of it.** *New Eng J of Med.* 327 (10): 727-28.
33. Díaz CSP, Candil RA, Uribe BM, Willms K. (1990). **Serology as an indicator of *Taenia solium* infections in a rural community in Mexico.** *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 84:563-66.
34. Díaz CSP, Candil RA, Suate PV, Suate PV, Zazueta RML, Felix MM, Lozano R, Willms K. (1991). **Epidemiological study and control of *Taenia solium* infections with praziquantel in a rural village of Mexico.** *Am J Trop Med Hyg.* 45 (4): 522-31.
35. Díaz F, García HH, Gilman RH, Gonzales AE, Castro M, Tsang VCW, Pilcher JB, Vásquez LE, Lescano M, Carcamo C, Madico G, Miranda E. (1992). **Epidemiology of taeniasis and cysticercosis in a Peruvian village.** *Am J Epidemiol.* 135 (8): 875-82.
36. Dunbar BS. **Protein blotting, a practical approach.** IRL Press. USA. 1994.
37. Earnest MP, Reller BL, Filley CM, Grek AJ. (1987). **Neurocysticercosis in the United States: 35 cases and a review.** *Rev Inf Dis.* 9 (5): 961-79.
38. Espinoza B, Ruiz PG, Tovar A, Sandoval MA, Plancarte A, Flisser A. (1986). **Characterization by enzyme-linked immunosorbent assay of the humoral response in patients with neurocysticercosis and its application in immunodiagnosis.** 24 (4): *J Clin Microbiol.* 536-41.
39. Espinoza B, Flisser A, Plancarte A, Larralde C. **Immunodiagnosis of human cysticercosis ELISA and immunoelectrophoresis.** En: **Cysticercosis: present**

-
- state of knowledge and perspectives. Eds. Flisser A, Willms K, Lacleste JP, Larralde C, Ridaura C, Beltrán F. New York, Academic Press: 163-71. 1982.
40. Estrada JJ, Kuhn RE. (1985). **Immunochemical detection of antigens of larval *Taenia solium* and anti-larval antibodies in the cerebrospinal fluid of patients with neurocysticercosis.** J Neurol Sci. 71: 39-48.
41. Evans C, Garcia HH, Gilman RH, Friedland JS. (1997). **Controversies in the management of cysticercosis.** Emerging Inf Dis. 3 (3): 403-5.
42. Fan PC, Ma YX, Kuo CH, Chung WC. (1998). **Survival of *Taenia solium* cysticerci in carcasses of pigs kept at 4°C.** J Parasitol. 84 (1): 174-75.
43. Faust EC, Russel PF, Jung RC. **Parasitología clínica.** Salvat Editores. España: 20-2, 502-7. 1974.
44. Feldman M, Plancarte A, Sandoval M, Wilson M, Fisser A. (1990). **Comparison of two assays (EIA and EITB) and two samples (saliva and serum) for the diagnosis of neurocysticercosis.** Trans R Soc Trop Med Hyg. 84: 559-62.
45. Fischer C, Nosratián R, Hantemichael N, Tolle R, Reimenschneider V, Geyer E. (1994). **Preparation and sequence analysis of *Taenia crassiceps* metacestode recombinant antigens with potential for specific immunodiagnosis of human cerebral cysticercosis.** Trop Med Parasitol. 45: 324-28.
46. Flisser A, Gonzalez D, Shkurovich M, Madrazo I, Correa D, Rodriguez CJ, Cohen S, Rodriguez del Rosal E, Collado M, Fernandez B, Fernandez F, De Aluja AS. (1990). **Praziquantel treatment of porcine brain and muscle *Taenia solium* cysticercosis. 1. Radiological, physiological and histopathological studies.** Parasitol Res. 76:263-69.
47. Flisser A, Madrazo I, Delgado H. **Cisticercosis humana.** El Manual Moderno SA de CV, México. 1997.
48. Flisser A, Reid A, Garcia ZE, McManus DP. (1988). **Specific detection of *Taenia saginata* eggs by DNA hybridization.** Lancet i: 1429-30.
49. Flisser A. (1988). **Neurocysticercosis in Mexico.** Parasitol Today. 4 (5): 131-7.
50. García DC, Correa D, Rabiela MT, Flisser A. (1991). **Praziquantel treatment of muscle *Taenia solium* cysticercosis. 4. Reversible *in vitro* effect.** Parasitol Res. 77: 691-96.

51. Garcia E, Ordoñez G, Sotelo J. (1995). **Antigens from *Taenia crassiceps* cysticerci used in complement fixation, enzyme-linked immunosorbent assay, and Western Blot (immunoblot) for diagnosis of neurocysticercosis.** (1995). *J Clin Microbiol.* 33 (12): 3324-25.
52. Garcia GML, Torres M, Correa D, Flisser A, Sosa LA, Velasco O, Meza LA, Plancarte A, Ávila G, Tapia R, Aguilar L, Mandujano A, Alcántara I, Morales Z, Salcedo A, Mañón ML, Valdespino GJL. (1999). **Prevalence and risk of cysticercosis and taeniasis in an urban population of soldiers and their relatives.** *Am J Trop Med Hyg.* 61 (3): 386-89.
53. García HH, Gilman R, Martínez M, Tsang VCW, Pilcher JB, Herrera G, Díaz F, Alvarado M, Miranda E. (1993). **Cysticercosis as a major cause of epilepsy in Peru.** *Lancet.* 341: 197-200.
54. Garcia HH, Gilman RH, Catacora M, Verastegui M, Gonzalez AE, Tsang VCW. (1997). **Serologic evolution of neurocysticercosis patients after antiparasitic therapy.** *J Inf Dis.* 175: 486-89.
55. Garcia HH, Gilman RH, Horton J, Martinez M, Herrera G, Altamirano J, Cuba JM, Rios-Saavedra N, Verastegui M, Boero J, Gonzalez AE. (1997). **Albendazole therapy for neurocysticercosis: a prospective double-blind trial comparing 7 versus 14 days of treatment.** *Neurol.* 48: 1421-27.
56. Garcia HH, Gilman RH, Tovar MA, Flores E, Jo R, Tsang VCW, Diaz F, Torres P, Miranda E. (1995). **Factors associated with *Taenia solium* cysticercosis: analysis of nine hundred forty-six Peruvian neurologic patients.** *Am J Trop Med Hyg.* 52 (2): 145-48.
57. Garcia HH, Gilman RH, Tsang VCW, Gonzalez AE. (1997). **Clinical significance of neurocysticercosis in endemic villages.** *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 91: 176-78.
58. Garcia HH, Harrison LJS, Parkhouse RME, Montenegro T, Martinez SM, Tsang VCW, Gilman RH. (1998). **A specific antigen-detection ELISA for the diagnosis of human cysticercosis.** *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 92: 411-14.
59. Garcia HH, Herrera G, Gilman RH, Tsang VCW, Pilcher JB, Diaz J, Candy EJ, Miranda E, Naranjo J. (1994). **Discrepancies between cerebral Computed**

- Tomography and Western Blot in the diagnosis of cysticercosis.** Am J Trop Med Hyg. 50 (2): 152-57.
60. Garcia HH, Martinez M, Gilman R, Herrera G, Tsang VCW, Pilcher JB, Díaz F Verastegui M, Gallo C, Porras M, Alvarado M, Naranjo J, Miranda E. (1991). **Diagnosis of cysticercosis in endemic regions.** Lancet. 338: 549-51.
61. Geerts S. (1995). **Cysticercosis in Africa.** Parasitol Today. 11: 389.
62. Gonzalez AE, Cama V, Gilman RH, Tsang VCW, Pilcher JB, Chavera A, Castro M, Montenegro T, Verastegui M, Miranda E, Bazalar H: (1990). **Prevalence and comparison of serologic assays, necropsy, and tongue examination for the diagnosis of porcine cysticercosis in Peru.** Am J Trop Med Hyg. 43 (2); 194-99.
63. Gonzalez AE, Gilman R, Garcia HH, McDonald J, Kacena K, Tsang VCW, Pilcher JB, Suárez F, Gavidia C, Miranda E. (1994). **Use of sentinel pigs to monitor environmental *Taenia solium* contamination.** Am J Trop Med Hyg. 51 (6); 847-50.
64. Goodman GA, Rall TW, Nies AS, Taylor P. **Las bases farmacológicas de la terapéutica.** Editorial Médica Panamericana. México. Octava Edición, Capítulo X.
65. Gottstein B, Tsang VCW, Schantz PM. (1986). **Demonstration of species-specific and cross-reactive components of *Taenia solium* metacestode antigens.** Am J Trop Med Hyg. 35 (2): 308-13.
66. Greene RM, Wilkins PP, Tsang VCW. (1999). **Diagnostic glycoproteins of *Taenia solium* cysts share homologous 14- and 18-subunits.** Molec Biochem Parasitol. 99 : 257-61.
67. Grogl M, Estrada JJ, MacDonald G, Kuhn R. (1985). **Antigen-antibody analyses in neurocysticercosis.** J. Parasitol. 71 (84): 433-42.
68. Guerra G, Flisser A, Cañedo L, Lacleste JP. **Biochemical and immunological characterization of Antigen B purified from cysticerci of *Taenia solium*.** En **Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives.** Eds. Flisser A, Willms K, Lacleste JP, Larralde C, Ridaura C., Beltrán F. New York, Academic Press: 437-51. 1982.
69. Harrison GBL, Heath DD, Dempster RP, Lawrence SB, Lightowers MW, Rickard MD. (1993). **Identification of host-protective antigens of *Taenia ovis* oncospheres.** Int J Parasitol. 23 (1): 41-50.

70. Harrison LJS, Delgado J, Parkhouse RME. (1990). **Differential diagnosis of *Taenia saginata* and *Taenia solium* with DNA probes.** *Parasitol.* 100: 459-61.
71. Harrison LJS, Joshua GWP, Wright SH, Parkhouse RME. (1989). **Specific detection of circulating surface/secreted glycoproteins of viable cysticerci in *Taenia saginata* cysticercosis.** *Parasite Immunol.* 11: 351-70.
72. Hernandez M, Beltrán C, García E, Fragoso G, Gevorkian G, Fleury A, Parkhouse M, Harrison L, Sotelo J, Sciutto E. (2000). **Cysticercosis: towards the design of a diagnostic kit based on synthetic peptides.** *Immunol lett.* 71 (1): 13-17.
73. Hubert K, Andriantsimahavandy A, Michault A, Frosch M, Muhlschlegel FA. (1999). **Serological diagnosis of human cysticercosis by use of recombinant antigens from *Taenia solium* cysticerci.** *Clin Diag Lab Immunol.* 6 (4): 479-82.
74. Ito A. (1997). **Basic and applied immunology in cestode infections: from *Hymenolepis* to *Taenia* and *Echinococcus*.** *Int J Par.* 27 (10): 1203-11.
75. Ito A, Plancarte A, Yoon KLM, Flisser A, Cho SY, Liu YH, Kamhawi S, Lightowers MW, Schantz PM. (1998). **Novel antigens for neurocysticercosis: simple method for preparation and evaluation for serodiagnosis.** *Am J Trop Med Hyg.* 59 (2): 291-94.
76. Johnson KS, Harrison GBL, Lightowers MW, O'Hoy KL, Cogle WG, Dempster RP, Lawrence SB, Vinton JG, Heath DD, Rickard MD. (1989). **Vaccination against ovine cysticercosis using a defined recombinant antigen.** *Nature.* 338: 585-87.
77. Joshua GWP, Harrison LJS, Sewell MMH. (1989). **Developmental changes in proteins and glycoproteins revealed by direct radio-iodination of viable *Taenia saginata* larvae.** *Parasitol.* 99: 265-74.
78. Katti MK, Chandramukhi A. (1991). **Comparative evaluation of cysticercal antigens and immunoassays in the diagnosis of neurocysticercosis.** *Ann Trop Med Parasitol.* 85 (6): 605-615.
79. Khan NA, Sotelo J. (1989). **Presentation of a membrane cysticercus antigen and its homology with excretory-secretory antigen.** *Acta Leidensia.* 57 (2): 123-29.
80. Khan NA, Sotelo J. (1991). **Immunocytochemical localization of a cysticercus antigen.** *Neurosci Res Comm.* 9 (1): 9-12.

81. Ko RC, Ng TF. (1998). **Specificity of isoelectric focusing-purified antigens in the diagnosis of human cysticercosis.** Parasitol Res. 84: 565-69.
82. Ko RC, Ng TF. (1998). **Purification of larval *Taenia solium* antigens by isoelectric focusing.** Vet. Parasitol. 74: 191-202.
83. Kong Y, Cho SY, Kim SI, Kang Y. (1992). **Immunoelectrophoretic analysis of major component proteins in cystic fluid of *Taenia solium* metacestodes.** Korean J Parasitol. 30 (3): 209-18.
84. Kumar D, Gaur SNS. (1987). **Serodiagnosis of porcine cysticercosis by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using fractionated antigens.** Vet Parasitol. 24: 195-202.
85. Laclette JP, Alagón A, Willms K, Torre-Blanco A. (1990). **Purification of antigen B from *Taenia solium* cysticerci by affinity to mammalian collagen.** J. Parasitol. 76 (2): 273-75.
86. Laclette JP, Landa A, Arcos L, Willms K, Davis AE, Shoemaker CB. (1991). **Paramyosin is the *Schistosoma mansoni* (trematoda) homologue of antigen B from *Taenia solium* (cestoda).** Molec Biochem Parasitol. 44: 287-96.
87. Laclette JP, Merchant MT, Willms K. (1987). **Histological and ultrastructural localization of antigen B in the metacestode of *Taenia solium*.** J. Parasit. 73 (1): 121-29.
88. Laclette JP, Shoemaker B, Richter D, Arcos L, Pante N, Cohen C, Bing D, Nicholson-Weller A. (1992). **Paramyosin inhibits Complement C1¹.** J Immunology. 148: 124-28.
89. Laemmli UK. **Cleaving of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4.** Nature 227 (2): 680-85.
90. Lamothe R, García L. **Helmintiasis del Hombre en México tratamiento y profilaxis.** AGT Editor, SA. México: 25-41. 1988.
91. Lamsam S, McManus DP. (1990). **Molecular characterization of the surface and cyst fluid components of *Taenia crassiceps*.** Parasitol. 101: 115-25.
92. Landa A. (1988). **Estudio de las glicoproteínas de superficie del cisticerco de la *Taenia solium*.** Tesis de Maestría, Facultad de Ciencias. UNAM: México D.F.

93. Landa A, Lacleste JP, Nicholson-Weller A, Shoemaker CB. (1993). **cDNA cloning and recombinant expression of collagen-binding and complement inhibitor activity of *Taenia solium* paramyosin (AgB).** *Molec Biochem Parasitol.* 60: 343-48.
94. Landa A, Merchant MT, Willms K, Lacleste JP. (1994). **Purification and ultrastructural localization of surface glycoproteins of *Taenia solium* (cestoda) cysticerci.** *Int J Parasitol.* 24 (2): 265-69.
95. Lara AR, Mendoza CJF, Martinez TJL, Macias SR, Willms K, Altamirano RL, Santamaria LA. (1992). ***Taenia solium* taeniasis and neurocysticercosis in a Mexican rural family.** *Am J Trop Med Hyg.* 46 (1): 85-88.
96. Larralde C, Lacleste JP, Owen CS, Madrazo I, Sandoval M, Bojail R, Sciutto E, Contreras L, Arzate J, Díaz ML, Govezensky T, Montoya RM, Goodsaid F. (1986). **Reliable serology of *Taenia solium* with antigens from cyst vesicular fluid: ELISA and hemagglutination tests.** *Am J Trop Med Hyg.* 35 (5): 956-73.
97. Larralde C, Montoya RM, Sciutto E, Díaz ML, Govezensky T, Coltorti E. (1989). **Deciphering Western Blots of tapeworm antigens (*Taenia solium*, *Echinococcus granulosus* and *Taenia crassiceps*) reacting with sera from neurocysticercosis and hydatid disease patients.** *Am J Trop Med Hyg.* 40 (3): 282-90.
98. Larralde C, Padilla A, Hernández M, Govezensky T, Sciutto E, Gutiérrez G, Tapia-Conyer R, Salvatierra B, Sepúlveda J. (1992). **Seroepidemiología de la cisticercosis en México.** *Salud Pública de México.* 34: 342-49.
99. Larralde C, Sotelo J, Montoya RM, Palencia G, Padilla A, Govezensky T, Díaz ML, Sciutto E. (1990). **Immunodiagnosis of human cysticercosis in cerebrospinal fluid: antigens from murine *Taenia crassiceps* cysticerci effectively substitute those from porcine *Taenia solium*.** *Arch Pathol Lab Med.* 114: 926-28.
100. Lee JH, Kong Y, Ryu JY, Cho SY. (1993). **Applicability of ABC-ELISA and Protein A-ELISA in serological diagnosis of cysticercosis.** *Korean J Parasitol.* 31 (1): 49-56.
101. Leid RW, Grant RF, Suquet CM. (1987). **Inhibition of equine neutrophil chemiotaxis and chemiokinesis by a *Taenia taeniaeformis* proteinase inhibitor, taeniaestatin.** *Parasite Immunol.* 9: 195-204.

102. Letonja T, Hammenberg C, Schuring G. (1987). **Evaluation of the spleen lymphocyte responsiveness to a T-cell mitogen during early infection with larval *Taenia taeniaeformis*.** Parasitol Res. 73: 265-70.
103. Lightowlers MW, Waterkeyn JG, Rothel JS, Gauci CG, Harrison GBL. (1996). **Host-protective fragments and antibody binding epitopes of the *Taenia ovis* 45W recombinant antigen.** Parasite Immunol. 18: 507-13.
104. Liu D, Rickard MD, Lightowlers MW. (1993). **Analysis of taeniid antigens using monoclonal antibodies to *Echinococcus granulosus* antigen 5 and antigen B.** Parasitol Res. 79: 82-5.
105. López AFJ. (2000). **Comentarios acerca del artículo sobre teniosis y cisticercosis por *Taenia solium*.** Salud Pública de México. 42 (1): 1-2.
106. Lowry O.H, Rosenbrough NJ, Farr AL, Rrandall RJ. (1951). **Protein measurement with the Folin phenol reagent.** J of Biol Chem. 193: 265-75.
107. Lumsden RD, Voge M., Sogandares-Bernal F. **The metacestode tegument: Fine structure, development, topochemistry and interactions with the host.** En: **Cysticercosis: Present State of knowledge and perspectives.** Eds. Flisser A, Willms K., Lacleite JP, Larralde C, Ridaura C, Beltrán F. New York, Academic Press: 307-61. 1982.
108. Mahajan RC. **Geographical distribution of human cysticercosis.** En **Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives.** Eds. Flisser A, Willms K, Lacleite JP, Larralde C, Ridaura C, Beltrán F. New York, Academic Press. 39-46. 1982.
109. Mahajan RC, Chopra JS, Ganguly NK. (1982). **Human cysticercosis and epilepsy: a serological study.** En **Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives.** Eds. Flisser A, Willms K, Lacleite JP, Larralde C, Ridaura C., Beltrán F. New York, Academic Press: 171-79. 1982.
110. Manoutcharian K, Rosas G, Hernandez M, Fragoso G, De Aluja AS Villalobos N, Rodarte LF, Scitutto E. (1996). **Cysticercosis: identification and cloning of protective recombinant antigens.** J Parasitol. 82 (2): 250-54.
111. Markel KE, Voge M, John TP. **Parasitología médica.** Interamericana McGrawhill, Madrid: 260-262. 1990

112. Martinez CS, Ruiz MC, Lopez RM, Mateos GH. (1980). **Usefulness of concentrated CSF hemagglutination technique for the diagnosis of cerebral cysticercosis.** Arch Invest Med. 11 (83): 347-59.
113. Merchant MT, Aguilar L, Avila G, Robert L, Flisser A, Willms K. (1998). ***Taenia solium*: description of the intestinal implantation sites in experimental hamster infections.** J Parasit. 84 (4): 681-85.
114. Merchant MT, Corella C, Willms K. (1997). **Autoradiographic analysis of the germinative tissue in evaginated *Taenia solium* metacestodes.** J. Parasitol. 83 (3): 363-67.
115. Mills GI, Coley SC, Williams JF. (1984). **Lipid and protein composition of the surface of tegument from the larvae of *Taenia taeniaeformis*.** J Parasitol. 70 (2): 197-207.
116. Molinari JL, Rodríguez D, Tato P, Soto R, Arechavaleta F, Solano S. (1997). **Field trial for reducing porcine *Taenia solium* cysticercosis in Mexico by systematic vaccination of pigs.** Vet Parasitol. 69: 55-63.
117. Molinari JL, Soto R, Tato P, Rodríguez D, Retana A, Sepulveda J, Palet A. (1993). **Immunization against porcine cysticercosis in an endemic area in Mexico: a field and laboratory study.** Am J Trop Med Hyg. 49 (4): 502-12.
118. Molinari JL, Tato P, Aguilar T, Palet A. (1988). **Immunity in mice to an oncosphere infection by using oncospherical antigens from *Taenia solium* or *Taeniarhynchus saginatus*.** Rev Lat-amer Microbiol. 30: 325-33.
119. Molinari JL, Tato P, Lara-Aguilera R, White C Jr. (1993). **Effects of serum from neurocysticercosis patients on the structure and viability of *Taenia solium* oncospheres.** J Parasitol. 79 (1): 124-27.
120. Molinari JL, Tato P, Rodríguez D, Solano S, Rubio M, Sepúlveda J. (1998). **Impairment of the inflammatory reaction implanted *Taenia solium* metacestodes in mice by a *T. solium* RNA-peptide: a scanning electron microscopy study.** Parasitol Res. 84: 173-80.
121. Montenegro T, Gilman RH, Castillo, Tsang VCW, Brandt J, Guevara A, Sanabria H, Verastegui M, Sterling C, Miranda E. (1994). **The diagnostic importance of species specific and cross-reactive components of *Taenia solium*,**

Echinococcus granulosus and *Hymenolepis nana*. Rev Inst Med Trop São Paulo. 36 (4): 327-34.

122. Moore AC, Lutwick LI, Schantz PM, Pilcher JB, Wilson M, Hightower AW, Chapnick EK, Abter EI, Grossman JR, Fried JA, Ware DA, Haichou X, Hyon SS, Barbour RL, Antar R, Hakim A. (1995). **Seroprevalence of cysticercosis in an orthodox Jewish community.** Am J Trop Med Hyg. 53 (5): 439-42.
123. Morakote N, Nawacharoen W, Sukonthasun K, Thammasonthi W, Khamboonruang C. (1992). **Comparison of cysticercus extract, cyst fluid and *Taenia saginata* extract for use in ELISA for serodiagnosis of neurocysticercosis.** Southeast Asean J Trop Med Public Health. 23 (1): 77-81.
124. Nascimento E, Tavares C, Lopes JD. (1987). **Immunodiagnosis of human cysticercosis (*Taenia solium*) with antigens purified by monoclonal antibodies.** J Clin Microbiol. 25 (7): 1181-85.
125. Nieto, D. **Historical notes on cysticercosis.** En *Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives.* Eds. Flisser A, Willms K, Lacleste JP, Larralde C, Ridaura C, Beltrán F. New York, Academic Press: 565-73. 1982.
126. Ordoñez G, Medina MT, Sotelo J. (1996). **Immunoblot analysis of serum and CSF from patients with various forms of neurocysticercosis.** Neurol Inf Epidem. 1: 1-5.
127. Ostrosky-Zeichner L, Garcia ME, Rios C, Sotelo J. (1996). **Humoral and cellular immune responses within the subarachnoid space of patients with neurocysticercosis.** Arch Med Res. 27 (4): 513-17.
128. Pammenter MD, Epstein SR, Rees RT. (1992). **Cross reactions in the immunodiagnosis of schistosomiasis and cysticercosis by a cerebrospinal fluid enzyme-linked immunosorbent assay.** Trans R Soc Trop Med Hyg. 86: 51-2.
129. Pammenter MD, Rossow EJ, Dingle CE. (1987). **Serological detection of cysticercosis in two rural areas of South Africa.** Trans Roy Soc Trop Med Hyg. 81: 242-44.
130. Pammenter MD, Rossow EJ, Epstein SR. (1987). **Diagnosis of neurocysticercosis by enzyme-linked immunosorbent assay.** SAMJ. 71: 512-14.

131. Pappas PW. (1983). **Host-parasite-interface**. En **Biology of Eucestoda**. Eds Arme C y PW Pappas. Academic Press, Londres. Vol 2: 297-334.
132. Parkhouse RME, Harrison LJS. (1987). **Cyst fluid and surface associated glycoprotein antigens of *Taenia sp* metacestodes**. *Parasite Immunol.* 9: 263-68.
133. Pathak KML, Allan JC, Ersfeld K, Craig PS. (1994). **A Western Blot and ELISA assay for the diagnosis of *Taenia solium* infection in pigs**. *Vet Parasitol.* 53: 209-17.
134. Pathak KML, Gaur SNS. (1994). **Immunization of pigs with culture antigens of *Taenia solium***. *Vet Parasitol.* 34. 353-56.
135. Pawlowski, ZS. (1990). **Perspectives on the control of *Taenia solium***. *Parasitology Today.* 6 (12); 371-73.
136. Pinto PSA, Vaz AJ, Germano PML, Nakamura PM. (2000). **Performance of the ELISA test for swine cysticercosis using antigens of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* cysticerci**. *Vet. Parasitol.* 88: 127-30.
137. Plancarte A, Fexas M, Flisser A. (1994). **Reactivity in ELISA and Dot Blot of purified GP24, an immunodominant antigen of *Taenia solium*, for the diagnosis of human neurocysticercosis**. *Int J Parasitol.* 24 (5): 733-738.
138. Plancarte A, Flisser A, Gauci CG, Lightowlers MW. (1999). **Vaccination against *Taenia solium* cysticercosis in pigs using native and recombinant oncosphere antigens**. *Int J Parasito.* 29: 643-647.
139. Plancarte A, Flisser A, Larralde C. (1983). **Fibronectin-like properties in antigen B from the cysticercus of *Taenia solium***. *Cytobios.* 36 (142): 83-93.
140. Plancarte A, Hirota C, Martínez OJ, Mendoza HG, Zenteno E, Flisser A. (1999). **Characterization of GP39-42 and GP24 from *Taenia solium* cysticerci and of their antigenic GP10 subunit**. *Parasitol Res.* 85 (8-9): 680-84.
141. Rabiela CMT, Rivas HA, Castillo MS, Cancino FM. **Anatomopathological aspects of human brain cysticercosis**. En: **Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives**. Eds. Flisser A, Willms K, Lacleste JP, Larralde C., Ridaura C, Beltrán F. New York, Academic Press: 179-200. 1982.
142. Rabiela MT, Rivas A, Flisser A. (1989). **Morphological types of *Taenia solium* cysticerci**. *Parasitology Today.* 5 (11): 357-59.

143. Ramos KM, Montoya RM, Padilla A, Govezensky T, Díaz ML, Sciutto E, Sotelo J, Larralde C. (1992). **Immunodiagnosis of neurocysticercosis: disappointing performance of serology (enzyme-linked immunosorbent assay) in an unbiased sample of neurological patients.** Arch neurol. 49: 633-36.
144. Rangel R, Torres B, Del Brutto O, Sotelo J. (1987). **Cysticercotic encephalitis: a severe form in young females.** Am J Trop Med Hyg. 36 (2): 387-92.
145. Rodríguez CR, Allan JC, Dominguez JL, Villegas S, Cob L, Rodríguez RI, Cook AJ, Williams J, Argaez F, Craig PS. (1998). **Application of an immunoassay to determine risk factors associated with porcine cysticercosis in rural areas of Yucatán, México.** Vet Parasitol. 79: 165-80.
146. Rodríguez CR, Fraser A, Allan JC, Dominguez AJL, Argaez RF, Craig PS. (1999). **Epidemiological study of *Taenia solium* taeniasis/cysticercosis in a rural village in Yucatán state, México.** Ann Trop Med Parasitol. 93 (1): 57-67.
147. Rolfs A, Mülchscheffel F, Jansen-Rosseck R, Martins AR, Bedaque EA, Tamburus WM, Pedretti L, Schulte G, Feldmeier H, Kreamsner P. (1995). **Clinical and immunologic follow-up study of patients with neurocysticercosis after treatment with praziquantel.** Neurology. 45: 532-38.
148. Rosas N, Sotelo J, Nieto D. (1986). **ELISA in the diagnosis of neurocysticercosis.** Arch Neurol. 43 (4): 353-56.
149. Rosenfeld E, Byrd SE, Shulman ST. (1996). **Neurocysticercosis among children in Chicago.** Clin Inf Dis. 23: 262-68.
150. Sakai H, Sone M, Castro DM, Nonaka N, Quan D, Canales M, Ljungstrom I, Sánchez AL. (1998). **Seroprevalence of *Taenia solium* cysticercosis in pigs in a rural community of Honduras.** Vet Parasitol. 78: 233-38.
151. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. **Molecular Cloning. A laboratory manual.** Cold Spring Harbor Laboratory Press. USA. Segunda edición. 1989.
152. Sandeman RM, Williams JF. (1984). **Lectin binding to cystic stages of *Taenia taeniaeformis*.** J Parasitol. 70 (5): 661-67.
153. Sarti E. (1997). **La teniosis y cisticercosis por *Taenia solium*.** Salud Pública de México. 39 (3): 225-31.

154. Sarti E, Flisser A, Schantz PM, Gleizer M, Loya M, Plancarte A, Avila G, Allan J, Craig P, Bronfman M, Wijeyaratne P. (1997). **Development and evaluation of health education intervention against *Taenia solium* in a rural community in Mexico.** Am J Trop Med Hyg. 56 (2): 127-32.
155. Sarti E, Schantz P M, Plancarte A, Wilson M, Gutierrez IO, Lopez AS, Roberts J, Flisser A. (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): 677-85.
156. Sarti E, Schantz PM, Avila G, Ambrosio J, Medina-Santillan R, Flisser A. (2000). **Mass treatment against human taeniasis for the control of cysticercosis: a population-based intervention study.** Trans R Soc Trop Med Hyg. 94 (1): 85-9.
157. Sciuotto E, Aluja A, Fragoso G, Rodarte LF, Hernández M, Villalobos MN, Padilla A, Keilbach N, Baca M, Govezensky T, Díaz S, Larralde C. (1995). **Immunization of pigs against *Taenia solium* cysticercosis: factors related to effective protection.** Vet Parasitol. 60: 53-67.
158. Sciuotto E, Martínez JJ, Villalobos NM, Hernández M, José MV, Beltrán C, Rodarte F, Flores J, Bobadilla JR, Fragoso G, Parkhouse ME, Harrison LJS, Aluja AS. (1998). **Limitations of current diagnostic procedures for the diagnosis of *Taenia solium* cysticercosis in pigs.** Vet Parasitol. 79: 299-313.
159. Schantz PM, Cruz M, Sarti E, Pawlowski Z. (1993). **Potential eradicability of taeniasis and cysticercosis¹.** Bull of PAHO. 27 (4): 397-403.
160. Schantz PM, Moore AC, Muñoz JL, Hartman BJ, Schaefer JA, Aron AM, Persaud D, Sarti E, Wilson M, Flisser A. (1992). **Neurocysticercosis in an orthodox Jewish community in New York City.** The New England J Med. 327 (10): 692-95.
161. Schantz PM, Sarti E, Plancarte A, Wilson M, Criales J, Roberts J, Flisser A: (1994). **Community-based epidemiological investigations of cysticercosis due to *Taenia solium*: comparison of serological screening tests and clinical findings in two populations in México.** Clin Inf Dis. 18: 879-85.
162. Schenone H, Villarroel F, Rojas A, Ramírez R. En: **Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives.** Eds. Flisser A, Willms K, Lactette JP, Larralde C, Ridaura C, Beltrán F. New York, Academic Press: 25-39. 1982.

163. Sealey M, Ortiz-Ortiz L. **Cellular immunity in cysticercosis: a review.** En **Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives.** Eds. Flisser A, Willms K, Lacleste JP, Larralde C, Ridaura C, Beltrán F. New York, Academic Press: 565-73. 1982.
164. Simanjuntak GM, Margono SS, Okamoto M, Ito A. (1997). **Taeniasis/cysticercosis in Indonesia as an emerging disease.** *Parasitol Today.* 13 (9): 321-23.
165. Sloan L, Schneider S, Rosenblatt J. (1995). **Evaluation of enzyme-linked immunoassay for serological diagnosis of cysticercosis.** *J Clin Microbiol.* 33 (12): 3124-28.
166. Sotelo J. **Neurocysticercosis.** En **Infections of the Nervous System.** Eds. Johnson, R. y Kennedy, P: Butterworths, London, Chapter 8: 145-55. 1987.
167. Tato P, Castro AM, Rodríguez D, Soto R, Arechavaleta F, Molinari JL. (1995). **Suppression of murine lymphocyte proliferation induced by a small RNA purified from the *Taenia solium* metacestode.** *Parasitol Res.* 81: 181-87.
168. Tay ZL, Lara AR, Velasco CO, Gutiérrez QM. (1996). **Parasitología médica.** Méndez Editores S.A. de C.V. México. Sexta edición: 16-33, 198-99.
169. Thussu A, Sehgal S, Sharma M, Lal V, Sawney IMS, Prabhakar S. (1997). **Comparison of cellular responses in single- and multiple-lesion neurocysticercosis.** *Annals Trop Med Parasitol.* 91 (6): 627-32.
170. Tortora GJ, Funke BR, Case CL. **Microbiology: an introduction.** The Benjamin/Cummings Publishing Co. Inc. USA, Quinta Edición: 509,321, 632. 1995.
171. Trimble JJ, Lumsden RD. (1975). **Cytochemical characterization of tegument membrane associated carbohydrates in *Taenia crassiceps* larvae.** *J Parasitol.* 61 (4): 665-76.
172. Tsang VCW, Brand JA, Boyer AE. (1989). **An enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay and glycoprotein antigens for diagnosing human cysticercosis (*Taenia solium*).** *J Inf Dis.* 159 (1): 50-9.
173. Tsang VCW, Pilcher JA, Zhou W, Boyer AE, Kamango -Sollo EIP, Rhoads ML, Darwin MK, Schantz PM, Gilman RH. (1991): **Efficacy of the immunoblot assay for cysticercosis in pigs and modulated expression of distinct IgM/IgG**

-
- activities to *Taenia solium* antigens in experimental infections. *Vet Immunol Immunopathol.* 29: 69-78.
174. Tsang VCW, Wilson M. (1995). *Taenia solium* Cysticercosis: An under-recognized but serious public health problem. *Parasitol Today.* 11 (3): 124-26.
175. Vaz AJ, Nunes CM, Piazza RMF, Livramento JA, Da Silva MV, Nakamura PM, Ferreira W. (1997). Immunoblot with cerebrospinal fluid from patients with neurocysticercosis using antigen from cysticerci of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps*. *Am J Trop Med Hyg.* 57 (3): 354-57.
176. Velasco-Suárez M, Bravo BMA, Quirasco F. Human cysticercosis: medical-social implications and economic impact. En *Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives*. Eds. Flisser A, Willms K, Lacleste JP, Larralde C, Ridaura C, Beltrán F. New York, Academic Press: 47-52. 1982.
177. Vibanco PN, Jiménez L, Merchant MT, Landa A. (1999). Characterization of Glutathione S-Transferase of *Taenia solium*. *J. Parasitol.* 85 (3): 448-53.
178. White CA Jr., Molinari JL, Pillai, AV, Rege AA. (1992). Detection and preliminary characterization of *Taenia solium* metacestode proteases. *J. Parasitol.* 78(2): 281-287.
179. White CA Jr., Tato P, Molinari JL. (1992). Host-Parasite interactions in *Taenia solium* cysticercosis. *Inf Agents and Dis.* 1(4): 185-93.
180. White CA Jr. (1997). Neurocysticercosis: a major cause of neurological disease worldwide. *Clin Inf Dis.* 24; 101-15.
181. Wilkins PP, Allan JC, Verastegui M, Acosta M, Eason AG, Garcia HH, Gonzalez AE, Gilman RH, Tsang VCW. (1999). Development of a serologic assay to detect *Taenia solium* taeniasis. *Am J Trop Med Hyg.* 60 (2):199-204.
182. Wilson M, Bryan RT, Fried JA, Ware DA, Schantz PM, Pilcher JB, Tsang VCW. (1991). Clinical evaluation of the cysticercosis enzyme-linked immunoelectrotransfer blot in patients with neurocysticercosis. *J Inf Dis.* 164: 1007-9.
183. Woodhouse E, Flisser A, Larralde C. (1982). Seroepidemiology of human cysticercosis in Mexico. En *Cysticercosis: Present state of knowledge and*

-
- perspectives.** Eds. Flisser A, Willms K, Lacleite JP, Larralde C, Ridaura C., Beltrán F. New York, Academic Press: 11-23. 1982.
184. Yang HJ, Chung JY, Yun DH, Ito A, Liu YH, Lee SC, Kang SY, Cho SY. (1998). **Immunoblot analysis of a 10 kDa antigen in cyst fluid of *Taenia solium* metacestodes.** Parasite Immunol. 20: 483-88.
185. Zenteno-Alanis GH, **Classification of human cysticercosis.** En: **Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives.** Eds. Flisser A, Willms K, Lacleite JP, Larralde C, Ridaura C, Beltrán F. New York, Academic Press: 179-200. 1982.
186. Zini D, Farrell VJR, Wadee AA. (1990). **The relationship of antibody levels to the clinical spectrum of human cysticercosis.** J Neurol, Neurosurg and Psychiatry. 53: 656-61.

IX. APÉNDICE

1. Geles

Mezcla para SDS-PAGE 10 %

GEL CONCENTRADOR	
Reactivo	Volumen
Acrilamida 30 %, Bis 0.8 %	500 μ L
Tris 0.5 M pH=6.8	750 μ L
Agua bidestilada	1.53 mL
SDS 10 %	30 μ L
Persulfato de amonio 10 %	10 μ L
TEMED (<i>N-N'-N-N'</i> Tetrametilén-diamina)	1.5 μ L
Volumen final	2.8 mL
GEL SEPARADOR	
Acrilamida 30 %, Bis 0.8 %	1.65 mL
Tris 1.5 M pH 8.8	1.25 mL
Agua bidestilada	1.7 mL
SDS 10 %	100 μ L
Persulfato de amonio 10%	33 μ L
TEMED	3.3 μ L
Volumen final	8.03 mL

Se vertieron las mezclas en los vidrios montados según el manual de Mini Protean ® II Electrophoresis Cell de Bio-Rad y se corrieron a 100 V por 1.5 h en amortiguador para SDS-PAGE 2X.

Mezcla para el gel de Agarosa-TAE 1 % y 2% para electroforesis de ADN

Reactivo	Cantidad
Agarosa (Agarmex)	1 g (1 %) y 2 g (2 %)
TAE 1X	c.b.p. 100 mL
Bromuro de etidio 10 mg/mL (Bio-Rad)	40 μ L

Mezcla para el gel de secuencia de ADN

Solución / Reactivo	Cantidad
Urea (GIBCO)	33.75 g
Agua desionizada	18 mL
Acilamida 40% Bis 2%	11.25 mL
TBE 5X	13.5 mL
Persulfato de amonio	800 μ L
TEMED	5 μ L
Volumen total	76.5 mL

La solución se filtró a través de una membrana de nitrocelulosa de 0.45 μ m de diámetro de poro, se le agregaron 5 μ L de TEMED y se vertió en los cristales de secuencia previamente ensamblados según el GIBCO-BRL Sequencing System ®.

2. Soluciones

PBS 10X

Cloruro de sodio (Baker)	80 g
Cloruro de potasio (Baker)	2 g
Fosfato de sodio dibásico (Baker)	14.4 g
Fosfato de potasio monobásico (Baker)	24 g

Agua bidestilada desionizada (ddH₂O) c.b.p. 1 L

Se ajustó a pH 7.4 con HCl 37 % v/v.

Solución de extracción

PBS 10X 6 mL

NaCl 1.3 g

ddH₂O c.b.p. 50mL

Se ajustó pH a 7.4 con HCl 37 % v/v y al momento de que se ocupó la solución de extracción se adicionó lo siguiente por cada 50 mL de solución:

Aprotinina 10 mg/L (Sigma) 120 µL

TLCK 10 mM (fosfolisin-clorometil-cetona; Sigma) 600 µL

EDTA 0.5M pH 8.0 120 µL

Leupeptina 25 mg/mL (Sigma) 48 µL

β-mercapto-etanol 14 M (Bio-Rad) 45 µL

PMSF 200 mM (fluoruro de fenil-metil-sulfonilo; Sigma) 120 µL

PBS 1X - Azida de Sodio 0.005 %

PBS 10X 100 mL

Azida de sodio (Research Organics) 50 mg

ddH₂O c.b.p. 1 L

Acrilamida 30 %, Bis 0.8 %

Acrilamida (Bio-Rad) 30 g

Bis (Bio-Rad) 800 mg

ddH₂O c.b.p. 100 mL

Tris 1.5 M pH 8.8

Tris Base (GIBCO) 181.7 g

ddH₂O c.b.p. 1 L

Se ajustó pH a 8.8 con HCl 37 % v/v.

SDS 10 %

SDS (dodecil-sulfato de sodio; Bio-Rad) 10 g

ddH₂O c.b.p. 100 mL

Tris 0.5 M pH 6.8

Tris Base	60.57 g
ddH ₂ O	c.b.p. 1 L

Se ajustó pH a 6.8 con HCL 37 % v/v.

Persulfato de amonio 10 %

Persulfato de amonio (Life Technologies)	10 g
ddH ₂ O	c.b.p. 100 mL

Solución 2X para cargado de proteínas (SDS-PAGE)

Tris 0.5M pH 6.8	10mL
SDS 10%	10mL
Glicerol (Sigma)	10mL
Azul de bromofenol (Bio-Rad)	100mg
ddH ₂ O	20mL
β-mercapto-etanol	1.5 mL

Amortiguador para SDS-PAGE (5X)

Tris base	15.1 g
Glicina (Bio-Rad)	9.4 g
SDS 10 %	50 mL
ddH ₂ O	c.b.p. 1 L

Azul brillante de Coomassie 0.05 %

Metanol (Merck)	50 mL
Azul brillante de Coomassie (Bio-Rad)	50 mg
Ácido acético glacial (Merck)	10 mL
ddH ₂ O	40 mL

Ácido acético 10 %

Ácido acético glacial	10 mL
ddH ₂ O	90 mL

α-metil-D-mano-piranósido 0.1M (αMMP)

α-metil-D-mano-piranósido (Sigma)	1.94 g
PBS 1X-azida de Sodio 0.005 %	c.b.p. 100 mL

Solución de almacenaie (cloruro de magnesio/cloruro de manganeso 10 mM)

Cloruro de magnesio-4 H ₂ O (Baker)	197 mg
Cloruro de manganeso II-4 H ₂ O (Baker)	203 mg
PBS 1X-azida de sodio 0.005 %	c.b.p. 100 mL

Imidazol 0.2 M, SDS 0.1 %

Imidazol (Baker)	6.97 g
SDS 10%	5 mL
ddH ₂ O	c.b.p. 500 mL

Sulfato de zinc 0.2 M

Sulfato de zinc · 7 H ₂ O (Baker)	13.2 g
ddH ₂ O	c.b.p. 500 mL

EDTA 0.5 M pH 8.0

EDTA (ácido etilén-diamino-tetra-acético; Research Organics)	146.15g
ddH ₂ O	c.b.p. 1L

Ajustar pH con NaOH 1 N.

Amortiguador de electroelución de proteínas

Tris	3.0g
Glicina (Bio-Rad)	14.4 g
SDS	1.0 g
ddH ₂ O	c.b.p. 1 L

Amortiguador para la transferencia de proteínas a nitrocelulosa

Tris	6.16g
Glicina	72.4 g
Metanol	400 mL
ddH ₂ O	c.b.p. 2 L

Solución A (PBS 1X - Tween 0.05 %)

PBS 1X	99.95 mL
Tween 20 (monolaurato de polietilén-sorbitán; Sigma)	50 µL

Solución B (PBS 1X - Tween 0.05 % - Leche 5 %)

Leche descremada en polvo (Svelty)	5 g
Solución A	c.b.p. 100 mL

DAB 50 mg/mL

DAB (diamino-bencidina; Sigma)	50 mg
PBS 1X	1 mL

Solución reveladora para peroxidasa

Preparar en el momento:

DAB (50mg/mL)	100 μ L
Peróxido de hidrógeno (Merck)	1 μ L
PBS 1X	10 mL

TBS 1X

Tris-HCl (1.0 M)	100 mL
NaCl (5 M)	60 mL
ddH ₂ O	c.b.p. 2 L

TBS 1X-Leche 5 %

Leche descremada	5 g
TBS 1X	c.b.p. 100 mL

IPTG 10 mM

IPTG (inosín- β -para-tiogalactósido; Sigma)	2.833 g
ddH ₂ O	c.b.p. 10 mL

Solución T1 (TBS 1X - Tween 0.3 %)

TBS 1X	99.7 mL
Tween 20	300 μ L

Solución T2 (TBS 1X - Tween 0.3 % - Leche 5 %)

Solución T1	c.b.p. 100 mL
Leche descremada	5 g

Solución T3 (TBS 1X-Tween 0.05%)

TBS 1X	99.95 mL
Tween 20	50 μ L

Revelador para fosfatasa alcalina

Solución A:

DMF (dimetil-formamida; Sigma)	7 mL
Agua bidestilada	3 mL

Para-nitro-fenil-fosfato (Sigma)	300 mg
----------------------------------	--------

Solución B:

BCIP (Sigma)	0.15 g
--------------	--------

DMF (Sigma)	10 mL
-------------	-------

Solución de desarrollo:

Carbonato ácido de sodio (Baker)	1.07 g
----------------------------------	--------

Cloruro de magnesio	1.7 g
---------------------	-------

ddH ₂ O	c.b.p. 100 mL
--------------------	---------------

Ajustar pH a 9.8 con NaOH 10N de la solución de desarrollo.

Solución A	1 mL
------------	------

Solución B	1 mL
------------	------

Solución de desarrollo	100 mL
------------------------	--------

Maltosa 20%

Maltosa (Baker)	20 g
-----------------	------

ddH ₂ O	c.b.p. 100 mL
--------------------	---------------

Se esterilizó por filtración en membranas Millipore® 0.22 µm de diámetro de poro.

Sulfato de magnesio 10 mM

Sulfato de magnesio-7 H ₂ O (Baker)	0.25 g
--	--------

ddH ₂ Oestéril	c.b.p. 100 mL
---------------------------	---------------

Solución I

Glucosa (Baker)	0.9 g
-----------------	-------

EDTA (0.5 M, pH 8.0)	2 mL
----------------------	------

Tris-HCL (1.0 M, pH 8.0)	2.5 mL
--------------------------	--------

ddH ₂ Oestéril	c.b.p. 100 mL
---------------------------	---------------

Solución II

Se prepara en el momento:

NaOH 10 N (hidróxido de sodio; Baker)	200 µL
---------------------------------------	--------

SDS 10 %	1 mL
----------	------

ddH ₂ O	8 mL
--------------------	------

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

Solución III

Acetato de amonio (Research Organics)	57.82 g
ddH ₂ O	c.b.p. 100 mL

TAE 50X

Tris base	242 g
Ácido acético glacial	57.1 mL
EDTA 0.5 M pH 8.0	100 mL

TE

Tris HCl 1M pH 8.0	10 mL
EDTA 0.5 M pH 8.0	2 mL
ddH ₂ O	c.b.p. 1 L

Acetato de sodio 3M pH 5.5

Acetato de sodio (Baker)	24.6 g
ddH ₂ O	c.b.p. 100mL
Ajustar pH con HCl.	

HCL 1N

HCl (ácido clorhídrico 37 % P/V)	86.2 mL
tddH ₂ O	c.b.p. 1 L

NaOH 10N

NaOH	40 g
ddH ₂ O	c.b.p. 100 mL

NSA 10X

Cloruro de magnesio	1 g
Tris-HCl (1.0 M, pH=8)	10 mL
tddH ₂ O	15 mL

Acrilamida 40 %, Bis 2 %

Acrilamida	40 g
Bis	2 g
ddH ₂ O	c.b.p. 100 mL

TBE 10X

Tris base	108 g
Ácido bórico (Baker)	55 g
EDTA 0.5M pH 8.0	4 mL
ddH ₂ O	c.b.p. 1 L

Solución fijadora de gel de secuencia de ADN

Ácido acético glacial	200 mL
Metanol	200 mL
ddH ₂ O	c.b.p. 2 L

3. Medios de cultivo**SOBM**

ddH ₂ O	900 µL
Bacto Triptona (DIFCO)	20 g
Extracto de levadura (DIFCO)	5 g
NaCl	0.5 g
Agar (DIFCO)	1 %
KCl 250 mM (Baker)	10 mL
ddH ₂ O	c.b.p. 1 L

LB

Bacto Triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	5 g
ddH ₂ O	c.b.p. 1 L

SM

NaCl	5.8 g
Sulfato de magnesio · 7H ₂ O	2 g
Tris-HCl (1 M, pH 8)	50 mL
Gelatina 2% (Bio-Rad)	5 mL
ddH ₂ O	c.b.p. 1 L

2XYT

NaCl	10 g
Extracto de levadura	5 g
Triptona	10 g
ddH ₂ O	c.b.p. 1 L

Para preparar medio sólido de todos los anteriores, se colocaron 15 g de Agar y 7.5 g de Agar para Top Agar. Los antibióticos Ampicilina, Kanamicina o Tetraciclina, se colocaron antes de esterilizar a 120 °C, 15 psi y 15 min. en autoclave. Otras soluciones esterilizadas fueron: sulfato de magnesio 10 mM, PBS 1X, ddH₂O y TE.