

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
IZTACALA**

**Evaluación de la protoxina Cry1Ac como adyuvante  
protector en un modelo de cisticercosis murina con  
*Taenia crassiceps***

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE BIÓLOGO**

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

**STEPHANIE IBARRA MORENO**

**DIRECTOR DE TESIS: DRA. LETICIA MORENO  
FIERROS**

**LOS REYES IZTACALA**

**2009**





Universidad Nacional  
Autónoma de México

**Biblioteca Central**

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM



**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.

## **CRÉDITOS**

La presente tesis fue realizada en el Laboratorio de Inmunidad de Mucosas de la Unidad de Biomedicina de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala. UNAM. Éste trabajo fue parcialmente apoyado por CONACYT UNAM DGAPA PAPITT IN221807 y por PAPIIME PE203607.

Durante el desarrollo de la experimentación de la presente tesis la autora recibió una beca de licenciatura de DGAPA PAPIIT IN221807

### **Director de Tesis**

**Dra. Leticia Moreno Fierros**

### **Sinodales**

**M. en C. Silvia Leticia Verdín Terán**

**Dr. Luis Ignacio Terrazas Valdez**

**Dra. Leticia Moreno Fierros**

**Dr. Maximiliano Ibarra Barajas**

**Dr. Marco Aurelio Rodríguez Monro**

## **AGRADECIMIENTOS:**

**A MI MAMA LETICIA MORENO** POR TODO SU APOYO Y AMOR A LO LARGO DE ESTOS AÑOS NO SOLO EN EL ÁMBITO ESTUDIANTIL SINO COMO MADRE, AMIGA Y CONSEJERA.

**A MI PAPA MAXIMILIANO IBARRA** POR SU CARÍÑO INCONDICIONAL, AFECTO Y COMPRENSIÓN A LO LARGO DE MI VIDA.

**A MI QUERIDA ABUE SILVIA FIERROS** POR HABERME CUIDADO DESDE QUE NACI HASTA AHORA POR ESTAR SIEMPRE CONMIGO CUANDO MÁS LO NECESITO.

**A MI QUERIDO ABUELO ARMANDO MORENO** QUE YA NO ESTA CON NOSOTROS POR HABERME ENSEÑADO TANTAS COSAS DE LA VIDA Y POR HABER SIDO COMO UN PADRE PARA MI DURANTE MI NIÑEZ Y POR HABER CONFIADO SIEMPRE EN MI.

**A MI QUERIDA BISABUELA CLEMENTINA** QUE AUNQUE YA NO ESTES SIEMPRE TE TENDRÉ UN LUGAR ESPECIAL EN MI CORAZON Y DOY GRACIAS A DIOS EL HECHO DE HABERTE CONOCIDO.

**A MIS ABUELITOS DE COTIJA MICHOÁCAN SALVADOR Y RAQUEL** POR SU AMOR, CONFIANZA Y CONSEJOS.

**A MIS LINDAS HERMANAS DANIELA Y GISSELLE** POR SER MIS MOTORES EN LA VIDA PARA SEGUIR AVANZANDO Y CRECIENDO DÍA A DÍA.

**A MIS TIOS FRANCISCO MORENO Y ARMANDO MORENO** POR HABERME CUIDADO Y ALENTANDO DESDE PEQUEÑA Y POR TODAS SUS ATENCIONES QUE SIEMPRE HAN TENIDO CONMIGO.

**A MI TÍA LAURA HERRERA** POR HABERME APOYADO EN UNA LAS DECISIONES MÁS DIFICILES QUE HE TENIDO QUE TOMAR EN TODA MI VIDA.

### **AL LABORATORIO 9**

GRACIAS AL DR. MARCO AURELIO, LUCIO Y ALFREDO POR HABER COMPARTIDO SU AMISTAD Y APOYO DURANTE EL TIEMPO QUE ESTUVE EN EL LABORATORIO Y POR HABERME TENIDO PACIENCIA EN LAS EXPLICACIONES QUE NECESITÉ.

**A MI GORDO PONCHO ARREOLA,** POR ESTAR CONMIGO EN LAS BUENAS Y EN LAS MALAS Y POR SU APOYO, CARÍÑO Y AMOR

# ÍNDICE

## I. Resumen

## II. Abreviaturas

1. INTRODUCCIÓN	1
<b>1.1 Respuesta Inmune</b>	<b>1</b>
1.1.1 Inmunidad Innata y Adaptativa	1
1.1.2 Compartimiento sistémico y mucoso	1
1.1.3 Respuesta inmunitaria humoral	2
1.1.4 Las Inmunoglobulinas como defensa en el sistema inmune	2
<b>1.2 La Vacunación como medida para combatir las infecciones</b>	<b>2</b>
1.2.1 Vías de inmunización	3
1.2.2 Efectos en la dosis de antígeno	3
1.2.3 El efecto de los Anticuerpos en el sistema inmune	4
1.2.4 Los Adyuvantes	4
1.2.5 Uso de adyuvantes	5
<b>1.3 La protoxina Cry1Ac como adyuvante</b>	<b>5</b>
1.3.1 Efecto adyuvante protector de Cry1Ac	6
<b>1.4 Generalidades de los parásitos</b>	<b>6</b>
1.4.1 Respuesta inmune ante parásitos	7
<b>1.5 Generalidades de <i>Taenia solium</i></b>	<b>7</b>
1.5.1 Vacunación contra <i>Taenia Solium</i>	9
1.5.2 Ciclo de vida de <i>Taenia crassiceps</i>	10
<b>1.6 Respuesta tipo Th1 y Th2</b>	<b>11</b>
1.6.1 Características de las principales citocinas en la respuesta Th1 y Th2	11
1.6.1.1 Citocina IL-5	12
1.6.1.2 Citocina IL-4	12
1.6.1.3 Citocina IL-2	12
1.6.1.4 Citocina TNF- $\alpha$	12
1.6.1.5 Citocina IFN- $\gamma$	13

1.6.2 Respuesta Th1 y Th2 en la patología causada por <i>Taenia crassiceps</i>	13
<b>2. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>14</b>
<b>3. PROPUESTA</b>	<b>14</b>
<b>4. OBJETIVOS</b>	<b>15</b>
4.1 Objetivos generales	15
4.2 Objetivos Particulares	15
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>16</b>
5.1 Obtención de la cepa de cisticercos de <i>Taenia Crassiceps</i>	16
5.2 Obtención de la protoxina Cry1Ac	16
5.3 Obtención del extracto de cisticercos de <i>Taenia crassiceps</i>	17
5.4 Estrategia experimental	17
5.5 Obtención de muestras	18
5.6 Anticuerpos anti- <i>Taenia crassiceps</i> en suero	19
5.7 Niveles de citocinas en suero	19
5.8 Conteo total de cisticercos	20
5.9 Análisis estadístico	20
<b>6. RESULTADOS</b>	<b>20</b>
6.1 Conteo de cisticercos encontrados en la cavidad peritoneal	
- a los 35 días de infección con cisticercos de <i>Taenia crassiceps</i>	20
6.1.1 Conteo total de cisticercos al final de los 35 días de infección	20
6.1.2 Conteo de cisticercos grandes obtenidos por tratamiento	21
6.1.3 Conteo de cisticercos medianos por tratamiento	22
6.1.4 Conteo de cisticercos chico por tratamiento	23
6.2 Niveles de anticuerpos anti-cisticercos por medio -	
de la técnica de ELISA en suero de ratón BALB/C	24
6.2.1 Niveles de anticuerpos anti-cisticercos IgG en suero	24

6.2.2	Niveles de anticuerpos anti-cisticercos IgG1 en suero	26
6.2.3	Niveles de anticuerpos anti-cisticercos IgG2a en suero	28
6.2.4	Niveles de anticuerpos anti-cisticercos IgM en suero	30
6.3	Comparación de respuesta de tipo Th1 y Th2	32
6.3.1	Comparación de respuesta de tipo Th1 y Th2 en el grupo extracto	32
6.3.2	Comparación de respuesta de tipo Th1 y Th2 en el grupo extracto + Cry1Ac	34
6.3.3	Comparación de respuesta de tipo Th1 y Th2 en el grupo Cry1Ac	35
6.3.4	Comparación en los niveles de Th1 y Th2 en el grupo Testigo	36
6.4	Niveles de citocinas en suero de ratón BALB/C por medio de - citometría en flujo con el kit de citocinas Th1/Th2 (BD cytometric bead array)	37
6.4.1	Niveles de TNF-alfa	37
6.4.2	Niveles de IFN-gamma	39
6.4.3	Niveles de IL-5	40
6.4.4	Niveles de IL-2	41
6.4.5	Niveles de IL-4	42
<b>7.</b>	<b>DISCUSIÓN</b>	<b>44</b>
<b>8.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>51</b>
<b>9.</b>	<b>RECOMENDACIONES</b>	<b>52</b>
<b>10.</b>	<b>REFERENCIAS</b>	<b>53</b>
<b>11.</b>	<b>APÉNDICE</b>	<b>61</b>

## **RESUMEN**

En reportes previos nuestro grupo demostró que la protoxina Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis* es altamente inmunogénica y posee efectos adyuvantes tanto a nivel mucoso como sistémico. Además se ha encontrado que Cry1Ac tiene un papel adyuvante protector en un modelo de meningoencefalitis amibiana primaria en ratón con *Naegleria fowleri* al mezclarse con extracto amibiano. Para definir la utilidad de Cry1Ac como adyuvante vacunal es necesario evaluar si tiene efectos protectores en otros modelos de infección. Por lo que el objetivo del presente fue determinar si la protoxina Cry1Ac actuaba como adyuvante protector contra la infección parasitaria de *Taenia crassiceps* un modelo murino de cisticercosis utilizado ya con anterioridad por poseer similitudes aplicativas con *Taenia solium*, parásito cosmopolita de gran importancia médica, sanitaria y económica a nivel mundial siendo de gran importancia encontrar factores que ayuden a mejorar las vacunas ya existentes. Se formaron 4 grupos experimentales de 10 ratones hembras BALB/C en donde 3 de los grupos se inmunizaron por la ruta intraperitoneal 3 veces (1 cada 7 días) con uno de los siguientes tratamientos: i) 50 µg de extractos de metacéstodos solos o ii) coadministrados con 50 µg de Cry1Ac o iii) 50 µg de Cry1Ac; y un grupo control sin tratamiento. Todos los grupos se retaron 7 días después de la última inmunización con 16 metacéstodos y se sacrificaron a las 5 semanas de infección, recuperando los metacéstodos de la cavidad peritoneal y cuantificando por microscopia el número y tamaño de los cisticercos encontrados. Los ratones de los distintos grupos fueron sangrados a distintos tiempos durante las 3 inmunizaciones y después del reto infeccioso, determinando con ese suero el perfil de citocinas con el kit para ratón Th1 y Th2 cytometric Bead Array (CBA), así también se caracterizó la respuesta de anticuerpos anti-cisticercos mediante la técnica de ELISA durante la infección. Los resultados indican que la inmunización con Extracto + Cry1Ac confirió mayor protección contra la infección en comparación con los otros 3 grupos, así mismo las características morfológicas de los cisticercos cambiaron ya que eran más delgados y casi sin estado de gemación, también se mostraron los picos más altos en todos los anticuerpos anti-cisticercos ( IgG, IgG1, IgG2a e IgM). Se encontró que la infección de *Taenia crassiceps* en ratones BALB/C induce una respuesta inflamatoria mezclada de tipo Th1 y Th2. La cinética de citocinas mostró pocos valores rescatables esto debido principalmente a que el kit utilizado para medir dicha cinética en suero no fue el adecuado. Concluyéndose que la inmunización con Cry1 Ac sola no da protección pero al coadministrarla con extracto protege contra la infección larval de *Taenia crassiceps*, hasta un 47%. También se necesitan más estudios tanto en la dosis administrada, utilizar antígenos específicos en vez del extracto total y utilizar otro kit para la cinética de citocinas.



## ABREVIATURAS

BSA:	Albúmina Sérica Bovina
ELISA:	Técnica de inmunoabsorbancia ligada a una enzima
i.n:	Intranasal
i.p:	Intraperitoneal
IFN- $\gamma$ :	Citocina: Interferón tipo gamma
IgA:	Inmunoglobulina de tipo A, anticuerpo más abundante en secreciones
IgE:	Inmunoglobulina de tipo E, anticuerpo de respuesta humoral y alergias
IgG:	Inmunoglobulina de tipo G, anticuerpo más abundante en el suero
IgG1:	Inmunoglobulina de tipo G de la subclase 1, anticuerpo de respuesta humoral
IgG2a:	Inmunoglobulina de tipo G de la subclase 2 <sup>a</sup> , anticuerpo de respuesta celular
IgM:	Inmunoglobulina de tipo M, anticuerpo principal de respuesta primaria
IL-2:	Interleucina de tipo 2, en respuesta Th1
IL-4:	Interleucina de tipo 4, participa en la activación de linfocitos B, en respuesta Th2
IL-5:	Interleucina de tipo 5, participa en la activación de linfocitos B, en respuesta Th2
IL-10:	Interleucina de tipo 10, participa en la inhibición de síntesis de otras citocinas
PBS:	Solución amortiguadora de Fosfatos
S3Pvac:	Vacuna sintética con tres péptidos contra <i>Taenia solium</i>
STAT:	Transductores de señales y activadores de la transcripción
STAT4:	Deficiencia en STAT de tipo 4 (respuesta Th1)
STAT6:	Deficiencia en STAT de tipo 6 (Respuesta Th2)
TCD4+:	Linfocitos T de tipo cooperadores
TCD8+:	Linfocitos T de tipo citotóxicos
TH1:	Linfocitos T cooperadores (T helper) de tipo 1, respuesta celular
TH2:	Linfocitos T cooperadores (T helper) de tipo 2, respuesta humoral
TNF- $\alpha$ :	Citocina: Factor de Necrosis Tumoral-alfa, mediador en respuesta a infecciones
TNF- $\beta$ :	Citocina: factor de necrosis tumoral beta

## **1. INTRODUCCIÓN**

### **1.1 Respuesta Inmune**

Se define inmunidad a la resistencia natural o adquirida de un organismo vivo ante un agente infeccioso, el encargado de esta defensa se le conoce como sistema inmunitario, éste evolucionó para proteger a los organismos vivos de la invasión de microorganismos patógenos como bacterias, virus y parásitos teniendo la capacidad de generar una enorme variedad de células y moléculas que pueden reconocer y eliminar de forma específica una diversidad casi ilimitada de invasores extraños (Goldsby y Col.,2004).

Desde el punto de vista funcional, una respuesta inmunitaria puede dividirse en dos reacciones, una de reconocimiento, la cual reconoce de forma específica diferencias químicas que distinguen un agente patógeno de otro y en la reacción efectora en donde se neutraliza al patógeno en cuestión (Roitt, 2003).

#### **1.1.1 Inmunidad Innata y Adaptativa**

A su vez en el sistema inmunitario podemos encontrar a la inmunidad innata y a la inmunidad adaptativa, la inmunidad innata es la protección contra un agente infeccioso de forma natural y a través de receptores que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos, esto quiere decir, que sus componentes se encuentran antes del inicio de una infección y constituye un grupo de mecanismos de resistencia natural contra la enfermedad provocada por un patógeno en particular reconociendo moléculas de los principales agentes infecciosos, en donde las barreras de defensa son las principales medidas de protección (barrera anatómica, fisiológica, fagocítica e inflamatoria). Mientras que la inmunidad adaptativa es específica, esto quiere decir que no actúa hasta que existe un reto antigénico para el organismo, ocurriendo ello, al pasar 5 o 6 días en exposición con algún antígeno, siendo los anticuerpos y los linfocitos T y B los principales componentes de protección en la inmunidad adaptativa (Janeway, 2003).

#### **1.1.2 Compartimiento sistémico y mucoso**

Para estudiar el sistema inmunitario actualmente este suele dividirse en el compartimiento sistémico (bazo, médula ósea y nódulos linfoides) y el compartimiento mucoso (tejido linfoide asociado a las superficies de mucosas y a las glándulas secretoras externas).

Cabe mencionar que en los últimos años se ha afirmado que la mayor parte de los agentes patógenos entran al organismo a través de la vía de mucosas como el tracto gastrointestinal, respiratorio y genitourinario, por ello es de vital importancia desarrollar estrategias de vacunación que induzcan

respuestas inmunes protectoras en los sitios mucosos (Moreno-Fierros y Col.,2000).

### **1.1.3 Respuesta inmunitaria humoral**

Muchos de los patógenos que causan enfermedades infecciosas en seres humanos se multiplican en los espacios extracelulares del cuerpo, mientras que la mayoría de agentes patógenos intracelulares se propagan moviéndose de célula a célula a través de los fluidos extracelulares. Estos espacios extracelulares están protegidos por la respuesta inmunitaria humoral, en la que los anticuerpos producidos por las células B causan la destrucción de los microorganismos extracelulares e impiden la propagación de las infecciones intracelulares. La activación de las células B y su diferenciación a células plasmáticas secretoras de anticuerpo es desencadenada por el antígeno y generalmente de las células T cooperadoras TCD4 (Th2 y algunas Th1) (Roitt, 2003).

### **1.1.4 Las Inmunoglobulinas como defensa en el sistema inmune**

Para reconocer y luchar contra la gran variedad de agentes patógenos con que puede encontrarse un individuo, los linfocitos del sistema inmunitario adaptativo han evolucionado para reconocer una gran variedad de antígenos diferentes de bacterias, virus, parásitos y otros organismos causantes de enfermedades. Las moléculas de las células B que reconocen el antígeno son las inmunoglobulinas o Ig, estas moléculas son producidas por las células B, ellas reconocen un amplio espectro de especificidades de antígeno y cada célula B produce una inmunoglobulina de especificidad única, siendo el receptor B una inmunoglobulina unida a la membrana que se expresa en la superficie de la célula B y sirve como receptor celular del antígeno, estas inmunoglobulinas con especificidad antigénica se denominan anticuerpos, siendo la secreción de anticuerpos la principal función efectora de las células B en la inmunidad adaptativa (Janeway, 2003).

## **1.2 La Vacunación como medida para combatir las infecciones**

La infección es la causa principal de mortalidad en las poblaciones humanas así como en los animales domésticos que utiliza el hombre para su sustento, siendo la vacunación la mayor contribución en los últimos 100 años como medida preventiva para combatir dichas infecciones y gracias a ella se han reducido ostensiblemente la mortalidad por enfermedades infecciosas (Flores, 2004).

Actualmente los investigadores se han dado a la tarea de desarrollar nuevas vacunas que proporcionen una inmunidad efectiva al establecer niveles adecuados de anticuerpos y generar una población programada de células de memoria capaces de expandirse con rapidez ante un nuevo contacto con el antígeno y de este modo proteger contra las infecciones. Además de producir esta inmunidad efectiva,

los antígenos para esta vacuna deben de ser fáciles de obtener y la preparación, estable, económica y segura (Roitt, 2003).

La vacunación es una de las medidas biotecnológicas más promisorias para el control de las enfermedades infecciosas, su uso en humanos se ha circunscrito principalmente a la prevención de infecciones virales (viruela, polio, influenza etc..) y de aquellas en las que el mecanismo patogénico es mediado por productos solubles, como el tétanos y la difteria y mucho menos exitosa ha resultado la vacunación en la prevención de infecciones humanas causadas por protozoarios parásitos como malaria, leishmaniasis y tripanosomiasis y en contraste a esto, en infecciones parasitarias causadas por céstodos apenas se han sugerido algunas vacunas que puedan ser efectivas (Tongren y Col.,2004).

### **1.2.1 Vías de inmunización**

En la actualidad la manera más sencilla de anular la capacidad de los microorganismos para causar enfermedad, pero manteniendo su constitución antigénica es impedir su replicación al destruirlos de forma apropiada, al utilizar organismos muertos en la realización de vacunas (Roitt,2003).

La vía por la cual se administra el antígeno afecta tanto a la magnitud como al tipo de respuesta obtenida. Las vías más comunes por las que se introduce un antígeno de forma experimental o como vacuna en el cuerpo son la inyección subcutánea, intradérmica, intraperitoneal, intramuscular, endovenosa, intranasal y oral (Janawey, 2003).

### **1.2.2 Efectos en la dosis de antígeno**

La magnitud de la respuesta inmunitaria depende de la dosis de inmunógeno administrada, ya que por debajo de cierta dosis umbral, la mayoría de las proteínas no inducen ninguna respuesta inmunitaria y por encima de dicha dosis, se observa un incremento gradual en la respuesta, según se aumenta la cantidad, hasta alcanzar una meseta amplia, seguida de un descenso a dosis elevadas; --

como la mayoría de los agentes infecciosos penetran en el organismo en cantidades muy reducidas las respuestas inmunitarias sólo suelen ser provocadas si los agentes patógenos se multiplican hasta un nivel que exceda la dosis antigénica umbral. En general, las respuestas inmunitarias secundarias se producen a dosis de antígeno más bajas y alcanzan mesetas más altas, lo cual es signo de memoria inmunológica (Goldsby,2004).

### **1.2.3 El efecto de los Anticuerpos en el sistema inmune**

Los anticuerpos fueron las primeras moléculas implicadas en el reconocimiento inmunitario específico que se caracterizaron, la molécula del anticuerpo desempeña dos funciones diferentes: una es unirse específicamente a moléculas del patógeno que desencadenó la respuesta inmunitaria y la otra es reclutar diversas células y moléculas para destruir el patógeno una vez que el anticuerpo se ha unido a él (Janeway, 2004).

Como se dijo anteriormente los agentes patógenos generalmente penetran en el cuerpo a través de las barreras epiteliales de la mucosa de los tractos respiratorio, digestivo y urogenital o a través de una alteración en la piel dañada, por ello estas superficies mucosas, tejidos y sangre son protegidos por anticuerpos, la progenie de una sola célula B puede producir anticuerpos, antígeno-específico contra el mismo inductor, que proporcionan todas las funciones protectoras apropiadas para cualquier compartimiento del cuerpo. Los primeros anticuerpos que se producen en un respuesta inmunitaria humoral son siempre IgM, por que éstos pueden expresar un cambio de isotipo, estos primeros anticuerpos IgM se producen antes de que las células B hayan sufrido hipermutación, pero debido a su gran tamaño las IgM se encuentran confinadas en la sangre y en menor grado en la linfa, ellas ayudan a activar el sistema del complemento todo ello para controlar de manera efectiva la infección, también se produce IgM en respuestas secundarias y subsecuentes pero de forma débil, ya que en las fases tardías de una respuesta de anticuerpos están dominadas por otros isotipos, como IgG, IgA e IgE, siendo la IgG el isotipo principal de la sangre y el fluido extracelular, así como en la opsonización eficaz de los agentes patógenos para que los fagocitos los endociten y activa el sistema del complemento.(Janaway, 2004).

### **1.2.4 Los Adyuvantes**

La mayoría de las proteínas son poco inmunogénicas cuando se administran de forma aislada, mientras que una fuerte respuesta inmunitaria adaptativa contra antígenos proteicos requieren que el antígeno sea inyectado en una mezcla conocida como adyuvante, siendo este adyuvante cualquier elemento que-

aumenta la inmunogenicidad de las sustancias con las que se mezcla, ellos son necesarios sobre todo en las inmunizaciones iniciales (Goldsby,2004).

### **1.2.5 Uso de adyuvantes**

La inmunización profiláctica debe comprender por razones prácticas y económicas un número mínimo de inyecciones y la menor cantidad posible de antígeno. Para obtener estos resultados se utilizan los adyuvantes los cuales son una sustancia incorporada al antígeno o inyectada en forma simultánea con él, que potencia la respuesta inmune al otorgar señales de peligro de infección al organismo (Janeway,2003).

### **1.3 La protoxina Cry 1Ac como adyuvante**

Es de gran importancia estudiar nuevos adyuvantes mucosos que sean seguros y capaces de estimular la respuesta inmunitaria en las mucosas y a nivel sistémico (Vázquez-Padrón y Col., 1999). En base a estudios previos del laboratorio consideramos que la protoxina Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis* reúne las características deseables para un adyuvante para mejorar la eficacia vacunal, ya que ha demostrado que es altamente inmunogénica y tener efectos adyuvantes tanto a nivel sistémico como de mucosas (Moreno-Fierros y Col. 2003). Además esta proteína ofrece ventajas adicionales ya que posee una gran estabilidad, no es tóxica para el hombre ni para vertebrados y sus costos de producción son bastantes económicos debido a que su gen ha sido clonado en *E. coli* (Höfte y Col., 1989).

En reportes previos en el laboratorio de inmunología de mucosas, se ha evaluado la inmunogenicidad a nivel mucosa y sistémica que confiere Cry1Ac al aplicarla por distintas rutas de inmunización en ratones BALB/C, obteniendo resultados alentadores que indican que la inmunización intranasal (in), rectal (r), vaginal, intraperitoneal (ip) y oral con Cry1Ac es capaz de inducir respuestas de anticuerpos en suero y en varias secreciones de mucosa vaginal, intestinal y de tracto respiratorio (Vázquez y Col., 1999, Moreno-Fierros y Col., 2000, Moreno-Fierros y Col., 2002).

También se confirmó que Cry 1Ac posee efectos adyuvantes tan potentes como los de la toxina del cólera tanto a nivel mucoso como sistémico, cuando se evaluaron sus efectos en la respuesta de anticuerpos hacia diferentes antígenos de diferente naturaleza (proteínas y polisacáridos), se encontraron efectos adyuvantes en la respuesta de anticuerpos hacia el antígeno de superficie de hepatitis B (Vázquez-Padrón y Col., 1999), péptidos de VIH (Esquivel,Moreno-Fierros y Col., 2005) y polisacáridos de pneumococos (Moreno-Fierros y Col., 2003). Además se evaluó el potencial de esta proteína como acarreador vacunal de un polisacárido capsular 6B (Moreno-Fierros y Col.,2003) y de un epítipo de la toxina diftérica (Guerrero y Col.,2004, Guerrero y Moreno-Fierros, 2007).

#### **1.3.1 Efecto adyuvante protector de Cry1Ac**

En 2004 se demostró que Cry1Ac posee características adyuvantes protectoras al aplicarlo a un

modelo de meningoencefalitis amibiana primaria en ratón BALB/C, esta enfermedad provocada por *Naegleria fowleri*, provoca la muerte al 100% de los ratones infectados en un lapso no mayor de 7 días (Rojas y Col.,2004).

Interesantemente se encontró que la administración intranasal de Cry1Ac sola protegió al 60% de los animales; mientras que al coadministrar intranasalmente Cry1Ac con antígenos de *Naegleria fowleri* incrementó a un 100% de protección ante la infección, sugiriendo que Cry1Ac activa mecanismos inmunes innatos y adquiridos por lo que se requieren más estudios para determinar los mecanismos involucrados en los efectos protectores conferidos por Cry1Ac, la cual puede ser una herramienta valiosa para mejorar vacunas (Rojas y Col.,2004, Carrasco,2006).

En base a estos antecedentes antes mencionados y a las características particulares que ha mostrado Cry1Ac se considera de gran importancia evaluar el efecto adyuvante protector ante patógenos que difieran en los sitios principales de invasión: mucosa respiratoria, vaginal, peritoneal e intestinal; tales como las infecciones por bacterias como *Mycobacterium tuberculosis* y *Chlamydia* y parásitos como *Entamoeba histolytica* y *Taenia solium* siendo estas un problema importante de salud para la población tanto a nivel nacional como mundial y ello podría mejorar la eficiencia en las vacunas existentes contra dichas infecciones (Moreno – Fierros y Col., 2003).

#### **1.4 Generalidades de los parásitos**

Los parásitos son organismos complejos capaces de infectar al hombre y a los animales con los que convive, al igual que todos los agentes infecciosos, los parásitos inducen una respuesta inmunitaria en el hospedero que invaden, aunque el objetivo de la respuesta inmunitaria es eliminar al patógeno, muchas veces la respuesta inmunidad no logra hacerlo y entonces provoca una infección crónica. La presencia de parásitos dentro del organismo induce una respuesta inmunitaria específica contra dicho organismo, ya sea de tipo humoral (presencias de anticuerpos) o de tipo de celular (linfocitos T específicos) (Flores, 2004).

##### **1.4.1 Respuesta inmune ante parásitos**

Cabe mencionar que los parásitos poseen una estructura antigénica muy compleja, es decir, expresan muchas proteínas diferentes, además muchos de ellos presentan ciclos biológicos complejos, ya que incluyen la participación de 2 hospederos, la invasión de varios tipos celulares en el mismo hospedero y la transformación en diferentes estadios en el mismo hospedero (Flores, 2004).

#### **1.5 Generalidades de *Taenia solium***

Uno de los parásitos de gran importancia a nivel de salud poblacional es *Taenia solium*, este pertenece

a las subclase *Eucestoda*, el orden *Cyclophyllidea* y a la familia *Taeniidae*. El adulto de *Taenia solium* es un cestodo que mide 2 – 4 metros de longitud, y la fase larvaria es el cisticerco que es un metacéstodo invaginado de 0.5 a 1.0 cm de diámetro y se observan a simple vista como esferas blanquecinas suspendida en una vesícula llena de líquido, mientras que los huevos son esféricos y miden de 47 a 77 micras de diámetro (Brusca, 2005).

Este parásito presenta tres estados de desarrollo: el estado adulto (gusano o tenia), el estado larvario (cisticerco) y el huevo. El estado adulto del parásito se desarrolla a partir de la ingestión de la fase larvaria, la cual una vez ingerida se desarrolla al estado adulto (tenia) anclándose en la mucosa intestinal a través de una cabeza armada con dos coronas de ganchos y ventosas, seguida de la cabeza continua el cuello y después comienzan a crecer los estróbilos y en su interior las unidades reproductivas de las tenias llamadas proglótidos, cada uno de estos proglótidos esta equipada de gónadas sexuales masculinas y femeninas las cuales se autofecundan y generan huevos los cuales al madurar son infectivos y desechados por el portador en la materia fecal, cabe mencionar que cada proglótido puede formar hasta 50,000 huevos, estos huevos quedan accesibles al medio y están constituidos por un embrión protegido por una capa resistente a las adversidades del medio ambiente. Cuando un humano o cerdo ingiere accidentalmente estos huevos, ellos eclosionan con ayuda de los jugos gástricos y entonces migra por el torrente sanguíneo invadiendo tejidos y pasando a su estadio larvario (cisticerco) causando la enfermedad llamada cisticercosis. El ciclo de vida del parásito se completa cuando el hombre consume carne de cerdo con cisticercos y estos al llegar al intestino delgado pasan del estado larvario al estado de gusano plano (tenia) (Barnes, 2003).

La infección por *Taenia solium* es endémica en la mayoría de los países de África, Asia, América Central y Sudamérica (sobre todo en México, Perú y Chile) aunque también se encuentra en algunos países de Europa. La migración de individuos de zonas endémicas a países desarrollados ha contribuido en gran medida a que la teniasis aumentara en zonas donde no existía o se había erradicado (Tay y Col. ,2002).

Según la OMS, más de dos millones de personas albergan el parásito adulto y muchas más padezcan neurocisticercosis, esto debiéndose principalmente a las condiciones que favorecen la presencia de esta parasitosis incluyéndose la deficiencia en la higiene personal, de alimentos y domiciliaria, el fecalismo al aire libre, y sobre todo la mala infraestructura en la higiene y mantenimiento del ganado agropecuario y los cerdos en donde el pastoreo libre y la costumbre de utilizar estos para eliminar las excretas humanas. ya que el ciclo de biológico *Taenia solium* comienza en que el estado adulto (solitaria) se aloja en el intestino del hombre, en donde los huevos liberados de ellas se eliminan con la materia fecal y cuando el cerdo ingiere heces humanas, alimentos o agua contaminada con huevos, las



oncósferas se liberan y se activan a su paso en el estómago e intestino por la acción del ácido clorhídrico, las oncósferas activadas penetran en el intestino delgado y perforan los vasos sanguíneos pequeños para ingresar al torrente circulatorio, en el cual migran hasta órganos blanco (músculo estriado, corazón, cerebro, ojo y tejido subcutáneo) donde se establecen y desarrollan hasta alcanzar la fase de metacéstodo (cisticercosis), estos permanecen viables por largos periodos por lo que al ingerir carne de cerdo cruda o cocida de mudo insuficiente, el metacéstodo se evagina a su paso por el estómago y el intestino hasta alcanzar el tercio superior del duodeno; allí se fija con sus ventosas y comienza a crecer hasta formar el adulto, así mismo el hombre al igual que el cerdo adquiere la cisticercosis por consumir alimentos o agua contaminada con huevos provocando la neurocisticercosis (NC) (Brown, 1999).

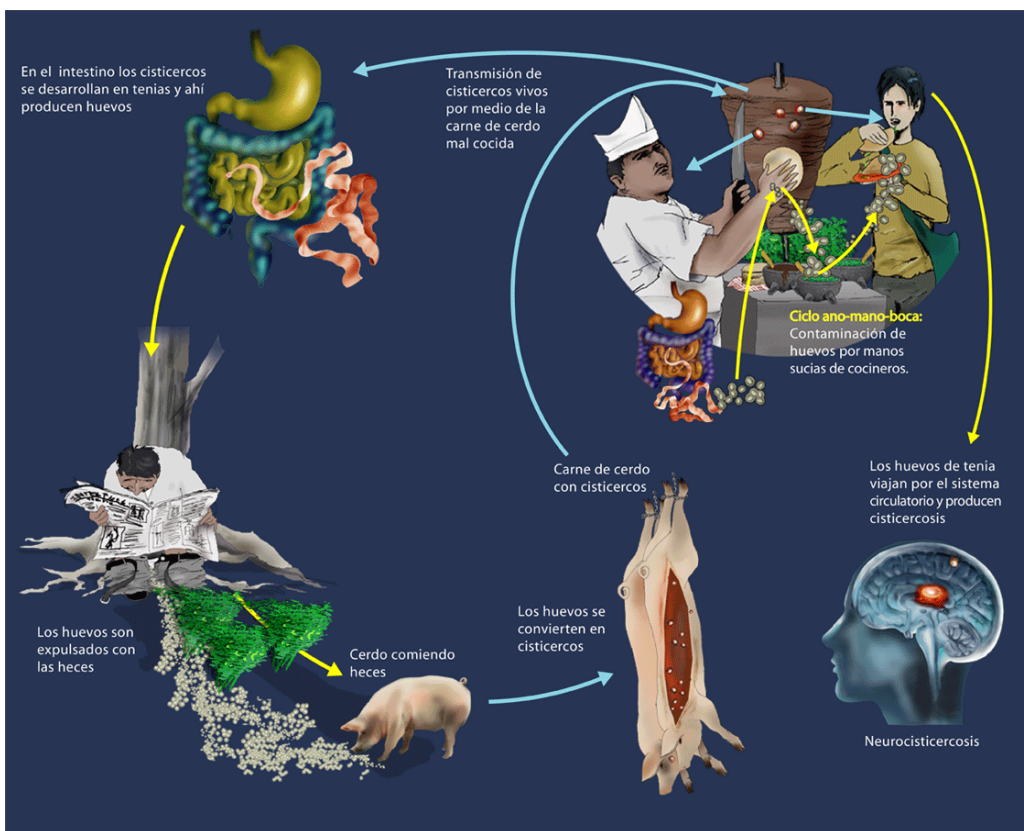


Imagen 1. Ciclo de vida de *Taenia solium*

Actualmente la población porcina en México es de 15'128,085 de animales y de éstos se calcula que alrededor del 60% son cerdos de granja, criados en condiciones altamente tecnificadas de confinamiento estricto, en espacios reducidos y sin ningún contacto con la tierra, aguas fluviales o estancadas., mientras que los animales restantes, que se calcula entre el 30 y 40% de la cantidad total, corresponden a los llamados "cerdos de traspatio " los cuales corren el riesgo de estar infectados, siendo estas cifras alarmantes por lo que es necesario diseñar vacunas que rompan el ciclo de vida del

parásito a nivel del hospedero intermediario (el cerdo) (Aluja y Col., 2006).

### **1.5.1 Vacunación contra *Taenia Solium***

En los últimos años se han tratado crear distintas vacunas que ayuden a erradicar la cisticercosis en los cerdos en donde la evidencia señala que diferentes antígenos del parásito, provenientes de las distintas fases de su desarrollo, y desde extractos totales de oncósferas o de cisticercos, antígenos del líquido vesicular de cisticercos, antígenos semipurificados y recombinantes, hasta antígenos provenientes de otros cestodos (*Taenia crassiceps*, *Taenia saginata*, *Taenia ovis*), han demostrado reducir la tasa de infección y la carga parasitaria en los cerdos vacunados en condiciones experimentales, en donde la primera vacuna reportada efectiva contra la cisticercosis porcina en México consistió en un extracto total de antígenos de cisticercos de *T. solium* extraídos de cerdos infectados (Flisser y Col., 2006).

En investigaciones posteriores se buscaron identificar, aislar y producir los antígenos responsables de la protección inmunológica, con el fin de eliminar componentes irrelevantes y potencialmente patógenos, así como para estabilizar y uniformar la actividad inmunogénica. Actualmente existe una vacuna, constituida por tres péptidos producidos en forma sintética (S3Pvac), y es a la fecha la única vacuna compuesta por antígenos definidos y validada en campo mexicano (Sciutto y Col., 2006).

Pero aún quedan muchos aspectos a considerar para fabricar otras vacunas que sean más eficaces empleando estrategias adicionales como el uso de adyuvantes y formas de presentación de los antígenos vacunales que puedan potenciar la inmunogenicidad de la vacuna, con una consecuente reducción del número y cantidad de las dosis, así como contemplar formas alternativas en las vías de administración de la vacuna (Chavarría y Col., 2006).

### **1.5.2 Ciclo de vida de *Taenia crassiceps***

En el ciclo de vida de *Taenia crassiceps* la forma adulta se desarrolla de forma natural en el intestino de zorros, perros y lobos, mientras que el cisticerco o forma larval infecta a ratones y a otros pequeños roedores, este presenta una alta tasa de reproducción, la cual se debe a la propiedad de reproducirse asexualmente por gemación en la zona opuesta al escólex tanto en la parte externa como en la parte interna del cisticerco siendo ella una característica muy rara en los parásitos, así mismo estudios comparativos entre *Taenia crassiceps* y *Taenia solium* demostraron que existe alto grado de homología entre los antígenos de ambos parásitos sugiriendo que el antígeno obtenido de *Taenia solium* puede ser sustituido por el antígeno obtenido de *Taenia crassiceps* (Mooney, y Col., 2000).

Además *Taenia crassiceps* tiene la ventaja de tener muy buena reproducibilidad, el fácil

mantenimiento de la cepa en animales de laboratorio, representando así a futuro, la producción de grandes cantidades de antígeno a bajo costo, en contraste con las serias dificultades técnicas y económicas que se presentan al obtener el antígeno de *Taenia solium* (Botero y Col., 2004).

## 1.6 Respuesta tipo Th1 y Th2

En los últimos años se ha acumulado una gran evidencia que sugiere la existencia de una polarización funcional en la respuesta de las células T CD4+ basado en su perfil de secreción de citocinas. Unas células T de tipo 1 (Th1) producen IFN-gamma, IL-2 y factor de necrosis tumoral beta (TNF-B) los cuales activan macrófagos y son responsables de la inmunidad celular mediada por células. En contraste unas células T cooperadoras de tipo 2 (Th2) producen IL-4, IL-5, IL-10, e IL-13, las cuales son responsables de una fuerte respuesta por anticuerpos e inhiben muchas de las funciones del macrófago. Las respuestas Th1 preferentemente se desarrollan durante las infecciones por bacterias intracelulares, mientras las células Th2 predominan durante las infestaciones por nemátodos gastrointestinales. La polarización de las células Th1 y Th2 no solamente produce un diferente grupo de citocinas, las que resultan en distintas propiedades funcionales, sino también muestran una expresión preferencial de algunos marcadores. Muchos factores pueden influir en la diferenciación de las células T. Los que incluyen los perfiles de citoquinas de la "inmunidad natural" que son evocados por diferentes agentes ofensivos, la naturaleza de los péptidos ligantes, así como también la actividad de algunas moléculas coestimulantes y hormonas secretadas en el microambiente, en el contexto general. En adición, los diferentes papeles que juegan en la protección. La polarización de las respuestas de tipo Th1y de tipo Th2 pueden también ser responsables para diferentes tipos de reacciones inmunológicas en humanos. Las respuestas dominantes Th1 están involucradas en la patogénesis de desórdenes autoinmunes órgano específicos, como la enfermedad de Crohn, la úlcera péptica inducida por *Helicobacter pylori*, el rechazo agudo al alotrasplante de riñón, los abortos recurrentes no explicados. En contraste las respuestas alergenoespecíficas Th2 predominan en el síndrome de Omenn, la Fibrosis pulmonar idiopática, la esclerosis sistémica progresiva y juegan un papel en la rápida evolución de la infección por VIH a SIDA. El paradigma Th1/Th2 no solamente permite una mejor comprensión de los mecanismos envueltos en la protección, sino también en la patogénesis de muchos desórdenes inmunopáticos, pero también nos provee de una base para el

desarrollo de nuevos tipos de vacunas contra agentes infecciosos y de nuevas estrategias para la terapia de la alergia y las enfermedades autoinmunes (Romagnani y Col., 1999).

### **1.6.1 Características de las principales citocinas Th1 y Th2**

Las citocinas juegan un papel importante en las respuestas para controlar y limpiar las infecciones contra parásitos patógenos en donde el IFN- $\gamma$  e IL-2 son inducidas en la respuesta temprana asociadas a las Th1, mientras que las Th2 son asociadas a respuestas tardías donde se incluyen las citocinas IL-4, IL-5, IL-10 y IL-13 (Romagnani y Col., 1999).

#### **1.6.1.1 Citocina IL-5**

La citocina IL-5 es una interleucina producida por los linfocitos T Helper-2 y los mastocitos. Sus funciones son estimular el crecimiento de las células B y aumentar la secreción de inmunoglobulinas. Actúa también como mediador en la activación de los eosinófilos. El gen de la IL-5 está localizado en el cromosoma 11 próximo a los genes que codifican la IL-3, la IL-4 y el factor estimulante de crecimiento de colonias granulocítico-macrófago (GM-CSF) que son frecuentemente co-expresados en las células Th2 (González y Col.,2007).

#### **1.6.1.2 Citocina IL-4**

La IL-4, es una glucoproteína del grupo de las citocinas, producida por las células T de tipo 2 (Th2), basófilos, mastocitos y eosinófilos activados. Actúa como antiinflamatorio al bloquear la síntesis de IL-1, TNF-alfa, IL-6 y la proteína inflamatoria del macrófago. La IL-4 participa en la regulación del sistema inmunológico en múltiples niveles. Entre otras funciones, promueve la diferenciación de linfocitos Th2, la proliferación y diferenciación de linfocitos B y es un potente inhibidor de la apoptosis. La IL-4 tiene un papel importante en el desarrollo de enfermedades atópicas como el asma, la dermatitis atópica o la anafilaxis sistémica (González y Col.,2007).

#### **1.6.1.3 Citocina IL-2**

La IL-2 es una proteína componente de las citocinas del sistema inmune. Actúa como factor de crecimiento de los linfocitos T, induce todos los tipos de subpoblaciones de linfocitos y activa la proliferación de linfocitos B, también regula la respuesta inmunitaria, interviene en la reacción inflamatoria estimulando la síntesis de interferón, induce la liberación de IL-1, TNF-alfa y TNF-Beta. IL-2 es necesaria para el establecimiento de la memoria inmunitaria celular, así como para el reconocimiento de autoantígenos y antígenos (González y Col.,2007).

#### **1.6.1.4 Citocina TNF- $\alpha$**

El factor de necrosis tumoral, TNF, abreviatura del inglés Tumor necrosis factor, es una sustancia química del grupo de las citoquinas que es liberada por células del sistema inmune. Esta sustancia interviene en la inflamación y la destrucción articular. El TNF $\alpha$  está relacionado con los glóbulos blancos de la sangre, el endotelio y otros tejidos en el transcurso de distintas agresiones celulares como por ejemplo las infecciones. Su estimulación está relacionada con otros mediadores celulares como la interleucina 1 y endotoxinas bacterianas. El TNF ejerce distintas funciones en diferentes órganos, como la activación de la producción de otros mediadores como las interleucinas 1 a la 6.

La liberación de TNF- $\alpha$  produce activación local del endotelio vascular, liberación de óxido nítrico con vasodilatación y aumento de la permeabilidad vascular, que conduce al reclutamiento de las células inflamatorias, inmunoglobulinas y complemento, provocando la activación de los linfocitos T y B. También aumenta la activación y adhesión plaquetaria y, probablemente, la oclusión vascular sea la causa de la necrosis tumoral, de donde proviene su nombre. Las funciones del TNF se deben a su unión a 2 receptores celulares diferentes que se localizan en diferentes células como neutrófilos, células endoteliales y fibroblastos. Además estos receptores se encuentran en estado solubles en el suero y en el líquido sinovial. Aunque localmente los efectos del TNF- $\alpha$  son beneficiosos, cuando el TNF actúa por todo el organismo sus efectos son desastrosos provocando síndromes como el shock séptico y la coagulación intravascular diseminada (González y Col.,2007).

#### **1.6.1.5 IFN- $\gamma$**

El interferón gamma (IFN- $\gamma$ ), también llamado interferón inmunitario o de tipo II, es un tipo de citoquina producida por los linfocitos T y natural killer (NK). El interferón gamma participa en la regulación de las respuestas inmune e inflamatoria este se produce en células T activadas teniendo efectos antivirales y antitumorales, pero generalmente débiles, sin embargo, potencia los efectos del interferón alpha y beta. El interferón gamma es expulsado por las células Th1 y envía leucocitos al punto de infección, dando como resultado una inflamación. También estimula a los macrófagos para eliminar bacterias que han sido fagocitadas, también importante en la regulación de la respuesta de las células Th2. Sus acciones básicas del IFN-gamma es la de impedir la replicación en células infectadas que aún no han sido destruidas por la acción vírica y la de activar a los NK capaces de reconocer células infectadas por virus y eliminarlas, de esta forma ayuda a evitar la replicación vírica en células aún sanas y, por otro lado, favorece la destrucción de las células ya infectadas (Romagnani y Col.,1999).

### **1.6.2 Respuesta Th1 y Th2 en la patología causada por *Taenia crassiceps***

Se ha demostrado que en la cisticercosis experimental causada por el helminto *Taenia crassiceps*, el índice de producción de citocinas polariza al tipo Th2, otra característica clave de esta parasitosis es el cambio gradual de la respuesta Th1 a una fuerte respuesta Th2 en el hospedero infectado, esto se debe a consecuencia de la complejidad de esta infección, ya que generalmente estas infecciones por helmintos-- inducen una respuesta inmune tipo Th2, la cual ha sido asociada a una respuesta celular proliferativa disminuida a antígenos parasitarios o a antígenos no relacionados en sus hospederos, observándose en estas infecciones altos niveles de eosinófilos, inmunoglobulinas y mastocitos (Terrazas y Col.,1998 Montero,2006).

En la cisticercosis experimental contra *Taenia crassiceps*, es sabido que la cepa de ratón BALB/C son particularmente susceptibles a la infección larval de *Taenia crassiceps* y se produce predominantemente una respuesta de tipo Th2, existiendo por lo tanto una producción de IL-4, IL-6 e IL-10 y una poca de IL-2 e IFN- $\gamma$ , este tipo de respuesta Th2 en los ratones BALB/C es ineficaz para controlar la infección larval, así mismo la respuesta Th1 provee mas protección contra dicha infección pero esta solo se manifiesta en la respuesta inmune tardía (Terrazas,2007).

## **2. JUSTIFICACIÓN**

En la actualidad aún no existe una vacuna que proteja al 100 % de la infección por *Taenia solium* por lo que es necesario mejorar las estrategias de vacunación contra dicha infección parasitaria que afecta a gravemente a millones de individuos. Así mismo tomando en cuenta que la protoxina Cry1Ac confiere efectos adyuvantes, pero sus efectos inmunoprotectores solo se han evaluado en un modelo de infección parasitaria (*Naegleria fowleri*). Siendo importante determinar si la administración con Cry1Ac tiene un efecto de protección contra la infección experimental provocada por el helminto *Taenia crassiceps*, el cual es un modelo murino ya establecido y que ha demostrado ser útil para el estudio de la inmunoprotección hacia *Taenia solium* (Toledo y Col., 1998).

Además es importante conocer los eventos inmunológicos que ocurren durante tiempos iniciales y finales de la infección experimental en animales inmunizados.

## **3. PROPUESTA**

Por lo tanto en el presente trabajo se analizó la protección hacia la infección con metacéstodos de *Taenia crassiceps* en ratones controles y en animales previamente inmunizados con i) extracto, ii) extracto coadministrado con Cry1Ac o iii) con Cry1Ac, además se caracterizó la respuesta de anticuerpos específicos y de citocinas inducidas en suero a diferentes tiempos después de la inmunización y durante la infección.

## **4. OBJETIVOS.**

### **4.1 OBJETIVO GENERAL**

1. Determinar si la inmunización; con Cry1Ac, con antígenos de *Taenia crassiceps* solos o coadministrados con Cry1Ac, tienen un efecto protector ante la infección por *Taenia crassiceps* y si modifican la respuesta de anticuerpos y el patrón de citocinas inducidos en ratones BALB/C.

### **4.2 OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Determinar si la inmunización de ratones BALB/C con Cry1Ac sola, con antígenos de *Taenia crassiceps* solos o coadministrados con Cry1Ac, (tres inmunizaciones, una cada semana) inducen protección contra la infección de *Taenia crassiceps*.

1.1. Determinar si Cry1Ac tiene un efecto protector en el modelo de cisticercosis murina con *Taenia crassiceps* en ratones BALB/C al ser inmunizados con 3 dosis (1 cada semana).

1.2. Determinar si la coadministración de Cry1Ac más antígenos de *Taenia crassiceps* tiene un efecto

protector en el modelo de cisticercosis murina con *Taenia crassiceps* en ratones BALB/C al ser inmunizados con 3 dosis (1 cada semana).

1.3. Determinar si los antígenos de *Taenia crassiceps* confieren efectos de protección en el modelo de cisticercosis murina en ratones BALB/C al ser inmunizados con 3 dosis (1 cada semana).

2. Analizar las respuestas de anticuerpos específicas que se inducen después de la inmunización con Cry1Ac, con extracto de *Taenia crassiceps* o por la coadministración de Cry1Ac más extractos; y en ratones controles después de la infección con metacéstodos de *Taenia crassiceps*.

2.1. Analizar la respuesta de anticuerpos anti cisticercos inducida en suero sanguíneo de ratones BALB/C a diferentes tiempos después de la inmunización con antígenos de metacéstodos de *Taenia crassiceps*.

2.2. Analizar la respuesta de anticuerpos anti cisticercos inducida en suero sanguíneo de ratones BALB/C inmunizados y no inmunizados a diferentes tiempos después de la infección con metacéstodos de *Taenia crassiceps*.

3. Analizar que citocinas se inducen después de la inmunización con Cry1Ac y con extracto de *Taenia crassiceps* y después de infección con metacéstodos de *Taenia crassiceps*.

3.1. Analizar la cinética de citocinas inducida en suero sanguíneo de ratones BALB/C a diferentes tiempos después de la inmunización con antígenos de metacéstodos de *Taenia crassiceps*

3.2. Analizar la cinética de citocinas inducida en suero sanguíneo de ratones BALB/C inmunizados y no inmunizados a diferentes tiempos después de la infección con metacéstodos de *Taenia crassiceps*.



## **5. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.1 Obtención de la cepa de cisticercos de *Taenia crassiceps***

Se trabajó con la cepa de de cisticercos de *Taenia crassiceps* la cual fue donada por el Dr. Ignacio Terrazas Valdez del laboratorio Inmunoparasitología en UBIMED, la forma de mantener la cepa es con la extracción de metacéstodos de *Taenia crassiceps* de la cavidad peritoneal de ratones Balb/c previamente parasitados con 12 semanas de infección, dichos parásitos se lavaron 3 veces con PBS para escoger los que midieran entre 1 a 2 mm de longitud, para después realizar una inyección intraperitoneal con una jeringa de 3 ml la cual contenía 20 cisticercos de *Taenia crassiceps* suspendidos en PBS a ratones Balb/c entre 6 – 8 semanas de edad (Montero, 2006).

### **5.2 Obtención de la protoxina Cry 1 Ac**

Se trabajó con la cepa recombinante de *E.coli* JM103 (pOS9300). Las bacterias se cultivaron en medio Luria Bertani (LB) conteniendo 50 mg/ml de ampicilina. La inducción de la proteína Cry 1Ac se realizó agregando al medio de cultivo isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopiranosido al 1mM (IPTG) (Ge et al,1990). A las 48 horas de cultivo, las bacterias se cosecharon por centrifugación a 10,000 x g por 10 minutos, después las pastillas celulares se resuspendieron en buffer TE (Tris-HCl 50 mM sodio etil-diamino tetraacetato (EDTA) 50 mM, pH 8) y se sonicaron con el (Ultrasonic Peosessor) tres veces por cinco minutos en hielo. Posteriormente los cuerpos de inclusión fueron colectados por centrifugación (10,000 x g por 10 minutos). El paquete celular obtenido se lavó dos veces con TE; dos veces con Na Cl 0.5 conteniendo 1% de Tritón X-100 y una vez con agua bidestilada fría. Lo que se obtiene finalmente es la protoxina Cry1Ac la cual se solubilizó en buffer CBP (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.1 M pH 9.6, 2  $\mu$  mercaptoetanol al 1%) 30 minutos a 37°C. El material que se haya particulado se descartó por centrifugación a 10,000 x g por 10 minutos. Por último, se determinó la concentración de la proteína se cuantificándola por la técnica de Bradford y la pureza de la proteína se determinó por electroforesis SDS-PAGE (Vázquez y Col., 1999, Moreno-Fierros y Col.,2000, 2002, 2003).

### **5.3 Obtención del extracto de cisticercos de *Taenia crassiceps*.**

En ratones BALB/C con 8 a 12 semanas de edad con infección de *Taenia crassiceps*, se les extrajeron los metacéstodos de la cavidad peritoneal y se lavaron con PBS 3 veces,

para así obtener un paquete celular de 7 ml de metacístodos, al cual se le agregó una tableta de inhibidor de proteasas (mini-complete de Roche) para posteriormente lisarlos con un sonicador todo se realizó en frío, (Molinari y Col., 1997) hecho el extracto se realizaron varias alícuotas de 1 ml en tubos eppendor. Finalmente se cuantificaron las proteínas mediante la técnica de Bradford y verificando el patrón de proteínas mediante electroforesis SDS-PAGE.

#### 5.4 Estrategia experimental

Para el estudio se tuvieron 4 grupos experimentales de ratones BALB/C los cuales fueron:

Tabla 1. Grupos experimentales.

Grupo	Tratamiento	Número de Hembras
Cry1Ac	3 inmunizaciones intraperitoneales (1 cada 7 días) con 50 µg de Cry 1Ac	12 hembras BALB/C
Extracto	3 inmunizaciones intraperitoneales (1 cada 7 días) con 50 µg de extracto de cisticercos de <i>Taenia crassiceps</i> .	12 hembras BALB/C
Extracto + Cry1Ac	3 inmunizaciones intraperitoneales (1 cada 7 días) con 50 µg de extracto de cisticercos de <i>Taenia crassiceps</i> + 50 µg de Cry 1Ac	12 hembras BALB/C
Vehículo	Controles o testigo 3 inmunizaciones intraperitoneales (1 cada 7 días) con 50 µl de solución salina estéril	12 hembras BALB/c

Tabla. 1 Distribución de los ratones inmunizados e infectados.

Se tuvieron 12 ratones hembras como repeticiones de cada tratamiento, los cuales fueron inmunizados intraperitonealmente con Cry1Ac, extracto y Cry1Ac + extracto. Las inmunizaciones se realizaron 3 veces 1 cada semana con 50 µl de Cry 1AC, 50 µl de extracto y 50 µl de Cry1Ac + 50µl de extracto. Al pasar 7 días de la última inmunización fueron retados con 16 metacéstodos de *Taenia crassiceps*, cuidando la homogeneidad en los tamaños de los metacéstodos al ser inoculados en cada ratón por medio de una jeringa de 3 ml con PBS vía intraperitoneal.

### **5.5 Obtención de muestras**

Para la determinación de los niveles de anticuerpos y presencia de citocinas en los ratones BALB/C inmunizados y/o infectados previamente inmunizados, se obtuvieron muestras de suero; los ratones fueron sangrados por la cola a distintos tiempos: 24 y 48 horas después de la primera, segunda y tercera inmunización así como a los tiempos 0, 1, 2, 3, 7, 9, 14, 21, 28 y 35 días después del reto con los 15 metacéstodos de *Taenia crassiceps*, obteniendo así 16 diferentes tiempos pre y post infección. La sangre de los ratones se centrifugó a 5,000 x g por 10 min a 4°C para obtener el suero, el cual fue almacenado a -70°C hasta su posterior análisis.

### **5.6 Anticuerpos anti- *Taenia crassiceps* en suero**

Títulos específicos de anticuerpos anti *Taenia crassiceps* (IgG1, IgG2a, IgG e IgM) fueron determinados por la técnica de ELISA. Placas de 96 pozos fueron recubiertas con 100 µl/pozo de extracto de cisticercos de *Taenia crassiceps* (10 µg proteína/ml) en buffer de carbonatos (0.1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) y se incubaron toda la noche a 4°C, después se lavaron con PBS-Tween (PBS-T), se bloquearon con leche descremada al 6 % en PBS-T y se incubaron 2 horas a temperatura ambiente. Diluciones seriadas de suero fueron colocadas en las placas y se incubaron toda la noche a 4°C. Posteriormente, las placas se lavaron con PBS-T y se agregaron anticuerpos conjugados y peroxidados anti-IgG, 1:6000; anti-IgM, 1:3000 (Pierce, Rockford, IL) de cabra; anti-IgG1 e IgG2a (Zymed

Laboratories, San Francisco, CA) de ratón, los anticuerpos se incubaron toda la noche a 4°C. Después de ello, las placas se lavaron 3 veces con PBS-T y se adicionó la solución reveladora (o- fenilendiamina 0.4 mg/ml, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.04% en buffer de fosfato-citrato 50mM). Por último la absorbancia se midió a 595 nm en un lector de microplacas (Thermo Labsystems).

### **5.7 Niveles de citocinas en suero**

Los niveles de citocinas en suero (IL-2, IL-4, IL-4, TNF- $\alpha$  e INF- $\gamma$ ) fueron evaluados por medio de citometría de flujo con un de un Kit de citocinas para Th1/Th2 BD Cytometric Bead Array (CBA). Primeramente se construyó la curva estándar de citocinas en un tubo falcon con esferas y 2 ml de Assay diluyent mezclando únicamente con la pipeta (sin vortex) y se marco como Top-estándar dejando incubar 15 minutos. Se marcaron tubos ependorf para la curva de la siguiente manera:  $\frac{1}{2}$ ,  $\frac{1}{4}$ ,  $\frac{1}{8}$ ,  $\frac{1}{16}$ ,  $\frac{1}{32}$ ,  $\frac{1}{64}$ ,  $\frac{1}{128}$ ,  $\frac{1}{256}$  y se agregó 300  $\mu$ l de diluyente y después de transfirió 300  $\mu$ l del tubo top estándar a cada tubo ependorf. Para las perlas de captura se tomaron 5  $\mu$ l de cada citocina y se mezclaron calculando el número de muestras mas los 10 tubos de la curva, para después agregar 25  $\mu$ l a cada tubo de muestra de las perlas de captura y 25  $\mu$ l del agente de detección Mouse PE detection Reagent, dejando incubar cada tubo 2 horas a temperatura ambiente protegiendo con papel aluminio el paso de la luz, Pasando el tiempo de incubación se agregó 1 ml de amortiguador de lavado a cada tubo y se centrifugaron por 5 minutos a 1500 rpm descartando el sobrenadante de cada tubo y finalmente agregar 300  $\mu$ l de amortiguador de lavado y resuspender las pastillas, quedando las muestras listas para la lectura en el citómetro (CBA).

### **5.8 Conteo total de cisticercos**

Después de transcurridos 35 días de haber sido retados los grupos con los 15 metacéstodos de *Taenia crassiceps* los ratones BALB/C fueron sacrificados y se sacaron de su cavidad peritoneal todos los cisticercos para ser contados con un microscopio estereoscópico anotando diferencias en la cantidad así como en tamaño, fase de vida y morfología. Para de esta forma graficar las diferencias entre los 4 tratamientos por medio de una gráfica de barras en Excel.

### **5.9 Análisis estadístico**

Los datos representan la media  $\pm$ , el error estándar de la cantidad de cisticercos encontrados en la cavidad peritoneal a los 35 días post infección en los diferentes grupos de ratones, así como los títulos de anticuerpos y los niveles de citocinas. Para determinar diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.05$ ) entre los grupos se utilizó la prueba de t de Student (Murray y Spiegel, 1990).

## **6. RESULTADOS**

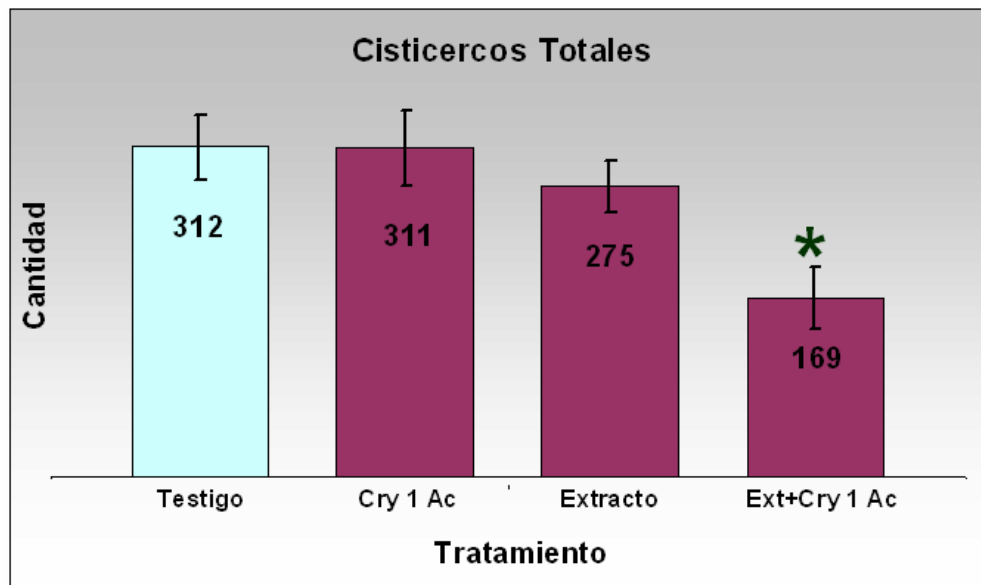
En este trabajo se midió la protección conferida por la inmunización realizada con tres distintos tratamientos (Cry1Ac, extracto y extracto + Cry1Ac) contra la infección de cisticercos de *Taenia crassiceps* en ratones BALB/C de 8 a 11 semanas, y se caracterizó la respuesta inmunológica.

Los ratones recibieron tres inmunizaciones (una cada semana) y una semana después de la última inmunización se retaron con 16 cisticercos de forma intraperitoneal. La protección se analizó realizando el conteo total de cisticercos encontrados en la cavidad peritoneal a los 35 días de infección. Mientras que la caracterización de la respuesta de anticuerpos y el análisis de citocinas se realizó en sueros obtenidos a diferentes tiempos después de la inmunización y durante la infección.

### **6.1 Conteo de cisticercos encontrados en la cavidad peritoneal a los 35 días de infección con cisticercos de *Taenia crassiceps*.**

#### **6.1.1 Conteo total de cisticercos al final de los 35 días de infección**

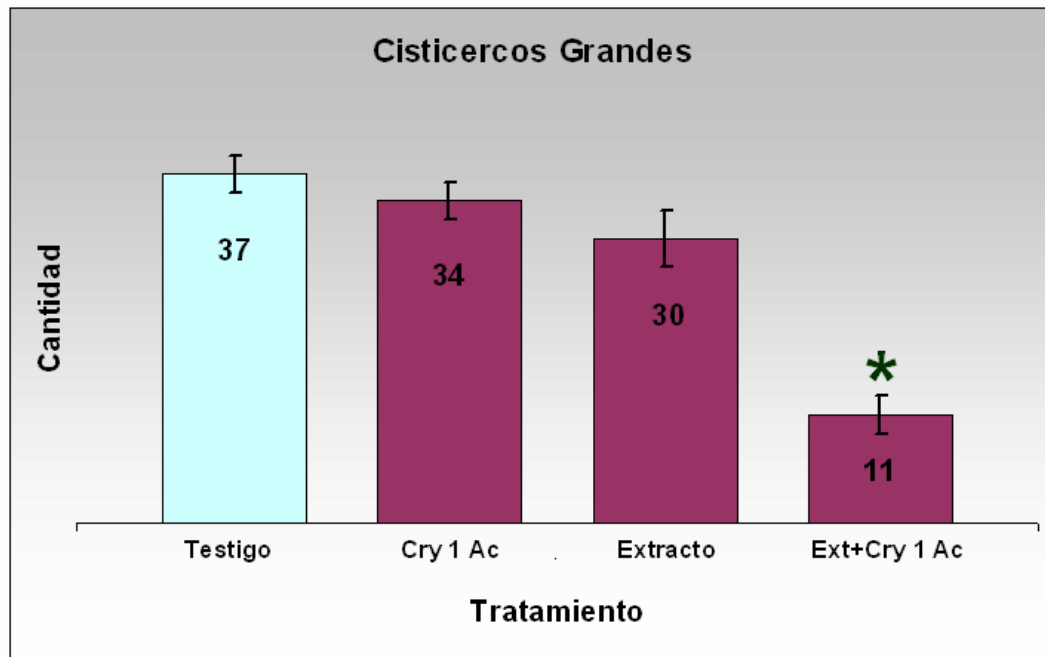
Como se muestra en la Figura 1 al término de los 35 días (5 semanas) de infección, el promedio total fue de 312 cisticercos para el grupo testigo, 311 cisticercos para el grupo Cry1Ac, 275 para el grupo extracto y 169 para el grupo extracto + Cry1Ac. Por lo tanto el tratamiento que mostró tener más efecto protector fue el grupo inmunizado con Extracto + Cry1Ac, mientras que el tratamiento con Cry1Ac no presentó actividad protectora.



**Fig. 1.** Conteo de cisticercos totales de los 3 tratamientos en comparación con el grupo testigo a los 35 días de infección.(\*) Se muestran las diferencias significativas respecto al grupo testigo.

### 6.1.2 Conteo de cisticercos grandes obtenidos por tratamiento

En la figura 2 se muestran los cisticercos grandes que se encontraron en la cavidad peritoneal los cuales miden más de 1 cm y generalmente están en estado de gemación siendo ellos bastante globosos; esto significa que estos cisticercos están próximos a reproducirse de manera asexual y dar como resultados más cisticercos pequeños. Al tiempo del conteo se notó como el grupo extracto + Cry1Ac tuvo un promedio de 11 cisticercos grandes, estos no fueron globosos y no estaban en estado de gemación. El grupo Cry1Ac obtuvo un promedio de 34 cisticercos grandes, mientras que el tratamiento con extracto obtuvo un promedio de 30 cisticercos grandes, mostrando ambos tratamientos no fueron diferentes del grupo testigo el cual obtuvo un promedio de 37 cisticercos.

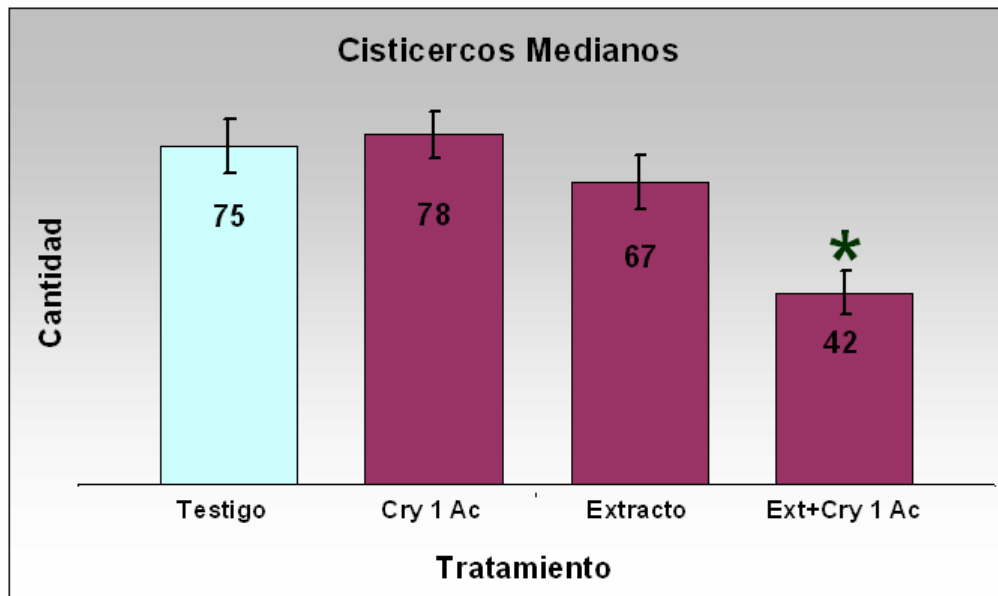


**Fig. 2.** Conteo de cisticercos grandes de los 3 tratamientos en comparación con el grupo testigo a los 35 días de infección.(\*) Se muestran las diferencias significativas respecto al grupo testigo.

### 6.1.3 Conteo de cisticercos medianos por tratamiento

Los cisticercos medianos se consideran los que son mayores de 20 mm pero menores de 1 cm estos fueron los segundo en abundancia en todos los tratamientos, en donde nuevamente el grupo extracto + Cry1Ac fue el que mostró mayor protección obteniendo una promedio de 42 cisticercos medianos, seguidos del grupo extracto que obtuvo 67 cisticercos y finalmente el grupo Cry1Ac que obtuvo 78 cisticercos medianos en promedio mostrando este ultimo no protege ya que el valor es similar al del grupo testigo que obtuvo un promedio de 75 cisticercos medianos.

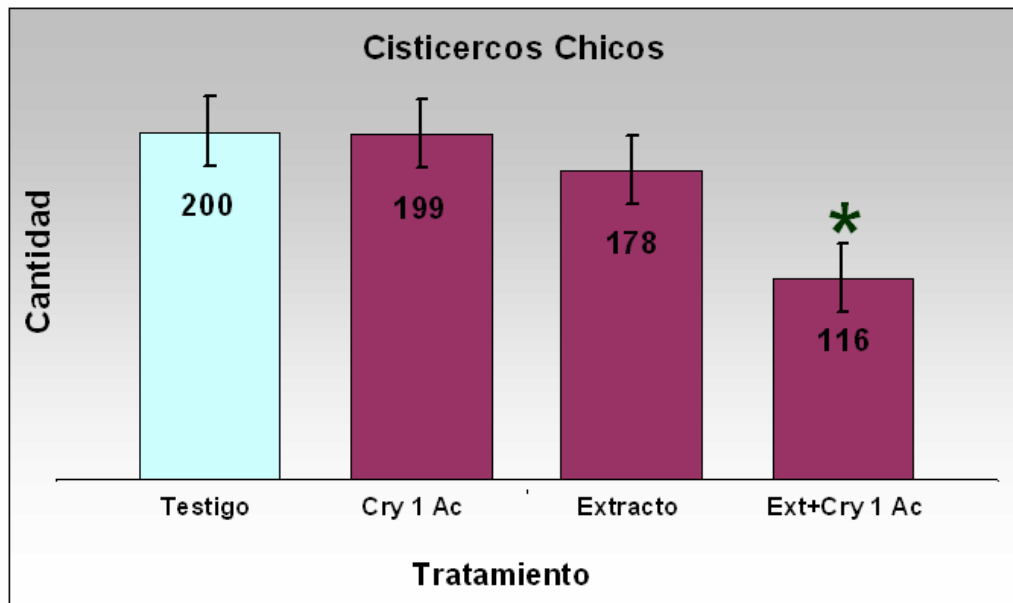




**Fig. 3.** Conteo de cisticercos medianos de los 3 tratamientos en comparación con el grupo testigo a los 35 días de infección. (\*) Se muestran las diferencias significativas respecto al grupo testigo.

#### 6.1.4 Conteo de cisticercos chicos por tratamiento

Para todos los tratamientos los cisticercos chicos (entre los 10 mm) fueron los más abundantes en donde el grupo Extracto + Cry1Ac fue el que menos cantidad tuvo (116) cisticercos, seguido del grupo extracto solo que obtuvo 178 cisticercos chicos finalmente el tratamiento con Cry1Ac no mostró protección ya que el promedio de 199 cisticercos fue siendo técnicamente igual al grupo testigo (200 cisticercos chicos).



**Fig. 4.** Conteo de cisticercos chicos los 3 tratamientos en comparación con el grupo testigo a los 35 días de infección. (\*) Se muestran las diferencias significativas respecto al grupo testigo.

## 6.2 Niveles de anticuerpos anti-cisticercos por medio de la técnica de ELISA en suero de ratón BALB/C

Se analizaron los niveles de anticuerpos anti-cisticercos en los grupos inmunizados a las 24 y 48 horas después de las primera, segunda y tercera inmunización, así como el día de la infección día 26 (7 días después de la tercera inmunización). Además se determinó el título en cada día post- infección hasta el día del sacrificio en los tres grupos de ratones inmunizados así como en el grupo de los ratones testigo. Se tomaron muestras de sangre a todos los grupos al 1, 2, 3, 4, 7, 9, 14, 21, 28 y 35 días después de la infección intraperitoneal con 14 cisticercos. Los anticuerpos analizados fueron IgG, IgM, IgG2a e IgG1, mediante la técnica de ELISA.

### 6.2.1 Niveles de anticuerpos IgG anti cisticercos en suero

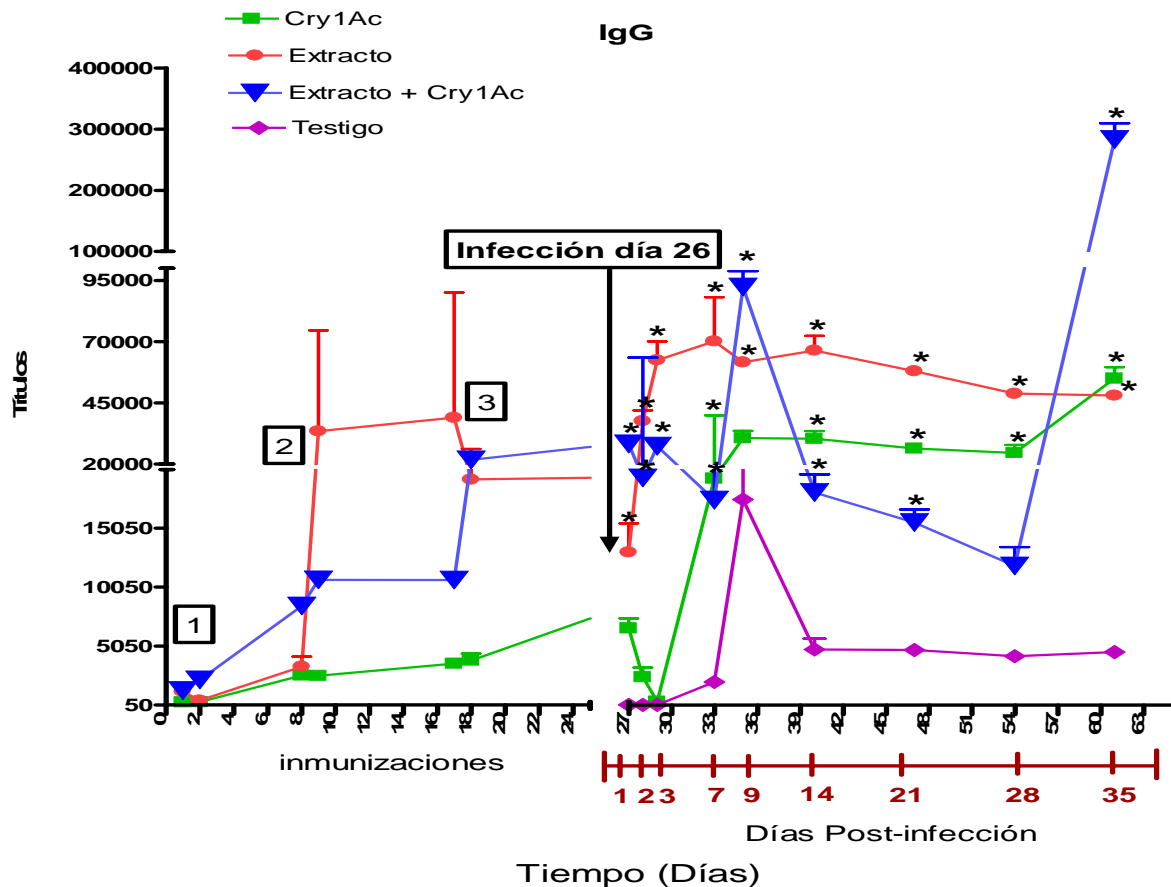
**a) Cry1Ac:** Como era de esperarse a las 24 horas y 48 después de la primera, segunda y tercera inmunización el grupo Cry1Ac no mostró incremento significativo en la respuesta de anticuerpos IgG anti-cisticercos. Sin embargo al primer día después de la infección se registró un incremento en el título de anticuerpos IgG a 5100, aunque después volvió a disminuir los siguientes 2 y 3 días post-infección. Mientras que a partir del día 7 día de infección se presentó un claro incremento en el título a casi 20 000, y los posteriores días post infección (9,14,21,28 y 35) el título se mantuvo constante alrededor de los 20000.

**b) Extracto:** Se encontró un claro incremento en el título a las 48 horas después de la segunda

inmunización de 30000 el cual se mantuvo casi constante a las 24 y 48 horas después de la tercera inmunización. Aunque al momento del reto con los cisticercos el título registrado disminuyó (cerca de los 15000), los siguientes días post infección se volvió a ver un incremento aún más marcado en el título hasta alcanzar los 70 000 y manteniéndose cerca de esta cifra los siguientes 14, 21, 28 y 35 días post infección.

**c) Extracto + Cry1Ac:** 24 y 48 horas después de la segunda inmunización se mostró un incremento en el título de 10000 el cual se mantuvo a las 24 horas de la tercera inmunización y a las 48 horas de la 3<sup>a</sup> inmunización se incrementó a 20000 el título. Al momento de la infección y durante los 7 primeros días de infección los niveles de anticuerpos IgG se mantuvieron casi constantes cerca de los 20 000, mientras que a los 9 días post-infección se incrementó el título hasta 95 000, posteriormente a los 14, 21 y 28 de infección estos niveles volvieron a bajar entre los 10 000 y 20 000 y finalmente a los 35 días de infección se obtuvo el título mas alto registrado en 300 000.

**d) Testigo:** Durante los primeros 7 días después del reto no hubo incremento significativo en el título, sin embargo a los 9 días post-infección surgió un título de casi 20000, pero durante los posteriores días (14, 21, 28 y 35) post infección el título bajó y se mantuvo constante en 5050



**Fig. 5** Respuesta de anticuerpos IgG anti-cisticercos de *Taenia crassiceps* en sueros de ratones a las 24 y 48 horas después de las 3 inmunizaciones y durante 35 días después del reto infeccioso. (\*) Se muestran las diferencias significativas respecto al grupo testigo. (A<sub>492</sub>)

### 6.2.2 Niveles de anticuerpos anti-cisticercos IgG1

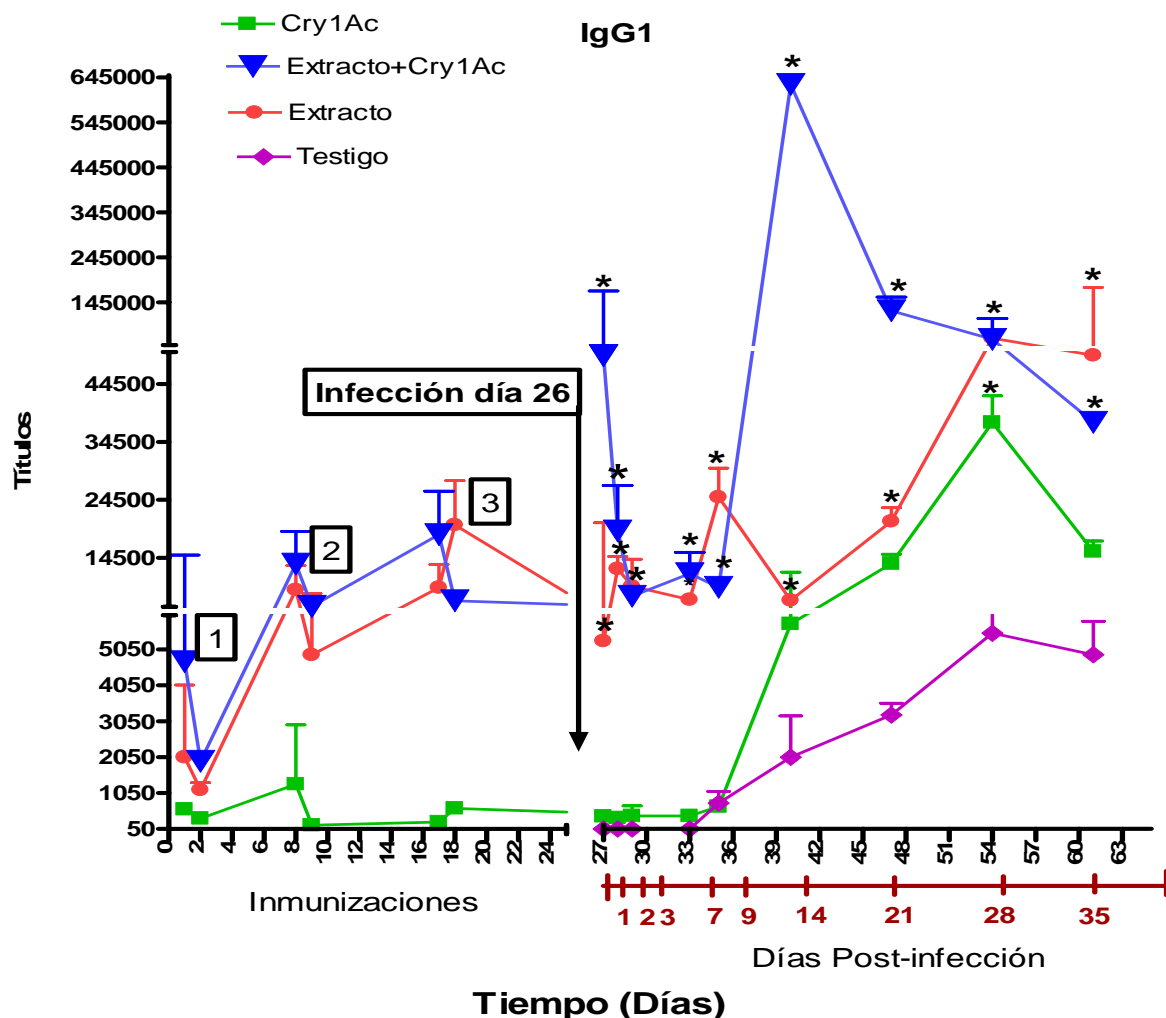
**a) Cry1Ac:** Este grupo se mantuvo sin anticuerpos anti-cisticercos como se esperaba a lo largo de las inmunizaciones. Durante los primeros 9 días de post-infección no se presentaron respuestas de anticuerpos significativas de esta subclase. A los 14 días de infección se detectó un título de 6000, a los 21 días el título se incrementó a 12000 y el máximo pico que se alcanzó fue a los 28 días de infección con un título de 40 000, finalmente a los 35 días de infección se registró un título de 12000. Los títulos de anticuerpos IgG1 a partir del día 14 post infección en este grupo fueron mayores a los registrados en el grupo testigo.

**b) Extracto:** El grupo extracto tuvo niveles muy similares a los encontrados en el grupo extracto + Cry1Ac durante las primeras 3 inmunizaciones, en donde a las 24 y 48 horas de la tercera inmunización se obtuvieron títulos alrededor de los 14500. A las 24 horas después del reto con cisticercos el título bajó a 5100, este valor se mantuvo casi constante alrededor de los

primeros 7 días de infección, más adelante a los 9 días de infección el título nuevamente subió a 24500. A las 14 días de infección el título nuevamente bajó a 6000, y a los 21 días el título volvió a subir a 24500 y a los 28 días de obtuvo el título más alto 130 000 y se mantuvo similar a los 35 días de infección. Los títulos de anticuerpos IgG1 en este grupo después de la infección fueron menores (días 1,14 y 21) o comparables a los registrados en el grupo Extracto+Cry1Ac.

**c) Extracto + Cry1Ac:** Este grupo presentó incrementos significativos en la respuesta de IgG1, a lo largo de las 3 inmunizaciones, sobre todo a las 24 y 48 horas de la segunda y tercera inmunización se presentaron títulos de alrededor de los 14500 similares a los presentados en el grupo inmunizado con extracto solo. A las 24 horas del reto con los cisticercos se obtuvo un aumento notable en el título de casi 50000, a diferencia de lo ocurrido en los ratones inmunizados con Cry1Ac sola o extracto solo, que presentaron una disminución en la respuesta de anticuerpos después del reto con cisticercos. Los subsecuentes días con la infección (2, 3, 4, 7 y 9 días) el título anticuerpos IgG1 disminuyó y se mantuvo casi constante alrededor de los 14000 a niveles comparables a los del grupo extracto. Sin embargo a las 14 días de infección se obtuvo el pico más alto al alcanzar los 645 000 en el título, los siguientes tiempos (21 y 28 días) de infección el título bajó (aunque continuó siendo elevado) y se mantuvo casi constante alrededor de los 145 000 y finalmente el día 35 el título nuevamente bajo a 34500. Este grupo registró títulos de anticuerpos IgG1 significativamente mayores a los registrados en el resto de los grupos los días 1, 14 y 21 post infección.

**d) Testigo:** Como se muestra en la gráfica en este grupo no hubo cambios IgG1 en los primeros 7 días, al noveno día de infección se obtuvo un título de 1000, el día catorce post-infección la respuesta aumento hasta un poco mas de 2050 a los 21 días de infección el titulo aumento a 3050 y a los 28 días se obtuvo un título de casi 6000 el cual bajo a 5000 a los 35 días de infección. Este grupo registró en general títulos de anticuerpos IgG1 más bajos que el resto de los grupos.



**Fig. 6** Respuesta de anticuerpos IgG1 anti-cisticercos de *Taenia crassiceps* en sueros de ratones a las 24 y 48 horas después de las 3 inmunizaciones y durante 35 días después del reto infeccioso.(\*). Se muestran las diferencias significativas respecto al grupo testigo. (A<sub>492</sub>).

### 6.2.3 Niveles de anticuerpos anti-cisticercos IgG2a

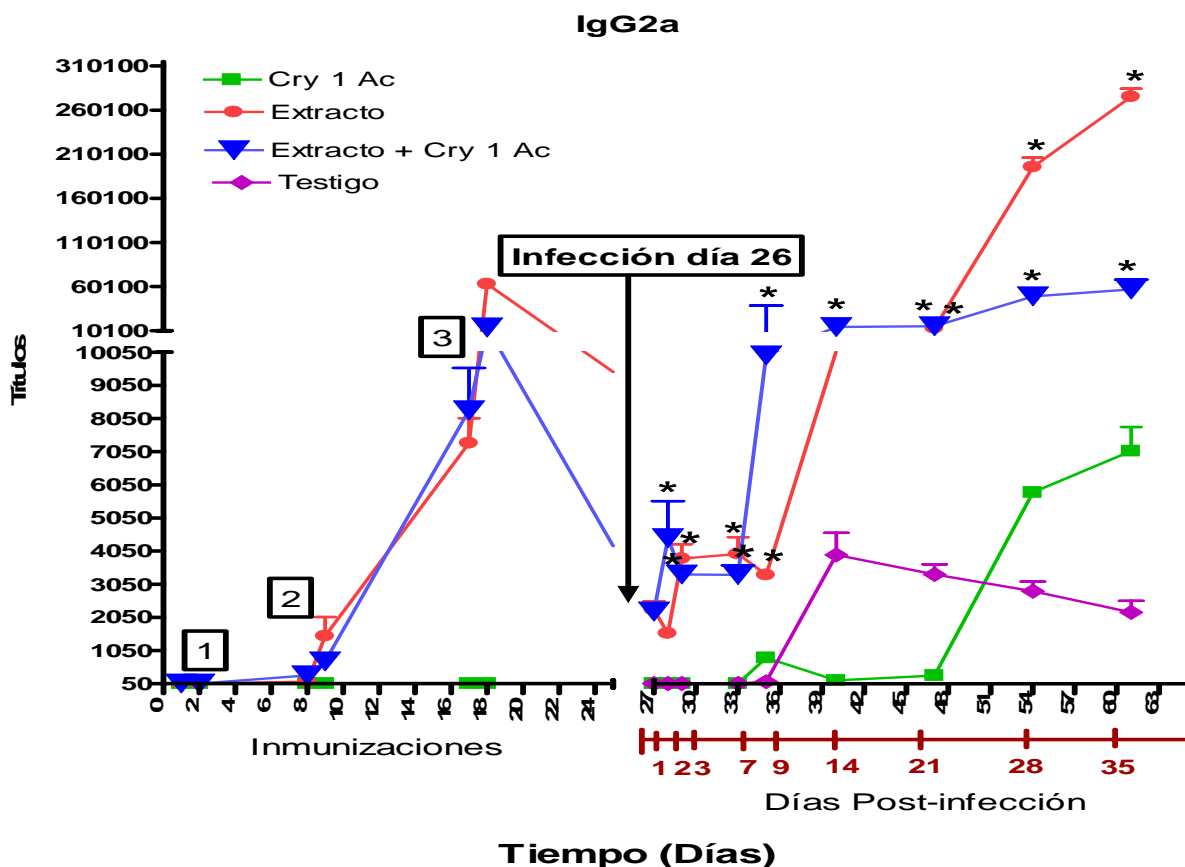
**a) Cry1Ac.** Este grupo no tuvo incremento de anticuerpos anti-cisticercos a lo largo de las 3 inmunizaciones y ni durante los primeros 7 días de infección con cisticercos, tan sólo a los 9 días se elevó mínimamente el nivel en 1050, y los siguientes días 14 y 21 el título nuevamente bajó. Posteriormente a los 28 días de infección se obtuvo un incremento de 6050 en el título y a los 35 días de infección se dio el registro más alto en 7100.

**b) Extracto:** Al igual que el grupo extracto + Cry1Ac, se presentó incremento en el título solo a las 24 y 48 horas de la tercera inmunización siendo de 7050 y 60100 respectivamente. A las 24 horas de la infección el título bajó hasta 2050, después durante los 3, 7 y 9 días post-

infección el título se incrementó un poco en 4050, posteriormente a los 14 y 21 días el nivel de anticuerpo IgG2a subió hasta 10100. A los 28 días volvió a subir hasta 210100 y finalmente el día 35 se obtuvo el registro más alto de 280100. Cabe mencionar que este grupo fue el que obtuvo los valores más alto (280100) de anticuerpos IgG2a anti-cisticercos (los días 28 y 35 post infección).

**c) Extracto + Cry1Ac:** Este grupo mostró incremento en el título a las 24 y 48 horas de la tercera inmunización siendo de 8050 y 10100 respectivamente. A las 24 horas de infectar con cisticercos el título bajó y se mantuvo casi constante en alrededor de los 4050 durante la primera semana de infección. Posteriormente a los 9 días de infección se incrementó el título hasta 10070 y se mantuvo niveles parecidos durante los 14 y 21 días post-infección. Finalmente a los 28 y 35 días de infección nuevamente el título subió hasta los 60100

**d) Testigo:** Durante los primeros 9 días de infección este grupo no mostró detección de IgG2a, a los 14 días de infección se observó un pequeño pico en el título de 4050, el cual fue descendiendo paulatinamente los siguientes días post-infección hasta descender el título en 2100 el día 35 de infección.



**Fig. 7** Respuesta de anticuerpos IgG2a anti-cisticercos de *Taenia crassiceps* en sueros de ratones a las 24 y 48 horas después de las 3 inmunizaciones y durante 35 días después del reto infeccioso.(\*) Se muestran las diferencias significativas respecto al grupo testigo. (A<sub>492</sub>)

#### 6.2.4 Niveles de anticuerpos anti-cisticercos IgM

**a) Cry1Ac:** Durante las primeras 24 y 48 horas de la 1 primera inmunización se obtuvo un título de 3050 y a las 24 y 48 horas de la segunda inmunización el título fue de 5000 siendo ambos valores similares en los 3 grupos experimentales, a las 24 horas de la tercera inmunización el valor del título fue de 9050 y a las 48 horas bajó a 5000. Posteriormente los siguientes 3 días después del reto infecciosos el título se mantuvo bajo y constante e 1550, tan sólo a los 7 días de infección se obtuvo el pico más alto en el título siendo este de 22500, para después a los 9 días de infección este bajó hasta los 1550. A los 14 días el título nuevamente subió hasta los 11000 y a los 21 y 28 días post infección el título bajó y se mantuvo entre los 9050. Finalmente a los 35 días se incrementó nuevamente a los 14000.

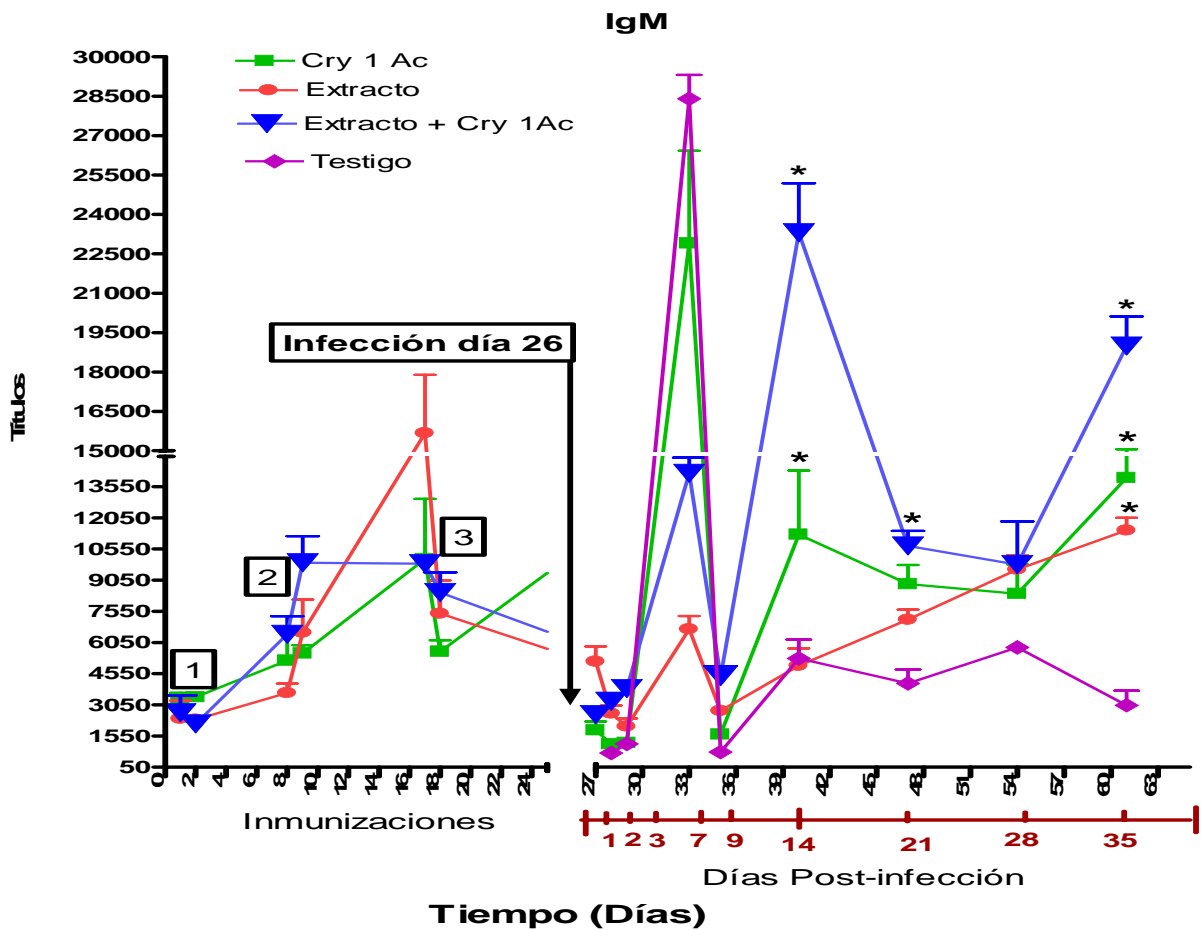
**b) Extracto:** A las 24 y 48 horas de la primera inmunización el título fue de 3050 y a las 48 horas de la segunda inmunización este título subió a 6050, posteriormente a las 24 horas de la



tercera inmunización se obtuvo un título alto de 16000. Después durante los 3 primeros días de infección el título bajó y se mantuvo entre los 2000 y 4000, tan sólo a los 7 días de infección el título volvió a subir a 7000. A partir de los 14 días post infección el título se elevó gradualmente hasta el día 35; a los 14 días el título fue de 4550, a los 21 días el título se incrementó a 7550, a los 28 días se obtuvo 10000 y finalmente a los 35 días de infección el título fue de 12000.

**c) Extracto + Cry1Ac:** A las 24 y 48 horas después de la primera inmunización el título subió a 3050, siendo similares a los títulos obtenidos en los tratamientos de Cry1Ac y extracto solo, a las 48 horas de la segunda inmunización y las 24 y 48 horas de la tercera inmunización se obtuvieron valores cerca de los 9050. Durante los primeros 3 días post-infección el título bajó y se mantuvo en alrededor de los 4000 y después a los 7 días de infección el título se incrementó hasta los 14000, y a los 14 días este título volvió a subir hasta el pico más alto obtenido por este grupo hasta los 24000, posteriormente a los 21 y 28 días post infección el título bajó a 11000 y finalmente a los 35 días el se incrementó nuevamente el título hasta 19500.

**d) Testigo:** Los primeros 3 días de infección no hubo cambios significativos en el título, sin embargo a este grupo mostró un pico muy alto a los 7 días de infección, más alto que cualquiera de los grupos experimentales, un título de 28500, Posiblemente en este grupo se registraron los niveles más altos de este anticuerpos IgM de respuesta primaria porque a diferencia de los grupos inmunizados con extracto, no habían estado previamente expuestos a los antígenos de los cisticercos. Posteriormente a los 9 días el título bajó nuevamente, los siguientes días de post-infección (14,21,28 y 35) el título nuevamente se incrementó ligeramente y se mantuvo casi constante en 5000.



**Fig. 8** Respuesta de anticuerpos IgM anti-cisticercos de *Taenia crassiceps* en sueros de ratones a las 24 y 48 horas después de las 3 inmunizaciones y durante 35 días después del reto infeccioso. (\*) Se muestran las diferencias significativas respecto al grupo testigo. (A<sub>492</sub>)

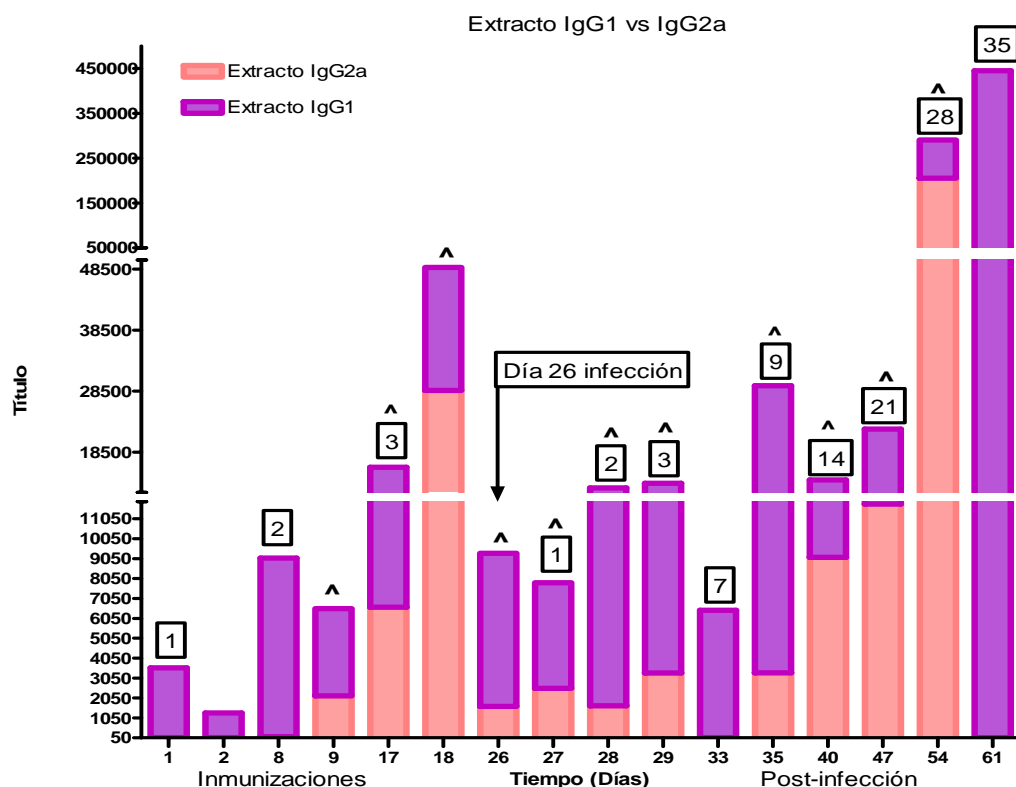
### 6.3 Comparación de respuesta de tipo Th1 y Th2

Como una medida indirecta de analizar el tipo de respuesta Th1 o Th2, inducida por la inmunización y durante la infección, se analizaron las subclases de anticuerpos IgG2a e IgG1 respectivamente.

#### 6.3.1 Comparación de respuestas de tipo Th1 y Th2 en el grupo extracto

Cabe mencionar que aunque durante todo el proceso pre y post infeccioso la IgG1 (Th2) fue

siempre mayor que la IgG2a (Th1), el perfil registrado no se polarizó marcadamente hacia Th2 en todos los tiempos, ya que fue mezclado después de la tercera inmunización así como los días 14, 21 y 28 post infección. A las 24 y 48 horas de la primera inmunización solo hubo poco incremento de IgG1, al igual que a las 24 horas de la segunda inmunización, mientras que a las 48 horas de la segunda inmunización se mostró un poco de incremento de IgG2a. A las 24 horas de la tercera inmunización se mostró un gran incremento de IgG1 (48500), así como un incremento considerable en la IgG2a (28500). Al momento del reto infeccioso ambas subclases de anticuerpos anti-cisticercos bajaron considerablemente, teniendo una constancia relativa durante los primeros 7 días entre los 10000 y 12000 en el caso de la IgG1 y de 2000 en el caso de la IgG2a durante los primeros 9 días de infección. Los posteriores días de infección (14, 21, 28) se presentó un perfil Th1/Th2 mezclado ya que la IgG2a y la IgG1 se incrementaron paulatinamente, hasta que el día 28 obtuvo su máximo pico en 250000 en el caso de la IgG2a y de 300000 en el caso de la IgG1. Finalmente en el día 35 de infección la respuesta se polarizó al tipo Th2, ya que no hubo IgG2a y hubo un gran incremento de IgG1 de 450000 siendo este su máximo nivel alcanzado durante el proceso infeccioso.

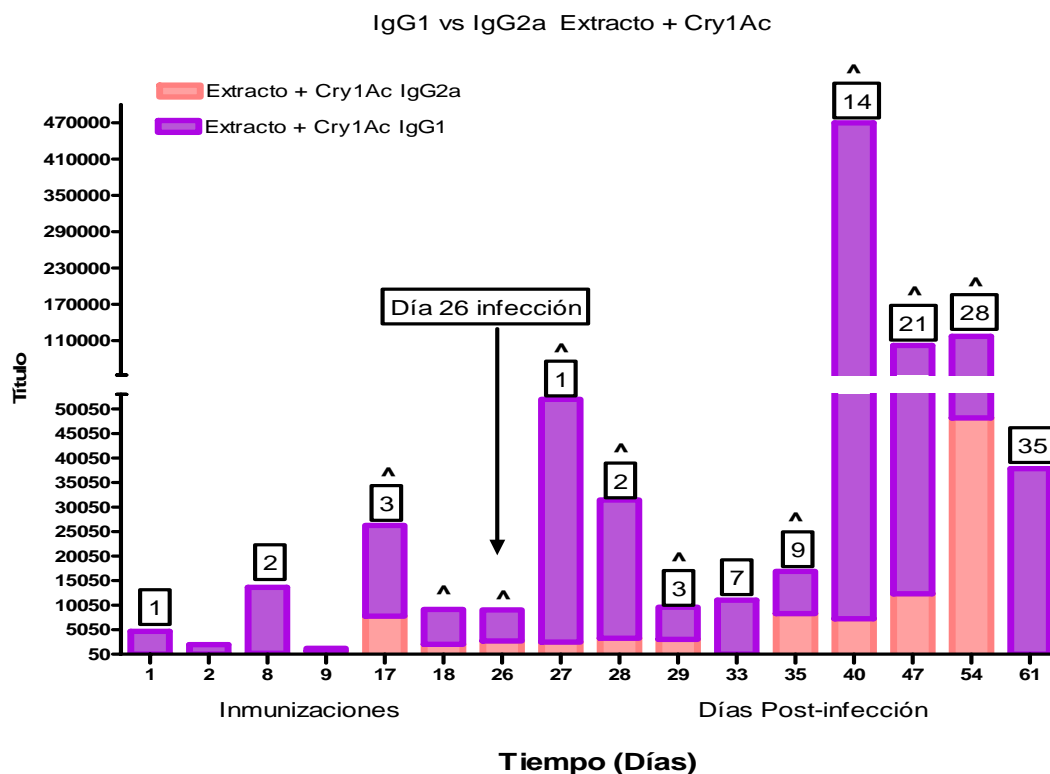


**Fig. 9** Respuesta de los anticuerpos de las subclases IgG1 e IgG2a anti- cisticercos de *Taenia crassiceps* en suero

de ratones inmunizados con extracto de cisticercos, a las 24 y 48 horas después de la 3 inmunizaciones y durante los 35 días de infección (^) se muestra cuando la respuesta entre IgG1 e IgG2a fue mezclada (absorbancia de 492 nm).

### 6.3.2 Comparación de respuesta de tipo Th1 y Th2 en el grupo Extracto + Cry1Ac

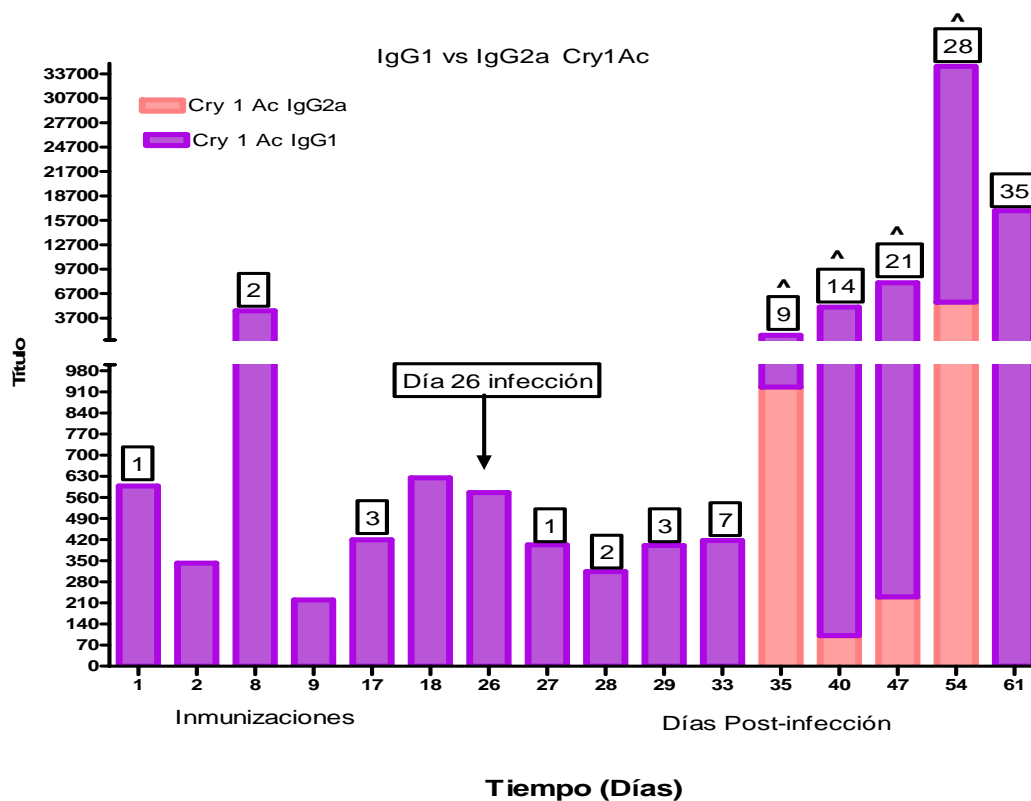
Al igual que en el grupo extracto los niveles de IgG1 (Th2), siempre fueron superiores que en IgG2a (Th1), pero en este grupo la respuesta registrada fue mayor y estuvo todo el tiempo marcadamente polarizada al tipo Th2, únicamente se presentó un patrón mezclado Th1/Th2 al día 28 post infección. A las 24 y 48 horas después de la primera inmunización y segunda inmunización solo se detectaron niveles de IgG1. A las 24 horas de la tercera inmunización se detectó un incremento notable en la IgG1 de 25050 la cual decreció hasta a las 48 horas y al momento del reto infeccioso. Mientras que la IgG2a fue apenas detectable a través de las 24 y 48 horas de la tercera inmunización y a través de los primeros 7 días de infección. Mientras que la IgG1 al primer día después de la infección aumento hasta 50050 y los siguientes días fue decreciendo hasta los 15050 el noveno día después de la infección. Al día 14 nuevamente se elevaron los valores de IgG1 hasta 470000, posteriormente los días 21 y 28 se alcanzaron valores de 110000 y finalmente el día 35 se obtuvo un valor de 40050. La IgG2a solo obtuvo a los 28 días de infección un valor significativo de 50050.



**Fig. 10** Respuesta de la subclase IgG1 e IgG2a anti- cisticercos de *Taenia crassiceps* en suero de ratón inmunizado con extracto de cisticercos + Cry 1 Ac a las 24 y 48 horas después de la 3 inmunizaciones y durante los 35 días de infección (^) se muestra cuando la respuesta entre IgG1 e IgG2a fue mezclada (absorbancia de 492 nm).

### 6.3.3 Comparación de respuesta de tipo Th1 y Th2 en el grupo Cry1Ac.

Como en los demás grupos experimentales la respuesta IgG1 (Th2) fue mayor y más constante que la IgG2a (Th1), aunque los días 9 y 28 post infección el patrón de respuesta fue mezclado (Th1/Th2). Sin embargo, comparados con los títulos obtenidos en los grupos inmunizados con extractos, en este grupo fueron mínimos los valores en el título de IgG1 alrededor de las 3 inmunizaciones y los primeros 7 días de infección apenas se obtuvieron valores por debajo de los 1000. A los nueve días de infección el valor de IgG1 fue de 2000 y a las 14 días fue de 3700, a los 21 de 67000, posteriormente a los 28 días se obtuvo el máximo pico de 33700 y viceversa el valor máximo de IgG2a de 4000, finalmente a los 35 días bajaron los niveles del título para ambos anticuerpos anti-cisticercos a 18700 para IgG1 e imperceptible la detección para IgG2a.

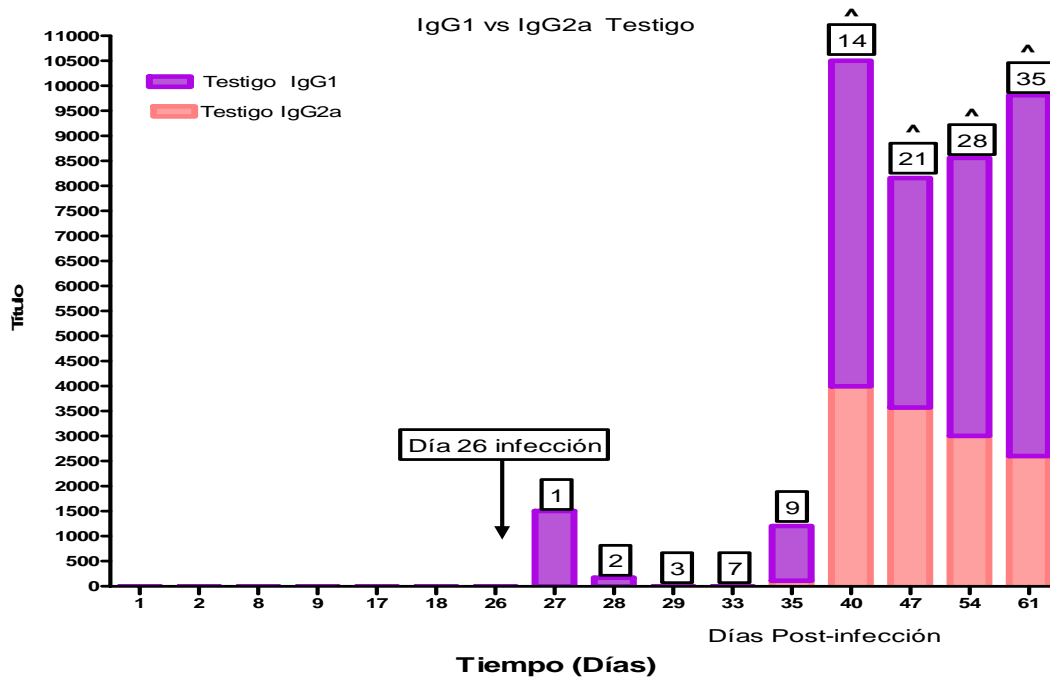


**Fig. 11** Respuesta de la subclase IgG1 e IgG2a anti- cisticercos de *Taenia crassiceps* en suero de ratón inmunizado

con Cry1Ac a las 24 y 48 horas después de las 3 inmunizaciones y durante los 35 días de infección (^) se muestra cuando la respuesta entre IgG1 e IgG2a fue mezclada (absorbancia de 492 nm).

### 6.3.4 Comparación de respuesta de tipo Th1 y Th2 en el grupo Testigo.

Durante los primeros nueve días de la infección los valores para IgG1 fueron apenas perceptibles y no se detectó IgG2a. Después a los 14 días hubo un incremento en la IgG1 de 11000 siendo este el pico más alto, posteriormente los siguientes 21, 28 y 35 días el título nuevamente bajo y se mantuvo casi constante entre los 8000 y 9000. Mientras que para IgG2a solo se mostró título hasta los 14 días de infección y siguió siendo casi el mismo valor durante los siguientes días de infección 21, 28, 35 cuyo valores fueron entre los 2000 y 35000.



**Fig. 12** Respuesta de la subclase IgG1 e IgG2a anti- cisticercos de *Taenia crassiceps* en suero de ratón Testigo durante los 35 días de infección (^) se muestra cuando la respuesta entre IgG1 e IgG2a fue mezclada (absorbancia de 492 nm)

#### **6.4 Niveles de citocinas en suero de ratón BALB/C por medio de citometría en flujo con el kit de citocinas Th1/Th2 (BD cytometric bead array)**

Se analizaron los niveles de citocinas en los grupos inmunizados a las 24 y 48 horas después de la primera, segunda y tercera inmunización, así como el día de la infección día 26 (7 días después de la tercera inmunización). Además se determinaron los niveles de citocinas a diferentes tiempos después de la infección en los tres grupos de ratones inmunizados así como en el grupo de los ratones testigo. Se tomaron muestras de sangre a todos los grupos al 1, 2, 3, 4, 7, 9, 14, 21, 28 y 35 días después de la infección intraperitoneal con 14 cisticercos. Las citocinas analizadas fueron TNF-alfa, INF-gamma, IL-2, IL-4 e IL-5.

##### **6.4.1 Niveles de TNF-alfa**

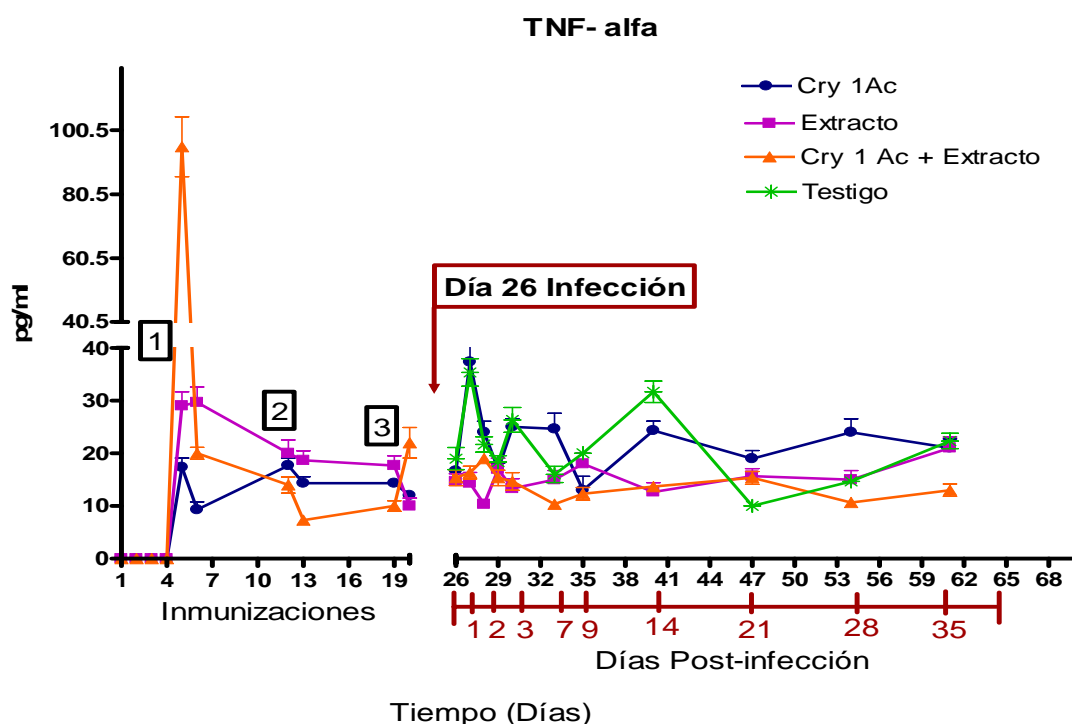
**a) Cry1Ac:** Tanto a las 24 como a las 48 horas después de la primera inmunización no hubo cambios notorios en la citocina, manteniéndose casi los mismos parámetros en las 24 y 48 horas de la segunda y tercera inmunización (alrededor de 18 pg/ml). A los 7 días de la tercera inmunización no hubo cambio notorio pero al primer día post-infección hubo un incremento moderado en la citocina (cerca de 40 pg/ml), el cual bajó nuevamente a los dos y tres días post-infección, incrementándose nuevamente a los 7 días y manteniéndose casi sin cambios (en niveles ligeramente mayores a los 20 pg/ml) hasta los 35 días post-infección. El nivel de TNF-alfa del grupo Cry1Ac se mantuvo unos valores un poco arriba en comparación con los grupos Extracto solo y Extracto + Cry1Ac; presentando valores casi idénticos en comparación con el grupo testigo.

**b) Extracto:** Este grupo mostró un incremento en el TNF-alfa a las 24 y 48 horas después de la primera inmunización (alrededor de 30 pg/ml) siendo un poco más alta que el nivel del grupo Cry1Ac, mientras que a las 24 y 48 horas después de la segunda y tercera inmunización bajaron nuevamente los niveles de la citocina (alrededor de 20 pg/ml). Estos valores de mantuvieron sin cambios notorios durante todo el tiempo de la infección, siendo incluso por debajo de los valores mostrados por el grupo testigo y por el grupo Cry1Ac.

**c) Extracto + Cry1Ac:** A las 24 horas de la primera inmunización el grupo extracto + Cry1Ac mostró un incremento significativo en los niveles de TNF-alfa (cercano a 100 pg/ml) mayor

que el presentado por los otros dos grupos experimentales, sin embargo a las 48 horas los niveles de esta citocina fueron comparables a los presentados por los otros grupos. A las 24 y 48 horas después de la segunda inmunización esta citocina se mantuvo a niveles bajos y a las 24 horas después de la tercera inmunización siguieron siendo bajos los valores (menores a 15 pg/ml) y las 48 horas tuvo un pequeño incremento en la citocina (mayor a 20 pg/ml). Al momento de la infección así como a los diferentes tiempos post-infección los niveles de TNF-alfa en el grupo extracto + Cry1Ac los niveles de citocina se mantuvieron bajos y con muy poca variación (menores a 20 pg/ml).

**d) Testigo:** Este grupo presentó un incremento a las 24 horas después de la infección con cisticercos idéntico al presentado en el grupo Cry1Ac (nivel cercano a 40 pg/ml) para luego bajar durante los siguientes nueve días (alrededor de 20pg/ml), y mostrándose otro incremento a los 14 días post-infección (alrededor de 30 pg/ml), para luego bajar nuevamente los niveles de TNF-alfa durante los posteriores días de la infección.



**Fig. 13.** Respuesta de los niveles de citocina TNF- alfa en suero. Se muestra el grupo testigo y los 3 tratamientos durante las 3 inmunizaciones y durante los 35 días de infección. Las muestras fueron analizadas por duplicado por el citometría de flujo con el kit (BD cytometric bead array).



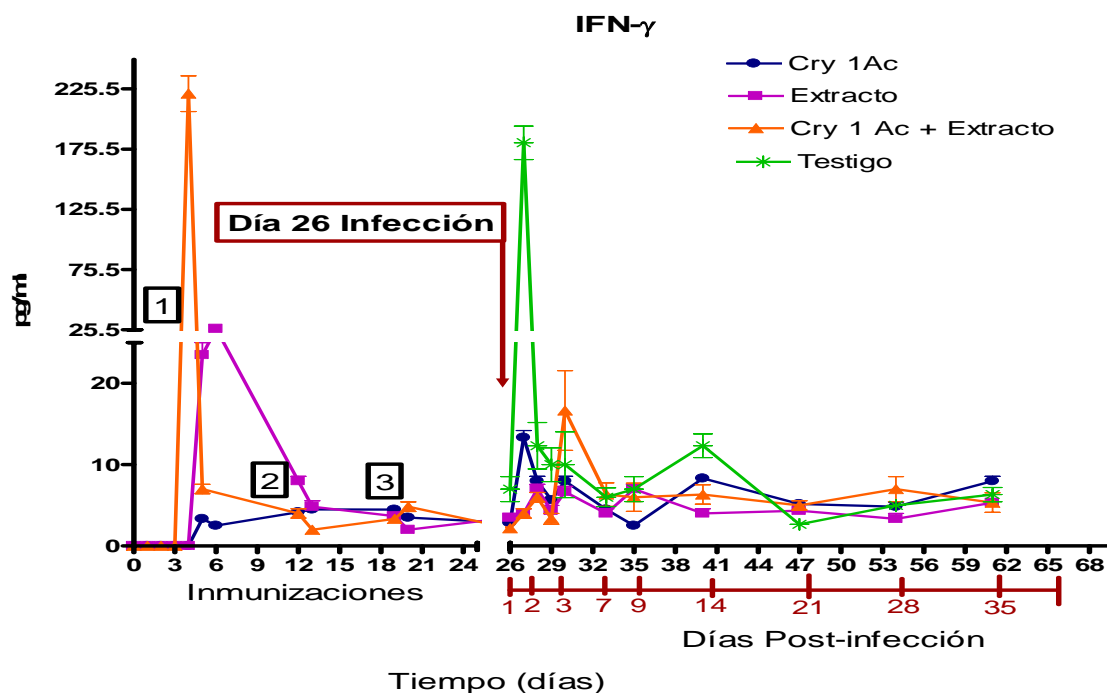
#### 6.4.2 Niveles de IFN-gamma

**a) Cry1Ac:** A diferencia de los grupos extracto y extracto + Cry1Ac, el grupo Cry1Ac no presentó incrementos en los niveles de IFN gamma por efecto de la inmunización. A las 24 horas y 48 horas de la primera inmunización el grupo Cry1Ac presentó niveles bajos de IFN-gamma (menores a 5 pg/ml) y no mostró variación en los niveles, tampoco a las 24 y 48 horas de la segunda y tercera inmunización hubo cambios en la citocina. Al momento de la infección los niveles siguieron bajos, pero a las 24 horas post-infección hubo un pequeño incremento (alrededor de 13 pg/ml), sin embargo volvieron a bajar dichos niveles de IFN-gamma manteniéndose casi sin variación los siguientes días post-infección.

**b) Extracto:** A las 24 y 48 horas después de la primera inmunización este grupo presentó un claro incremento en el IFN-gamma (alrededor de 25 pg/ml), pero bajaron los niveles de esta citocina las siguientes 24 y 48 horas después de la segunda y tercera inmunización. Después del reto infeccioso con cisticercos los niveles de IFN-gamma de este grupo se mantuvieron bajos y constantes los subsecuentes días post-infección (niveles menores a 10 pg/ml).

**c) Extracto + Cry1Ac:** A las 24 horas después de la primera inmunización este grupo presentó un incremento notable en la citocina IFN-gamma (aproximadamente 225 pg/ml), mientras que a las 48 horas después de la primera inmunización estos valores bajaron y se mantuvieron constantes a las 24 y 48 horas después de la segunda y tercera inmunización. Después de la infección los primeros 3 días se mantuvieron estos valores bajaron, pero el 4 cuarto día de infección hubo un pequeño incremento en la citocina (alrededor de 15 pg/ml). Los siguientes días post-infección los valores volvieron a bajar (niveles menores a 10 pg/ml) y se mantuvieron sin cambio alrededor de todo el proceso infeccioso.

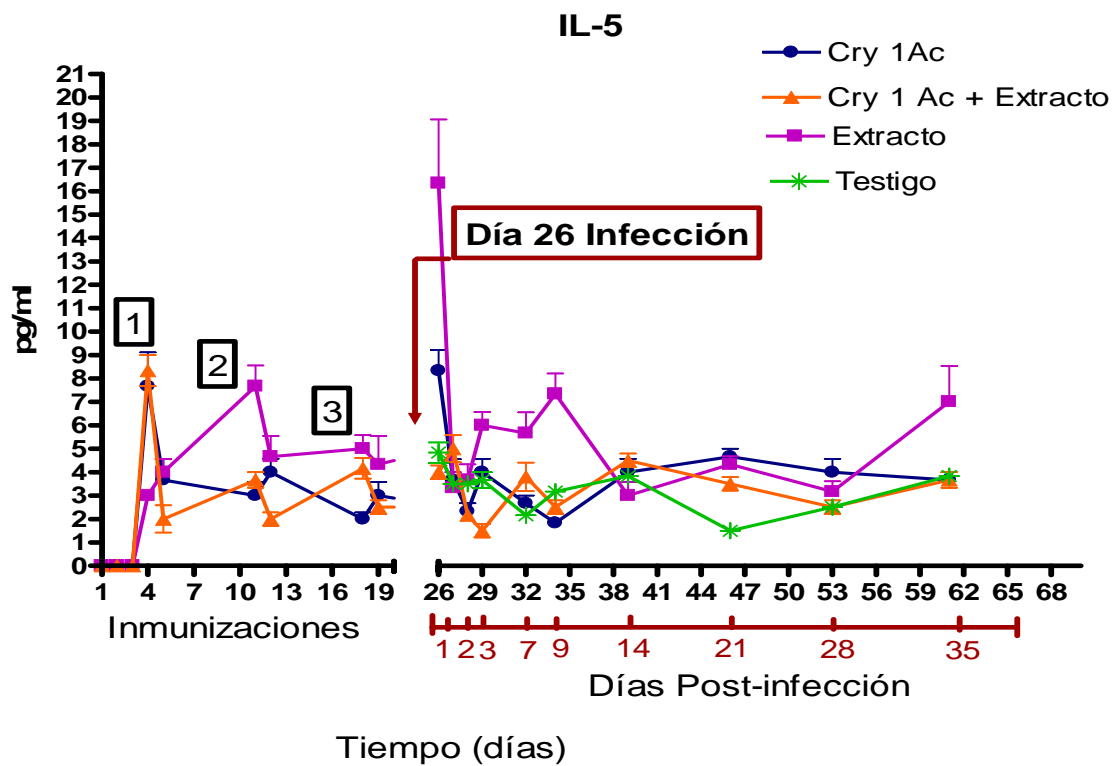
**d) Testigo:** A las 24 horas después de la infección este grupo tuvo un pico notable en la citocina IFN-gamma (aproximadamente 175 pg/ml), el cual bajó los posteriores días y se mantuvieron constantes los niveles bajos los posteriores días de infección, tan sólo registrándose un pequeño pico el día 14 (alrededor de 13 pg/ml).



**Fig. 14.** Respuesta de los niveles de citocina IFN-  $\gamma$  en suero. Se muestra el grupo testigo y los 3 tratamientos durante las 3 inmunizaciones y durante los 35 días de infección. Las muestras fueron analizadas por duplicado por el citometría de flujo con el kit (BD cytometric bead array).

### 6.4.3 Niveles de IL-5

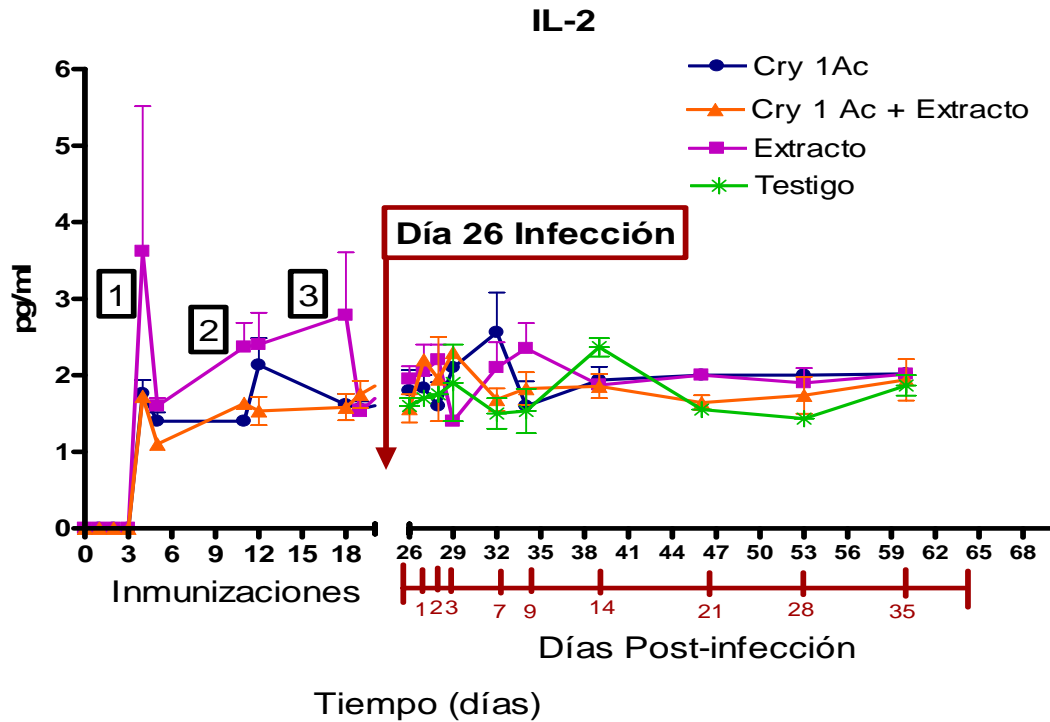
En general los niveles de esta citocina fueron bajos (menores a 10 pg/ml) para los 4 grupos, tan solo al graficar se detectaron pequeños cambios en los niveles de IL-5 en el grupo extracto al primer día después del reto con los 16 cisticercos presentando niveles de 16 pg/ml). Sin embargo los demás días pre y post-infección los valores se mantuvieron bajos y constantes para todos los grupos. El grupo inmunizado con extracto presentó niveles bajos, pero mayores que el resto de los grupos, en esta citocina, después de la 2ª inmunización y durante la infección los días 1, 3, 7, 9 y 35. Mientras que el Grupo inmunizado con Cry1Ac sola presentó niveles menores de esta citocina todos los días excepto después de la primera inmunización y al momento de la infección presentó un ligero incremento (alrededor de 8 pg/ml). De forma similar el grupo Extracto + Cry1Ac también presentó niveles menores a 5 pg/ml todos los días excepto después de la primera inmunización. Finalmente en los animales no inmunizados los niveles de esta citocina durante la infección fueron menores a 5 pg/ml .



**Fig. 15.** Respuesta de los niveles de citocina IL-5 en suero. Se muestra el grupo testigo y los 3 tratamientos durante las 3 inmunizaciones y durante los 35 días de infección. Las muestras fueron analizadas por duplicado por el citometría de flujo con el kit (BD cytometric bead array).

#### 6.4.4 Niveles de IL-2

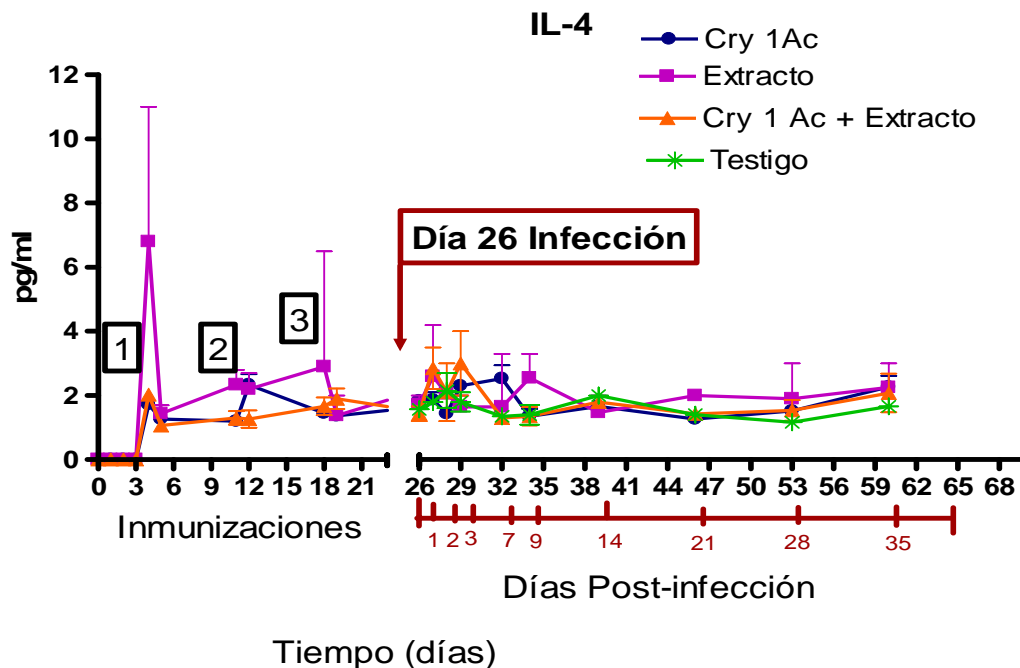
Los niveles de esta citocina fueron todos extremadamente bajos para todos los grupos (menores a 5 pg/ml). No hubo cambios notables a las 24 y 48 horas después de la primera, segunda y tercera inmunización. Así mismo durante el proceso infeccioso los valores en los niveles de IL-2 se mantuvieron constantemente bajos en todos los grupos.



**Fig. 16.** Respuesta de los niveles de citocina IL-2 en suero. Se muestra el grupo testigo y los 3 tratamientos durante las 3 inmunizaciones y durante los 35 días de infección. Las muestras fueron analizadas por duplicado por el citometría de flujo con el kit (BD cytometric bead array).

#### 6.4.5 Niveles de IL-4

Al igual que ocurrió con la detección de la IL-2 e IL-5, la IL-4 se mostró con parámetros bajos para los 4 grupos experimentales durante las 24 y 48 horas después de las 3 inmunizaciones. Así mismo después del reto infeccioso la IL-4 se mantuvo con valores bajos y constantes alrededor de todos los días post- infección (niveles menores a 4 pg/ml) en todos los grupos.



**Fig. 17.** Respuesta de los niveles de citocina IL-4 en suero. Se muestra el grupo testigo y los 3 tratamientos durante las 3 inmunizaciones y durante los 35 días de infección. Las muestras fueron analizadas por duplicado por el citometría de flujo con el kit (BD cytometric bead array).

## 7. DISCUSIÓN

Los helmintos son un extenso grupo de parásitos de organismos multicelulares, estos generan patologías al hombre y a los animales domésticos por ende se han presentado importantes modelos experimentales en ratón para representar el espectro de enfermedades humanas siendo de suma utilidad para analizar y caracterizar la respuesta inmune del huésped causadas por helmintos, gracias a ello se ha descubierto que las infecciones por helmintos se caracterizan por su habilidad de inducir una respuesta tipo Th2, con anterioridad se identificó que las células T y otras células efectoras pueden mediar las inmunopatologías y la protección en contra de importantes agentes patógenos. Sin embargo a pesar de estas tendencias generales, está cada vez más claro que la respuesta inmune varía considerablemente ante desafíos de diferentes grupos de parásitos (Gause y Col., 2003).

En este trabajo se determinó la protección conferida ante la infección parasitaria causada por el céstodo *Taenia crassiceps* por a través de la inmunización con tres distintos tratamiento (Cry1Ac, extracto y extracto + Cry1Ac) en contra de la infección de cisticercos de *Taenia crassiceps* en ratones BALB/C. Al realizar el conteo total de cisticercos encontrados en la cavidad peritoneal a los 35 días post- infección se encontró que la coadministración de Cry1Ac más extracto del parásito fue el tratamiento que confirió mayor grado de protección ya que redujo casi a la mitad (46%) la

cantidad de cisticercos encontrados (170) a diferencia del grupo testigo (312), mientras que la inmunización con Cry1Ac no confirió protección alguna (313) y la inmunización con extracto mostró tan sólo una pequeña protección durante la infección (275).

Estos resultados indican que en este modelo de infección con *Taenia crassiceps* Cry1Ac solo confiere protección cuando es utilizada como adyuvante al coadministrarla con extractos totales del parásito pero no brinda protección al administrarse sola. Estos resultados son opuestos a los reportados en el modelo de infección por *Naegleria fowleri* ya que tanto la administración de Cry1Ac, Extracto amibiano o la coadministración de Cry1Ac + extracto amibiano confirieron protección significativa (del 100 con Cry1Ac + Extracto y del 60% con solo extracto) a comparación con el grupo testigo (Rojas,2004).

Durante más de 20 años diferentes equipos de trabajo han tratado de conseguir una vacuna eficaz contra la cisticercosis causada por *Taenia solium*, ya que es un parásito cosmopolita que ataca al hombre en forma de neurocisticercosis, poniendo en riesgo a su salud y la de los animales de ganadería (Flisser y Col.,1997) por ello se han tratado de diseñar diferentes vacunas utilizando extracto crudo de DNA, purificando sus proteínas o realizando síntesis de péptidos (Sciutto y Col.,2006).

Así mismo se ha comprobado que las reacciones conferidas por los diferentes antígenos muestran un alto grado de similitud entre ambos parásitos (*Taenia solium* y *Taenia crassiceps*) (Rivas y Col.,1999) en donde generalmente para realización de vacunas se escogen antígenos que induzcan respuesta tipo Th1 ya que se demostró que las inmunizaciones que inducen este tipo de respuesta son las que mostraron mayor efectividad contra dicha infección parasitaria (Toledo y Col.,1998).

Con anterioridad se probó que la inmunización con extracto puro de DNA confiere protección y activación de la respuesta inmune contra la cisticercosis por *Taenia crassiceps*, para la realización de esta vacuna se utilizó la secuencia de nucleótidos de un antígeno recombinante de cisticercos de *Taenia crassiceps* que fueron clonados en el plásmido pcDNA3 en la señal péptido del beta-glicano (receptor pTc-sp7), demostrando esta vacuna protección en ratones infectados con *Taenia crassiceps*, al inmunizarse intramuscular e intradermalmente con tres dosis del pTc-sp7, activando la proliferación de células CD8 y CD4 en linfocitos T así como un claro incremento de CD3 produciendo  $\gamma$ -interferón e IL-2, siendo ello un indicador de que pTc-sp7 tiene una efectiva capacidad en la respuesta celular contra dicha infección parasitaria (Cruz-Revilla y Rosas, 2000).

Por otra parte, se comprobó que el óxido nítrico contribuye en la resistencia del hospedero en la

cisticercosis experimental con *Taenia crassiceps*, ratones BALB/C y ratones STAT 6, en donde se ha comprobado que en ratones BALB/C después del reto con *Taenia crassiceps* conlleva a una fuerte respuesta tipo Th2 produciendo altos niveles de IgG1, IgE, IL-5 e IL-4 y niveles discretos de NO, pero en ratones tratados con N-nitro-L-arginina metil ester (L-NAME, e inhibidor para la síntesis de NO) mostraron respuesta inmune similar pero con niveles insignificantes de NO provocando un 100% más de parásitos a diferencia del otro grupo de ratones, este procedimiento también se aplicó a ratones STAT6 obteniendo resultados similares, por lo que se sugirió que la activación de macrófagos y la producción de NO son posibles mecanismos efectores que contribuyen a la resistencia del hospedero ante la infección con *Taenia crassiceps* (Alonso-Trujillo y Col., 2007).

Otro grupo de investigadores aislaron una cisteína proteasa de *Taenia crassiceps* y *Taenia solium*, inmunizando ratones BALB/C con la cisteína proteasa, primero de *Taenia solium* y después de *Taenia crassiceps*, observaron una reducción significativa del parásito hasta de un 72% en comparación con los ratones testigo (no inmunizados), concluyendo que los ratones inmunizados con esta cisteína proteasa desarrollan antígenos específicos en la proliferación de linfocitos confiriendo protección ante un posible reto infeccioso (Baig y Col., 2006).

Aunque existan todos estos hallazgos la única vacuna porcina utilizable en estos días es la vacuna S3PVAC (GK1, KETc1 y Ketc12,18,8 aas respectivamente), esta vacuna ha sido probada tanto en cerdos como en ratones induciendo un incremento significativo de IL-2 e IFN-g (Th1), pero no de IL-4 e IL-10 (Th2), ella también induce una discreta respuesta inmune humoral con producción de anticuerpos específicos, pudiéndose esta vacuna administrarse de forma oral o sistémica, pero aún existen varias dudas en el mecanismo inmunológico que participan en la inducción de la protección misma (Sciutto y Col., 1990).

Con base a estos estudios enfocados hacia la protección contra la infección por *Taenia crassiceps* y utilizando diferentes protocolos de inmunización, nuestros resultados confirman reportes previos en donde se indicaba que la administración de extractos totales solos no inducen una protección significativa, Molinari en 1983 hizo la primera vacuna con protección significativa en México utilizando extracto total de cisticercos de *Taenia solium* extraídos de cerdos infectados. Sciutto en 1995 por su parte mezcló los antígenos de varias especies de tenia (*Taenia crassiceps*, *Taenia ovis*, *Taenia saginata* y *Taenia solium*). Harrison en 2005 mezcló varios tipos de céstodos, tanto Plancarte en 1999, Manoutcharian en 1996 hicieron pruebas de protección con inmunizaciones con oncósferas de antígenos purificados de cisticercos y por su parte Sciutto en 1995, Flisser en 2004, Toledo en

1999, Huerta en el 2001 probaron las vacunas con antígenos recombinantes y sintéticos, obteniendo los mejores resultados de protección contra dicha infección parasitaria (Sciutto y Col., 2000).

Con anterioridad se habían caracterizado las citocinas en sueros de ratones infectados con *Taenia crassiceps*, midiendo los niveles por ELISA. En donde Terrazas y Col. encontraron que en la cisticercosis experimental con ratones testigos se manifiesta primeramente una respuesta inicial de tipo Th1 (IFN-gamma y TNF-alfa) que después es suprimida por una fuerte respuesta tipo Th2 (IgG1, IgE, IL.5, IL-4) y a partir de la cuarta semana de infección, sin embargo se han reportado muy pocos estudios de análisis de cinética de citocinas en suero de ratón durante la infección y nunca se habían caracterizado la cinética de citocinas por las distintas inmunizaciones. Tan solo se había reportado que después de los 40 días de infección existe un incremento significativo en la IL-4, mientras que a partir de los 36 días de infección existe incremento en la IL-10 e IFN- $\gamma$ , siendo estos valores determinados por ELISAS (Toenjes y Col, 1999). Finalmente se concluyó en este ensayo que la respuesta durante la infección larval de *Taenia crassiceps* es mezclada entre tipo Th1 y Th2.

A su vez otro grupo de trabajo monitorearon a los ratones STAT4 dependientes de la respuestas Th1 en la regulación contra la infección de *Taenia crassiceps*, estudiando las infecciones en los ratones que carecían el gen STAT4 encontrándose que los ratones STAT4 +/+ combatían rápidamente la infección mientras que los ratones STAT4 -/- fueron altamente susceptibles a la infección mostrando una gran cantidad de parásitos, por otra parte la incapacidad de los STAT4 -/- para controlar los parásitos fue asociada con la inducción de una respuesta antígeno específico tipo Th2 asociada a la IgG1 y el IgE total, así como la IL-4, IL-10 e IL-13, además de producir niveles bajos de IL-12 después de la infección, mientras que en los ratones STAT4 +/+ se produjo IFN- $\gamma$ , factor de necrosis tumoral, IL-1 $\beta$ , y (NO) en niveles considerables, sugiriéndose que los macrófagos juegan un papel fundamental en la mediación de la protección contra la cisticercosis. Finalmente encontraron que el desarrollo de una respuesta de tipo Th1 es esencial para la protección contra la fase larvaria de *Taenia crassiceps*. (Rodriguez-Sosa y Col., 2004). Mientras que Toenjes encontró que la respuesta inicial durante los primeros 7 días de infección con cisticercos es mezclada en Th1/Th2 y que durante las primeras 24 horas post-infección se inicio un incremento de IL-4, después se incremento la IL-10 y el IFN-gamma, cabe mencionar que este análisis se realizó en células de bazo y en PECs. (Toenjes y Col., 2003). Con anterioridad Rodriguez-Sosa y Col. utilizaron ratones STAT6 -/- y



ratones Balb/c para analizar el papel que juega la respuesta Th2 en la ratones STAT6  $-/-$  durante la infección larval de *Taenia crassiceps*, sabiéndose que después de la infección con cisticercos en ratones BALB/C se desarrolla una fuerte respuesta tipo Th2 produciendo altos niveles de IgG1, IgE, IL-4 hasta IL-13 quedando susceptibles a la infección de *Taenia crassiceps*, en contraste los ratones deficientes en STAT6  $-/-$  muestran una fuerte respuesta tipo Th1 después del reto infeccioso y produciendo de esta manera altos niveles de IgG2a, IL-12 e IFN- $\gamma$  así como de NO controlando de forma eficiente dicha infección parasitaria. Estos resultados sugieren que la respuesta tipo Th2 sirve de mediador de la señal y susceptibilidad hacia *Taenia crassiceps* y que además a diferencia de la mayoría de los helmintos la inmunidad contra la fase larvaria de *Taenia crassiceps* esta mediada por la respuesta tipo Th1 en vez de ser la respuesta tipo Th2 (Rodríguez-Sosa, y Col. , 2002).

En este trabajo se evaluaron los niveles de citocinas en suero con el kit para ratón para citocinas Th1 /Th2 cytometric Bead Array (CBA), por ser un método que permite evaluar varias citocinas en un volumen pequeño de muestra en un solo ensayo y que a decir del proveedor la sensibilidad del método es comparable al ELISA, entonces usando dicho kit de CBAs se evaluaron las citocinas en los sueros obtenidos a las 24 y 48 horas después de la primera, segunda y tercera inmunización y a distintos tiempos post infección durante 35 días.

Encontrándose que el grupo inmunizado con extracto total de cisticercos + Cry1Ac obtuvo un pico alto de TNF- $\alpha$  a las 24 horas de la primera inmunización (100 pg/ml) pero después de eso los valores descendieron y se mantuvieron bajos. En general los valores detectados para los 4 grupos (Cry1Ac, Extracto, Cry1Ac + Extracto) fueron muy bajos y sin variaciones para las citocinas Th1 (IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ ) y casi indetectables para las citocinas tipo Th2 (IL-2, IL-4, IL-5), en comparación con los niveles ya descritos en animales testigos con proceso el infeccioso. Estos resultados pueden ser causa de que el kit utilizado para medir citocinas en suero no fuera el adecuado para medir los cambios de dicha infección ya que carecía de sensibilidad, ya que al comparar estas gráficas con la de los anticuerpos IgG2a e IgG1 anti-cisticercos ellas muestran que sí hubo títulos significativos sugiriendo que deberían presentarse tanto citocinas tanto Th1 como Th2 a lo largo de las inmunizaciones y durante el proceso infeccioso.

Como se mencionó para caracterizar de manera indirecta el tipo de respuesta inmune anticuerpos anti- cisticercos tipo Th1 y Th2 se analizaron las subclases de anticuerpos IgG2a e IgG1 específicas. Ello se midió con ELISA en los sueros obtenidos a distintos tiempos (a las 24 y 48 horas después de las 3 inmunizaciones, a la hora del reto infeccioso y durante los primeros 35 días de infección). Observándose que después de cada inmunización se presentaban incrementos en el título de

anticuerpos específicos de los 3 tratamientos y después del reto infeccioso se presentaba una disminución significativa en la respuesta de anticuerpos, interesantemente el grupo Cry1Ac + extracto (grupo que presentó mayor grado de protección), fue el tratamiento que obtuvo mayores títulos de IgG1 o respuesta tipo Th2, obteniendo títulos de hasta 645000 por lo tanto se puede sugerir que la elevada respuesta específica de anticuerpos IgG1 (respuesta Th2) está relacionada en la capacidad protectora conferida por la coadministración de Cry1Ac durante la infección, mientras que el grupo inmunizado con extracto mostró títulos altos de IgG1 pero fueron constantes y no tan altos. Mientras que el grupo Cry1Ac y grupo testigo obtuvieron pequeñas oscilaciones de título hasta los 21 días de infección por lo tanto estos valores no fueron suficientes para conferir protección durante la infección ya que mostraron ser los grupos con mayor cantidad de cisticercos a la hora del conteo final.

Al medir los títulos de anticuerpos anti-cisticercos IgG se encontró que el grupo extracto + Cry1Ac obtuvo dos picos en el título a los 9 días (95000) y a los 35 días (300000) superando a todos los grupos. Sin embargo en el grupo extracto los títulos siempre fueron mayores y sin oscilaciones a lo largo de la infección y el grupo Cry1Ac a los 9 días de infección tuvo incremento en el título y en el grupo testigo apenas fue detectable dichos títulos sugiriéndose que estas oscilaciones que tuvo el grupo Cry1Ac +extracto en la IgG contribuyeron a conferir mayor protección contra ---

--la infección larvaria de *Taenia crassiceps*.

Al observar la respuesta Th1 IgG2a se indujo a niveles significativos exclusivamente en los grupos inmunizados con extracto, aunque no se pudo relacionar con la mayor protección registrada en el grupo extracto + Cry1Ac, durante la infección de *Taenia crassiceps*, ya que aunque tanto el grupo extracto y el grupo Cry1Ac + extracto tuvieron títulos altos y se mantuvieron a la par durante los primeros 21 días de infección, y tan sólo a los 28 y 35 días de infección el grupo extracto solo obtuvo títulos muy altos (entre los 30000) sin embargo estos altos títulos en la IgG2a no le confirió mayor protección contra la infección, mientras que el grupo extracto + Cry1Ac se mantuvo constante en 60000 casi durante toda la infección, en el grupo Cry1Ac apenas a los 28 días existió un título importante y el grupo testigo solo a las 14 días obtuvo un pequeño incremento en la IgG2a, por lo tanto se presume que este tipo de constancia más que el incremento en los títulos en la respuesta tipo Th1 le confirió cierto grado de protección al grupo extracto + Cry1Ac .

Por otra parte la respuesta primaria de anticuerpos anti-cisticercos IgM se notó muy parecida para los 3 tratamientos durante las primeras 3 inmunizaciones, sin embargo, durante los primeros 4 días de infección el título se volvió muy bajo para los 4 grupos, pero a los 7 días hubo un pico muy alto

en el título tanto el grupo testigo como en el Cry1 Ac sin embargo este incremento repentino no les confirió protección, los siguientes días el grupo testigo, Cry 1 Ac + extracto y extracto se mantuvieron con cambios mínimos en el título, sin embargo el grupo Extracto mas Cry 1 Ac mostró dos pico uno a los 14 días y otro a los 35 días, presumiéndose que estos cambios repentinos en el título le confirieron mayor protección ante la infección de *Taenia crassiceps*.

Con anterioridad se habían realizado estudios en los que se analizaban los niveles de citocinas en sobrenadantes de cultivo de células de bazo durante la infección con *Taenia crassiceps* en donde se mostraba primeramente una respuesta temprana polarizada de tipo Th1 (IgG2a) y después de varios días con la infección parasitaria esta disminuía casi por completo para ser reemplazada por un alto incremento en la respuesta de Th2 (IgG1) (Terrazas, 2007). Sin embargo, nuestros resultados indicaron que en ratones no inmunizados o testigos y los ratones tratados con los tratamientos, se induce un patrón mezclado de respuesta Th1 y Th2 es decir en ningún momento existió una respuesta meramente polarizada, obteniendo de esta forma una respuesta mezclada para Th1 y Th2 en los 4 diferentes grupos, aunque cabe mencionar que siempre hubo tendencia a tener niveles mas alto en la respuesta tipo Th2 sobre todo en los últimos días de infección.

En el caso del grupo extracto + Cry1Ac, la respuesta tipo Th1 y Th2 fue mezclada siendo más predominante la tipo Th2, tanto a la hora de las inmunizaciones como a lo largo de la infección y al día 35 tanto para este grupo como para el grupo extracto solo existió respuesta IgG1. Y para el grupo Cry1Ac durante las inmunizaciones y los primeros 7 días de infección la respuesta fue solo de tipo Th2 y a partir del día 9 la respuesta fue mezclada entre Th1 y Th2, de igual manera al día 35 solo existió título en la IgG1, y el grupo control no hubo título en la Th1 durante los primeros 9 días y la Th2 fue mínima, sin embargo a los 14 días existió respuesta mezclada en la Th1 y Th2.

Por lo tanto se concluye que la inmunización con Cry1Ac, Extracto y la combinación de ambos conlleva a un respuesta mezclada tipo Th1 y Th2, tanto a las 24 y 48 horas después de las diferentes inmunizaciones, así como a la hora del reto infeccioso y durante la infección parasitaria primaria y tardía.

Finalmente los resultados obtenidos en nuestros ensayos indican que la coadministración de Cry1Ac con antígenos (extractos totales del parásito) no inducen una marcada protección, contra la infección causada por la forma larval de *Taenia crassiceps* tan solo induce una protección significativa, especulando podemos decir que quizás la coadministración de Cry1Ac con antígenos vacunales

protectores como los péptidos GK1, KETc1 o la cystein proteasa entre otros podría mejorar la protección, ya que la protección que alcanzamos con dicha coadministración de extracto total más Cry1Ac es de aproximadamente el 60%, por lo que posiblemente al mezclar Cry1Ac con antígenos vacunales específicos se esperaría una marcada mejoría en la protección contra la infección larvaria de *Taenia crassiceps*

## **8. CONCLUSIONES**

1. La protección conferida por el tratamiento Cry1Ac fue casi nula, con el tratamiento extracto solo fue del 12% de protección y la coadministración del Cry1Ac + Extracto fue del 49% de protección en comparación con el testigo.
2. La coadministrarse intraperitonealmente Cry1Ac + Extracto, Cry1Ac sirve como adyuvante protector contra la infección larval de *Taenia crassiceps*.
3. Al medir los anticuerpos anti-cisticercos de tipo IgG, IgG2a, IgG1 e IgM se encontró que para ambos tratamientos (Cry1Ac, extracto y extracto + Cry1Ac) los valores del título si fueron mayores al compararlos con el grupo testigo.
4. El único tratamiento en el que si hubo protección notoria fue en el grupo extracto + Cry1Ac siendo así mismo este grupo el que mostró picos mas altos en todos los anticuerpos anti-cisticercos y en la mayoría de los valores del título fueron los más altos y relevante a los largo de la 3 inmunizaciones y del proceso infeccioso.
5. Se encontró que la infección de *Taenia crassiceps* en ratones BALB/C induce a un respuesta inflamatoria mezclada de tipo Th1 y Th2, en ningún momento se encontró una respuesta polarizada en donde se obtenga una predominante respuesta tipo Th1 para después ser sustituida por una de tipo Th2.
6. Finalmente se concluye que la inmunización con Cry1Ac no confiere protección pero al coadministrarla con extracto protege contra la infección larval de *Taenia crassiceps*, sin embargo se necesitan mas estudios tanto en la dosis administrada y el utilizar antígenos específicos en vez del extracto total así como utilizar otro kit para la cinética de citocinas en suero, para que de esta forma la protección contra la infección sea mayor ya que se redujo el 49 % por ciento en la cantidad de cisticercos encontrada y su morfología cambio siendo menos globosos y casi no se encontraron especímenes en estado de gemación, por lo tanto Cry1Ac coadministrada con un extracto de cisticercos totales si confiere protección contra la infección larvaria de *Taenia crassiceps*.

## **9. RECOMENDACIONES**

A primera vista se observa que la inmunización de Cry1Ac más extracto de cisticercos si aumenta la protección contra infección de *Taenia crassiceps*, pero la inmunización sola de Cry1Ac o extracto no evidencia ninguna protección, así mismo las

características morfológicas cambiaron notablemente en los cisticercos que obtenidos de los ratones inmunizados con Cry1Ac + extracto, ya que eran delgados, más débiles y casi no se encontraban en estado de gemación.

Pero se requieren más estudios y repeticiones de los grupos, así como leer la cinética citocinas en suero en los tiempos establecidos con otro kit.

## **10. REFERENCIAS**

1. (Alonso-Trujillo y Col.,2007)

Alonso-Trujillo, Rivera-Montoya, Rodríguez-Sosa y Terrazas, 2007 “Nitric oxide contribuyes to host resistente against experimental *Taenia crassiceps* cysticercosis.” Parasitol Res (2007) 100:1341-1350.

1. (Aluja y Col., 2006)

Aluja, Carrillo, Chavarría, Escobar, 2006, Cisticercosis : guía para profesionales de la salud Cap. IV “Cisticercosis Porcina en México”, Biblioteca de la Salud, Secretaría de Salud, Fundación Mexicana para la Salud, Instituto Nacional de Salud Pública y Fondo de Cultura Económica México D.F.

2. (Baig y Col.,2006)

Baig, Damian, Morales-Montor, Ghaleb, Baghdadi y White Jr., 2006 “Protection from murine cysticercosis by immunization with a parasite cysteine protease”, ScienceDirect, Microbes and Infection 8 (2006) 2733-2735

3. (Barnes, 2003)

Barnes R. 2003, “Zoología de los Invertebrados”, Editorial Interamericana, Quinceava Edición, México D.F., 826 p.p.

4. (Botero y Col., 2004)

Botero, Agudelo y Gómez-Ospina, 2004, “Evaluación del *cisticerco longicollis* de *Taenia crassiceps* como fuente de antígeno para el diagnóstico de la neurocisticercosis”, Grupo Interdisciplinario para el Estudio de las Parasitosis Intestinales GIEPI. Corporación de Patologías Tropicales, Universidad de Antioquia. XIV PREMIO AVENTIS - Proyecto de Investigación.

5. (Brown, 1999)

Brown, 1999, “Parasitología Clínica”, Editorial Interamericana, Séptima Edición, México D.F. 380 p.p.

6. (Brusca, 2005)

Brusca y Brusca, 2005, "Invertebrados", Editorial Mc Graw Hill, Segunda Edición, México D.F., 389 p.p.

7. (Caballero Soto, 1998)

Caballero Soto, 1998, "Inmunología de la infección por helmintos" Revisión Alergol Inmunol Clin, 1998, Vol. 13, Núm. 6, p.p. 297 – 313.

8. (Carrasco, 2006)

Carrasco, 2006, "Efecto del sexo y de la deficiencia en la respuesta de Anticuerpos en la resistencia natural y conferida por la inmunización con Cry 1Ac más extracto amibiano, a la infección por *Naegleria Fowleri*". Tesis para obtener el título de biólogo, Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios superiores Iztacala.

9. (Chavarría y Col., 2006)

Chavarría y Sciutto, 2006, "Cisticercosis : guía para profesionales de la salud Cap. V "Respuesta inmunológica en la cisticercosis humana y porcina"" Biblioteca de la Salud, Secretaría de Salud, Fundación Mexicana para la Salud, Instituto Nacional de Salud Pública y Fondo de Cultura Económica México D.F.

10. (Cruz-Revilla y Col., 2000)

Cruz-Revilla, Rosas, Frago, López-Casillas, Toledo, Larralde y Sciutto, 2000, "*Taenia crassiceps* cisticercosis: Protective effect and immune response elicited by DNA immunization". American Society of parasitologist, J. Parasitol., 86(1), 2000 p.67-74

11. (Esquivel y Moreno-Fierros, 2005)

Esquivel R. and Moreno-Fierros L., "The Mucosal and systemic adjuvant effects of cholera toxin and Cry1Ac protoxin, on the specific antibody response to HIV-1 C4/V3 peptides, are different and depend on the antigen coadministered". Viral Immunol 2005. Volume 18 Issue 4 pags 695-708.



12. (Flisser y Col.,1997)

Flisser, Madrazo y Delgado. “Cisticercosis Humana”, Manual Moderno S.A. de C.V., Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F. 176 p.p.

13. (Flisser y Col., 2006)

Flisser, Vargas-Parada y Laclette, “*Taenia solium*: un parásito cosmopolita”, INVESTIGACIÓN Y CIENCIA, mayo, 2006

14. (Flores y Col., 2004)

Flores, Becerril y Romero, 2004, “Parasitología Médica de las moléculas a la enfermedad”, Editorial Mc Graw Hill, Primera Edición, México D.F. , 301 p.p.

15. (Fragoso y Col., 2008)

Fragoso, Meneses, Sciutto, Fleury y Larralde, 2008 “ Preferential growth of *Taenia crassiceps* cysticerci in female mice holds across several laboratory mice strains and parasite lines”. Journal Parasitol. 94 (2), 2008, p.p. 551 – 553

16. (Gause y Col., 2003)

Gause, Urban, Miguel y Stadecker 2003, “The immune response to parasitic helminths: insights from murine models” TRENDS in immunology Vol.24 No.5 269 -276 May 2003

17. (Goldsby y Col.,2004)

Goldsby, Kindt, Osborne y Kuby, 2004, “Inmunología”, Editorial McGraw-Hill, Quinta Edición, México D.F. 665 p.p.

18. (González, 2007)

González, Zamora y Alonso 1999” Inflammatory cytokines and their actions and effects in the sepsis and septic shock centro de Investigaciones del Ozono”, AP 6412, Habana, Cuba.

19. (Guerrero y Col., 2006)

Guerrero GG, Russell, WM, and L. Moreno-Fierros. "Analysis of the Th cellular immune response induced by *Bacillus thuringiensis* Cry 1Ac toxins in mice: Effect of the hydrophobic motif from diphtheria toxin". Mol Immunol. In press 2007

20. (Höfte y Col., 1989)

Höfte, H., . H. Whiteley. 1989. "Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*". Microbiol. Rev. 53:242- 255.

21. (Janeway, 2003)

Janeway Jr., Travers, Walport y Shlomchik, 2003, "Inmunobiología El sistema inmunitario en condiciones de salud y enfermedad", Editorial MASSON, Segunda Edición, Barcelona España, 731 p.p.

22. (López-Briones y Col., 2003)

López-Briones, Lamoyi, Fragoso, Soloski y Sciutto, 2003, "*Taenia crassiceps* cysticercosis: immune response in susceptible and resistant BALB/c Mouse substrains" Parasitol Res (2003) 90: 236 – 242.

23. (Molinari y Col., 1997)

Molinari, Rodríguez, Tato, Soto, Arechavaleta y Solano, 1997, "Field trial for reducing porcine *Taenia solium* cysticercosis in Mexico by systematic vaccination of pigs", Veterinary Parasitology 239 p.p.

24. (Montero, 2006)

Montero, 2006, "Caracterización de una población de macrófagos supresores inducidos en la cisticercosis experimental murina causada por *Taenia crassiceps*". Tesis para obtener el título de biólogo, Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios superiores Iztacala.

25. (Mooney y Col., 2000)

Mooney, Spolski y Kuhn, "Immune Destruction of Larval *Taenia crassiceps* in Mice", INFECTION AND IMMUNITY, May 2000, p. 2393–2401 Vol. 68, No. 5

26. (Moreno-Fierros y Col., 2000)

Moreno-Fierros L, García N, Gutierrez R, López-Revilla R and Vázquez-Padrón RI. "Intranasal, Rectal and Intraperitoneal Immunization with Protoxin Cry1Ac from *Bacillus thuringiensis* Induces Compartmentalized Serum, Intestinal, Vaginal and Pulmonary Immune Responses in Balb/c Mice". Microbes and Infection 2: 885-890 , 2000.

27. (Moreno – Fierros y Col., 2002)

Moreno-Fierros, L. Resendiz-Albor, AA. and López-Revilla R.. "Differences between the large and small intestine in the immunodominant amebic proteins recognized by IgG and IgA antibodies in Balb/c mice". Scand J Immunol 2002b May;55(5):458-469 .

28. (Moreno – Fierros y Col 2002 Oct)

Moreno-Fierros L, Pérez- Ordóñez and Martín- Palomar, "Slight influence of the estrous cycle stage on the Mucosal and systemic specific antibody response induced after vaginal and intraperitoneal immunization with protoxin Cry1Ac from *Bacillus thuringiensis* in mice". Life Sci. 2002a Oct 18;71(22):2667-80.

29. (Moreno – Fierros y Col., 2003)

Moreno-Fierros, L., Ruiz-Medina, J., Esquivel, R., López-Revilla, R. and Piña-Cruz Saúl. 2003. "Cry1Ac protoxin as carrier and adjuvant for the induction of mucosal and systemic antibody immune responses to polysaccharides of *S. pneumoniae* by intranasal immunization in mice". Scand. J. Immunol. 57: 45.

30. (Murray, 1990)

Murray y Spiegel, "Estadística: Teoría y Problemas resueltos" Mc Graw Hill, 1990, Mexico D.F. 352 p.p.

31. (Rivas y Col.,1999)

Rivas, Rossi, Hernández y Urdaneta 1999 "New antigenic fractions for

neurocysticercosis diagnosis". *Km* dic. 1999.vol.27, no.3, p.115-128. ISSN 0075-5222

32. (Rodríguez-Sosa y Col., 2003)

Rodríguez-Sosa, David, Bojalil, Satoskar y Terrazas, 2002 "Cutting Edge: Susceptibility to the Larval Stage of the Helminth Parasite *Taenia crassiceps* Is Mediated by Th2 Response Induced Via STAT6 Signaling". *The Journal of Immunology*, 2002, 168: 3135–3139.

33. (Rodríguez-Sosa y Col., 2004)

Rodríguez.Sosa, Saavedra, Tenorio, Rosas, Satoskar y Terrazas, 2004 "A STAT4-Dependent Th1 response is requerid for resistance to the Helminth parasite *Taenia crassiceps*". *Infection and immunity*, Aug.2004.,p. 4552-4560.

34. (Roitt, 2003)

Roitt y Delves, 2003, "Inmunología fundamentos," Editorial Medica Panamericana, Décima Edición, Madrid España, 559 p.p.

35. (Rojas y Col., 2004- Aug)

Rojas-Hernandez S, Rodriguez-Monroy MA, Lopez-Revilla R, Resendiz-Albor AA, Moreno-Fierros L. "Intranasal coadministration of the Cry1Ac protoxin with amoebal lysates increases protection against *Naegleria fowleri* meningoencephalitis". *Infect Immun*. 2004 Aug;72(8):4368-75

36. (Rojas y Col., 2004-Sep)

Rojas-Hernandez S, Jarillo-Luna A, Rodriguez-Monroy M, Moreno-Fierros L, Campos-Rodriguez R. "Immunohistochemical characterization of the initial stages of *Naegleria fowleri* meningoencephalitis in mice". *Parasitol Res*. 2004 Sep;94(1):31-6.

37. (Romagnani, 1999)

Romagnani S. “Interleuquinas Th1/Th2”. Dermatología Peruana, Sociedad peruana de Dermatología Valdivia L. Vol. 9 Sup. N1, 1999

38. (Sciutto y Col., 2006)

Sciutto, Fragoso y Larralde, 2006. Cisticercosis : guía para profesionales de la salud Cap.VI “Vacunas contra la cisticercosis”. Biblioteca de la Salud, Secretaría de Salud, Fundación Mexicana para la Salud, Instituto Nacional de Salud Pública y Fondo de Cultura Económica México D.F.

39. (Tay, 2002)

Tay y Velasco, 2002, “Parasitología Médica”, Editorial MENDEZ EDITORES, Séptima Edición, México D.F., 504 p.p.

40. (Terrazas y Col., 1998)

Terrazas, Bojalil, Govezensky y Larralde, “Shift from an Early Protective TH1-Type Immune Response to a Late Permissive TH2-Type Response in Murine Cysticercosis (*Taenia crassiceps*)”. The Journal of Parasitology, Vol. 84, No. 1 (Feb., 1998), pp. 74-81

41. (Terrazas y Col., 2007)

Terrazas y Rodríguez- Sosa 2007. “Advances in the immunobiology of cysticercosis:Lessons from a murine model”. Advances in the Immunobiology of parasitic dideases 2007:111-139.

42. (Toenjes y Kuhn, 2003)

Toenjes y Kuhn, 2003 “The initial immune response Turing experimental cysticercosis is of the mixed Th1/Th2 type”. Parasitol Res (2003) 89:407-413.

43. (Toenjes y Col., 1999)

Toenjes, Spolski, Mooney y Kuhn, 1999 “The systemic immune response of BALB/c mice infected with larval *Taenia crassiceps* is a mixed Th1/Th2-type response”. Parasitology (1999), 118, 623 – 633.

44. (Toledo y Col., 1998)

Toledo, Larralde, Fragoso, Gevorkian, Manoutcharian, Hernández, Acero, Rosas, López-Casillas, Kubli Garfias, Vázquez, Terrazas, y Sciutto. “Towards a *Taenia solium* Cysticercosis Vaccine: an Epitope Shared by *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* Protects Mice against Experimental Cysticercosis”. INFECTION AND IMMUNITY, May 1999, p. 2522–2530 Vol. 67, No.

45. (Tongren y Col., 2004)

Tongren, J. E., F. Zavala, D. S. Roos y E. M. Riley, “Malaria vaccines: if at first you don’t succeed”, Trends in Parasitology. 2004 20(12):604-610.

46. (Torres y Col., 2006)

Torres-Corzo, Rodriguez-Della, Rangel-Castilla y Bruns. “Syndrome caused by intraventricular cysticercosis treated using flexible endoscopy”. J. Neurosurg. 2006 May, 104(5):746-8

47. (Vázquez-Padrón y Col., 1999)

Vázquez-Padrón RI, Moreno-Fierros L, Neri-Bazán L, Del la Riva GA and López-Revilla R. (1999a). “*Bacillus thuringiensis* Cry1Ac protoxin is a potent systemic and mucosal adjuvant”. Scand. J. Immunol. 46:578-584.

## **11. APÉNDICE.**

### **Buffer de solución salina amortiguadora con fosfatos (PBS) 1x: 10L,pH 7.4**

80 g.	NaCl
11.6 g.	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
2 g.	KCl

### **PBS/Tween:**

0.5 ml	Tween 20
1 L	PBS 1x

### **Solución de Bloqueo:**

1x	PBS
1%	BSA

### **Buffer de Carbonatos 0.1 M pH 9.6:**

Diluir 0.52 g. de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> en 50 ml de agua destilada

Diluir 0.44 gr de NaHCO<sub>3</sub> en 50 ml de agua destilada

Adicionar solución NAHCO<sub>3</sub> hasta que el pH llegue a 9.6

### **Buffer de fosfato-citrato 50Mm pH 5.2 (para solución reveladora)**

Ácido cítrico	0.1 M	6.25 ml
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.2 M	6.42 ml
H <sub>2</sub> O		12.5 ml
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	30%	10 ul
Ortofenildiamina		10 mg

Se afora para un volumen final de 25 ml.

### **Sustrato ABTS (ELISA):**

Agregar 150 mg de 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) en 500 ml de ácido cítrico 0.1 M en agua destilada y con NaOH, llevar a pH 4.35. Alicuotas de 11ml mantenidos a -60°C.

**Solución de H<sub>2</sub>H<sub>2</sub> 3%**

Agregar 10 ml de 30% H<sub>2</sub>H<sub>2</sub> a 90ml de H<sub>2</sub>O, protegiendo de la exposición de la luz.

Solución de poliacrilamida	100 ml
Acilamida	30 gr.
Bis-acrilamida	0.8 gr.

Disolver en agua destilada y aforar, almacenar 4°C.

**Solución Tris Base (1.57M) pH 6.8** **100 ml**

Tris base	6 gr.
-----------	-------

Disolver en agua destilada y aforar, almacenar 4°C.

**SDS 20%** **50 ml**

SDS	1 gr.
Persulfato de NH <sub>4</sub> (APS)	10%
Agua destilada	1 ml

Disolver y aforar.

**Buffer de muestra** **10 ml**

Tris pH 6.8	1.2 ml
SDS 10%	2 ml
Glicerol	1 ml
2 mercaptoetanol	0.1 ml
Azul bromofenol	0.05 gr.

Disolver en agua destilada y aforar, dividir en alícuotas de 1 ml, almacenar 4 °C.

**Solución desteñidora** **100 ml**

5% metanol
7% ácido acético
Agua destilada.