

00381

9.
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Taenia solium CLONACION, CARACTERIZACION Y
EXPRESION DEL GEN PARA
EL ANTIGENO B.

TESIS CON
FALLA DE COPIEN

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE
DOCTOR EN CIENCIAS, ESPECIALIDAD BIOLOGIA
P R E S E N T A
M. EN C. ABRAHAM LANDA PIEDRA

DIRECTOR DE TESIS: DR. JUAN PEDRO LACLETTE SAN ROMAN

MEXICO, D. F.

1992



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

RESUMEN

El antígeno B (AgB) es la proteína inmunodominante en la cisticercosis humana y porcina. Estudios de inmunofluorescencia, inmunoperoxidasa indirecta y de cultivo *in vitro* de cisticercos enteros han sugerido que este antígeno es sintetizado en las células subtegumentales del cisticerco y secretado a la interfase huésped-parásito. Otra serie de resultados han mostrado que el AgB se une a colágena y al C1q del complemento, inhibiendo su activación. Estos datos, sugieren que el AgB juega un papel relevante en la relación huésped-cisticerco.

El AgB fue purificado de un extracto crudo de cisticercos de *Taenia solium*, aprovechando su afinidad por colágena. Se consiguió una secuencia parcial de aminoácidos (LSLQTQLQXLQMDYDNLQ) a partir de un fragmento de 55 kDa, obtenido por digestión del AgB con tripsina. La secuencia QMDYDN fue escogida para diseñar una mezcla de oligonucleótidos que se usó como sonda para aislar el gen del AgB por tamizaje de bibliotecas de cDNA de cisticercos de *T. solium*. Se aisló una clona con un inserto de 3.6 Kb que fue caracterizada y secuenciada en M13 por el método de terminación de cadenas con di-deoxinucleótidos. La secuencia de aminoácidos deducida a partir de la secuencia de nucleótidos es 75% homóloga con la secuencia de la paramiosina del *Schistosoma mansoni*. Otros análisis de la secuencia de proteína demuestran que el AgB es la paramiosina de *T. solium*. La región codificadora completa del AgB se subclonó y expresó como proteína de fusión con una proteína que une a maltosa, usando como vector al plásmido pMal-c. Pruebas de inmunoelectrotransferencia mostraron que la proteína recombinante es reconocida por anticuerpos anti-AgB. Asimismo, la proteína recombinante presenta la propiedad de unirse a colágena y al C1q, característica de la proteína natural. Análisis de tipo Southern indican que el gen del AgB tiene una sola copia en el genoma de *T. solium*.

SUMMARY

Antigen B (AgB) is an immunodominant protein in human and porcine cysticercosis. Data from immunofluorescence, immunoperoxidase and *in vitro* culture, suggest that AgB is synthesized by tegumentary cytons of the cyst. AgB binds C1q and inhibits the function of the complement cascade at the C1 step, suggesting that it plays a relevant role for the survival of cysticerci in the host tissues.

AgB was isolated from a crude extract of *T. solium* cysticerci by its affinity to collagen. The partial amino acid sequence LSLQTQLQXLQMDYDNLQ was obtained from a 55 kDa peptide obtained by digestion of AgB with trypsin. The sequence QMDYDN was selected to design a degenerated synthetic oligonucleotides for the screening of a cDNA library of *T. solium* cysts. A 3.6 kb clone was obtained, characterized and sequenced in M13 by the dideoxy chain-termination method. An single open reading-frame encoding a protein of 863 amino acid residues was found. The predicted translation product is 75% homologous with *Schistosoma mansoni* paramyosin and rigorously follows the 7/28 heptad-repeated structure characteristic of α -helical coil-coiled proteins. We conclude that AgB is the paramyosin of *T. solium*. The complete TPmy coding region was subcloned for expression as a fusion product with a maltose-binding protein into the bacterial vector pMal-c (New England Biolabs). Recombinant AgB is recognized by specific antibodies to AgB, binds to collagen and C1q and inhibits C1 function. Southern analysis using genomic DNA of *T. solium* indicates that AgB is encoded by a single-copy gene.

LISTA DE ABREVIATURAS

AgB	Antígeno B
Anti-AgB	Anti-Antígeno B (anticuerpos)
BSA	Albumina sérica bovina
cdNA	Acido desoxiribonucleico complementario
DNA	Acido desoxiribonucleico
DMSO	Dimetil sulfóxido
ECI	Extracto crudo de cisticercos
EDTA	Acido etilén diamino tetracético
ELISA	Análisis inmunoenzimático cuantitativo
IET	Inmunolectrotransferencia
IPTG	Isopropiltio- β -D-galactosidasa
Kb	Kilobases
kDa	Kilodaltones
MBP	Proteína que une a maltosa
MBP-TPmy	Proteína de fusión AgB-TPmy con la MBP
NC	Membrana de nitrocelulosa
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PBS	Solución salina (0.15 M) amortiguada con fosfatos (0.015 M), pH 7.4
PCMB	p-Cloro mercuribenzoato
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PMSF	Fenilmetil-sulfonilfluoruro
PPO	2,5 Difenoxazol
PVDF	Difluoruro de polivinilideno
RNA	Acido ribonucleico
SDS	Dodecil sulfato de sodio
t/a	Temperatura ambiente
TAE	Amortiguador de Tris-Acetatos
TPmy	Paramiosina de la <i>T. solium</i>
TLCK	Nalfa-p-Tosil-L-lisin clorometil cetona

INDICE

DEDICATORIA -----	i
AGRADECIMIENTOS -----	ii
RESUMEN -----	iii
RESUMEN (INGLES) -----	iv
LISTA DE ABREVIATURAS -----	v
INDICE -----	vi
Capítulo I. INTRODUCCION -----	1
1. BIOLOGIA DE <i>Taenia solium</i> -----	1
a) Ciclo de vida y morfología -----	1
2. IMPORTANCIA DE LA TENIASIS/CISTICERCOSIS -----	2
a) Cisticercosis -----	2
b) Teniasis -----	3
3. DIAGNOSTICO -----	3
4. VACUNACION-PROTECCION -----	6
5. TRATAMIENTO -----	8
6. CONTROL Y PREVENCIÓN -----	8
Capítulo II. ANTECEDENTES -----	10
1. ANTIGENO B (AgB) -----	10
2. ANTIGENO B EN LA RELACION HUESPED-PARASITO -----	10
Capítulo III. OBJETIVO -----	12
Capítulo IV. MATERIALES Y METODOS -----	13
1. MATERIALES -----	13
a) Materiales biológicos -----	13
i) Metacéstodos -----	13
ii) Bacterias -----	13
iii) Reactivos, estuches y Enzimas -----	13
2. METODOS -----	14
a) Métodos Bioquímicos -----	14
i) Obtención de Extracto crudo -----	14
ii) Purificación del AgB -----	14
iii) Determinación de la concentración de Proteínas -----	14
iv) Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (PAGE-SDS) -----	14
v) Secuencia de aminoácidos del AgB -----	14
vi) Síntesis de oligonucleótidos -----	15
b) Métodos Inmunológicos -----	15
i) Preparación de suero hiper-inmune anti-AgB -----	15
ii) Inmunolectrotransferencia -----	15
c) Métodos de Biología Molecular -----	16
i) Preparación de RNA total -----	16
ii) Obtención de RNA Poli-A ⁺ -----	16
iii) Traducción <i>in vitro</i> -----	17
iv) Análisis tipo Northern -----	17
v) Síntesis de cDNA -----	18

vi) Análisis de cDNA	18
vii) Adición de Ligadores	19
viii) Tratamiento con T4 Polinucleotido cinasa	19
ix) Selección del tamaño de los fragmentos de cDNA	19
x) Ligación con el vector	20
xi) Empacamiento del cDNA+DNA fágico	20
xii) Titulación de las bibliotecas de cDNA	20
xiii) Amplificación de bibliotecas	20
xiv) Tamizaje de las bibliotecas	21
xv) Mapa de restricción de las clonas	21
xvi) Secuenciación de DNA	21
xvii) Amplificación del DNA por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	22
xviii) Clonación de fragmentos de PCR en el vector pMal-c	22
xix) Transformación bacterial	22
xx) Purificación del DNA Plásmidico	23
xxi) Producción de proteínas de fusión	23
xxii) Purificación de la proteína de fusión	23
xxiii) Análisis tipo Southern	24
Capítulo V. RESULTADOS	25
1. PURIFICACION DEL AgB	25
2. SECUENCIA DE AMINOACIDOS DEL AgB	25
3. CONSTRUCCION DE LAS BIBLIOTECAS DE cDNA DE <i>Taenia solium</i>	26
a) Purificación del RNA Poli-A	26
b) Preparación y caracterización del cDNA	26
c) Construcción y caracterización de bibliotecas de cDNA	27
4. TAMIZAJE DE LA BIBLIOTECA DE cDNA CON FRAGMENTOS DE TAMAÑO SELECCIONADO DE 2 A 7 kb EN LAMBDA gt10	28
5. MAPAS DE RESTRICCION	28
6. SECUENCIA DEL AgB	28
7. HOMOLOGIA DEL AgB CON LAS PARAMIOSINAS	29
8. CONSTRUCCION DEL PLASMIDO RECOMBINANTE PARA EXPRESION DE LA PARAMIOSINA RECOMBINANTE RTPmy	31
9. EXPRESION Y PURIFICACION DE LA TPmy RECOMBINANTE	31
10. NUMERO DE COPIAS DEL GEN DE LA TPmy EN EL GENOMA DE <i>Taenia solium</i>	32
11. DETERMINACION DEL TAMAÑO DEL RNA MENSAJERO DE LA TPmy	33
Capítulo VI. DISCUSION	34
Capítulo VII. APENDICES	41
1. TAXONOMIA DE <i>T. solium</i>	41
2. DESCRIPCION DE VECTORES	41
a) Lambda gt10	41

b) Lambda gt11	42
c) Vectores pMAL (pMalc-pMalp)	42
3. PARAMIOSINA	43
4. FORMULAS Y AMORTIGUADORES	44
Capítulo VIII. BIBLIOGRAFIA	48

I. INTRODUCCION

La teniasis/cisticercosis causada por *Taenia solium* es un serio problema de salud pública, y de economía en el mercado e industria de alimentos elaborados con carne de porcinos en algunos países de Africa, Asia y América Latina, entre los que se encuentra México.

1. BIOLOGIA DE *Taenia solium*.

a) Ciclo de vida y morfología (Fig. 1).

El hombre y el cerdo adquieren la cisticercosis al ingerir heces y alimentos contaminados con huevecillos de *T. solium*. Los huevecillos son esféricos miden de 30-45 μ m de diámetro y están formados por una serie de envolturas que posibilitan la supervivencia del embrión hexacanto en el medio ambiente (Laclette *et al.*, 1982) (Fig. 2). La envoltura más externa es una capa celular denominada vitelo seguida hacia el interior por el embrióforo estriado, constituido por una serie de bloques proteicos unidos entre sí por una proteína cementante. La envoltura más interna es la membrana oncosférica que envuelve directamente a la oncosfera o embrión hexacanto. El embrión posee un complejo muscular que opera los 3 pares de ganchos, un par de glándulas que le ayudan a penetrar en los tejidos del huésped y células germinativas a partir de las cuales se desarrollará el cisticerco. Cabe mencionar que aunque el cerdo es el principal huésped intermediario de *T. solium*, otras especies como el perro, jabalí, monos (Mazzotti *et al.*, 1965 Flores-Barroeta y Bifano, 1965), incluyendo al hombre, pueden también ser infectados.

Cuando el huevecillo es ingerido por el huésped humano o porcino, las enzimas proteolíticas y las sales biliares del tracto digestivo degradan al embrióforo y proveen la señal para la activación de la oncosfera (Silverman, 1954; Laclette *et al.*, 1982). Al desintegrarse el embrióforo en el duodeno, se libera la oncosfera que penetra la pared intestinal ayudada por sus ganchos y secreciones líticas, hasta alcanzar capilares sanguíneos a través de los cuales es transportada a diferentes tejidos del cuerpo, como el subcutáneo, muscular, nervioso, etc. Aunque se desconocen muchos eventos después de la penetración de las oncosferas, se sabe que el embrión requiere al menos 10 semanas para convertirse en cisticerco (Yoshino, 1933 a, b, c).

El cisticerco de *T. solium* puede sobrevivir por varios años en el tejido del huésped intermediario (Hird y Pullen, 1979). El cisticerco (Fig. 3) está formado por una vesícula translúcida redonda u ovoide que mide 0.5-2 cm de diámetro con un escólex invaginado y opaco que visto al microscopio de luz posee 4 ventosas y un roseto con una doble corona de ganchos. La cara externa de la pared vesicular es un tegumento con estructuras digitiformes denominadas microtricas, las cuales aumentan la superficie (Ramirez-Bon *et al.*, 1982). Es a través de esta membrana que ocurre

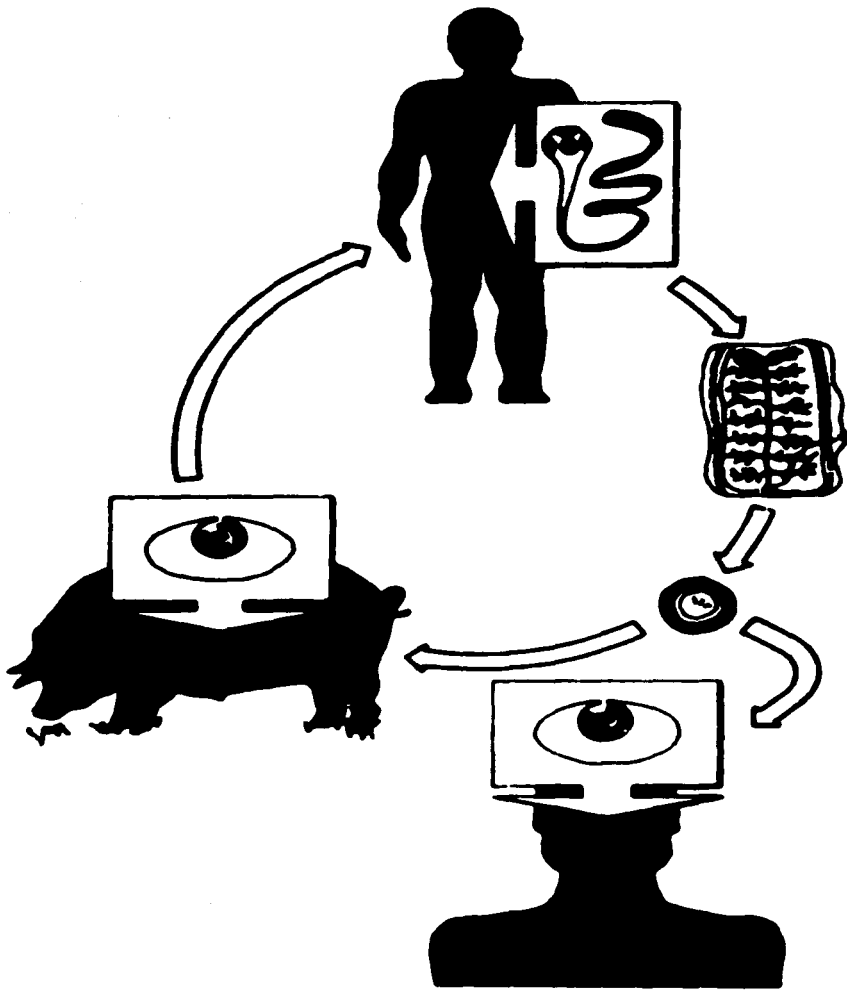


Figura 1. Ciclo de vida de *T. solium*.

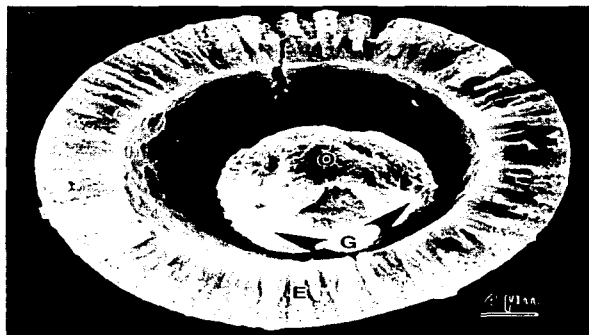


Figura 2. Micrografía electrónica de barrido de un huevecillo de *T. solium*. E: embrióforo, O: oncosfera, G: ganchos oncosferales (tomada de Laclette et al., 1982).

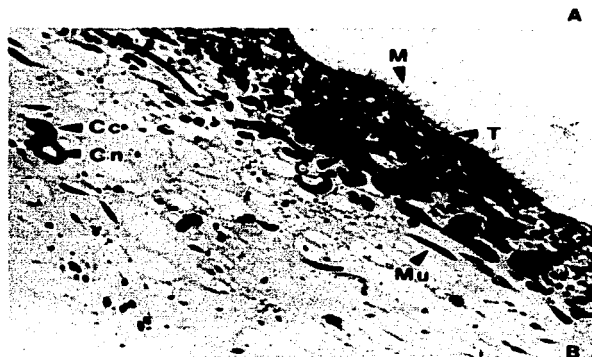
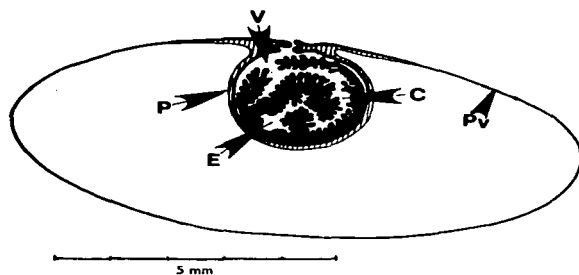


Figura 3. El cisticerco de *T. solium*. **A:** Ilustración esquemática de la larva entera: E: escólex, C: canal espiral, V: espacio vestibular, P: pared vestibular y Pv: Pared vesicular. **B:** Micrografía óptica de un corte de la pared vesicular del cisticerco de *T. solium*: M: microvellosidades, T: tegumento, C: citones subtegumentales, Mu: músculo, Cn: canal y Cc: célula formadora de canal.

el intercambio metabólico e inmunológico entre el huésped y el parásito.

El ciclo se completa cuando el cisticerco es ingerido por el ser humano al comer carne de cerdo infectado. Nuevamente las enzimas y las sales biliares del aparato digestivo inducen la activación del parásito, que evagina y se adhiere en la pared del intestino delgado, para desarrollarse en un gusano adulto en aproximadamente 4 meses. El adulto de *T. solium*, comúnmente llamado solitaria es un céstodo hermafrodita que vive hasta 25 años en el intestino delgado del hombre (Asada, et al., 1956). Se alimenta del contenido intestinal del huésped y carece de tracto digestivo por lo que la captación de alimento se lleva a cabo a través del tegumento. Cabe hacer notar que el hombre es el único huésped definitivo de *T. solium*.

La tenia adulta es un gusano largo de color blanco lechoso y cuerpo aplanado que mide 1.5-5 m, aunque ocasionalmente alcanza los 8 m. Su cuerpo se divide en 3 regiones: escólex, cuello y estróbilo. El escólex que mide alrededor de 1 mm de diámetro (Fig. 4), posee 4 ventosas y un rostell armado con una doble corona de ganchos. El número de ganchos rostellares puede variar entre 22 y 33; su tamaño promedio es de 165 ± 5 μ m de longitud (Verster, 1969). El cuello es corto, sin segmentaciones y de menor diámetro que el escólex. El estróbilo consta de una serie de segmentos fusionados denominados proglótidos. Los proglótidos más cercanos al cuello son los más jóvenes e indiferenciados. Hacia la parte media del estróbilo se encuentran los proglótidos maduros (Fig. 5), que son cortos y que contienen los testículos y un ovario trilobulado (Asada, et al., 1956). Al final del estróbilo se encuentran los proglótidos grávidos que son más largos que anchos (7-12 mm de longitud y 5-6 mm de ancho) con el saco uterino central que presenta 7-13 ramificaciones laterales repletas de huevecillos. Los proglótidos grávidos que contienen alrededor de 50,000 huevecillos, cada uno, se desprenden del gusano adulto y son llevados en las heces hacia el exterior en un promedio de 4-5 por día (Aluja et al 1987). En el medio ambiente, la descomposición de los proglótidos grávidos libera los huevecillos que pueden contaminar aguas, suelos y alimentos. La primera expulsión de proglótidos generalmente ocurre entre los 62-72 días después de haber ingerido un cisticerco.

2. IMPORTANCIA DE LA TENIASIS/CISTICERCOSIS EN MEXICO.

a) Cisticercosis

La cisticercosis humana es importante en México debido a su alta prevalencia y a la severidad de sus manifestaciones clínicas. Estudios inmunológicos han estimado que alrededor del 1% de la población en México tiene anticuerpos circulantes anti-cisticerco (Woodhouse, et al., 1982; Larralde, 1991, comunicación personal). Por otro lado, estudios de autopsias realizadas en diferentes centros hospitalarios del país han reportado una frecuencia de neurocisticercosis de 0.13 a 3.6% en series de autopsias (Lombardo



Figura 4. Micrografía electrónica de barrido de un cisticerco evaginado de *T. solium*. V: ventosas, G: ganchos, R: rostelo, C: cuello (cortesía del Dr. Juan Pedro Laclette).

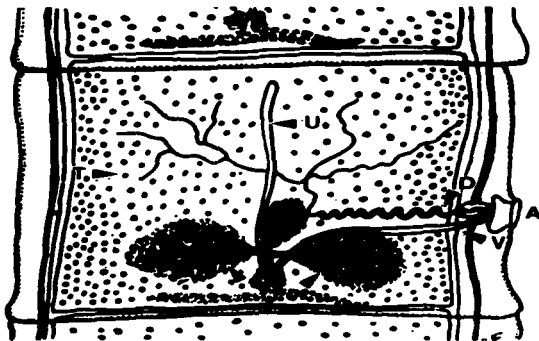


Figura 5. Ilustración esquemática de un proglótido mostrando el aparato reproductor de *T. solium*. A: atrio genital, D: ducto genital, O: ovario trilobulado, T: testículos, V: vagina, U: útero.

et al., 1982). Las manifestaciones de la neurocisticercosis son variables, y dependen de la localización de los cisticercos en el sistema nervioso central. La neurocisticercosis puede ser asintomática o bien provocar alteraciones severas que afectan la vida de los pacientes e incluso pueden causar la muerte (Lombardo et al., 1982; Sotelo et al., 1985; Estañol et al., 1986; Earnest et al., 1987).

En México, la neurocisticercosis humana causa un gasto económica considerable en la atención de los pacientes (Velasco-Suárez et al., 1982). Además, la enfermedad tiene importancia desde el punto de vista social y económico, debido a que el 75% de los pacientes con neurocisticercosis se encuentran en edades productivas y están frecuentemente incapacitados para trabajar. Los costos para el cuidado médico tales como hospitalización, quimioterapia, neurocirugía y tomografía axial computarizada, mostraron que durante 1986 se gastaron en México 14.5 millones de dólares para tratar solamente 2700 casos nuevos de neurocisticercosis (Flisser, 1988).

La cisticercosis en cerdos causa considerables pérdidas económicas, por ejemplo, en el año de 1980 la cisticercosis porcina produjo pérdidas de más de 43 millones de dólares por decomisos de cerdos en los rastros, lo que representó el equivalente al 68.5% del total de la inversión en la producción de cerdos (Acevedo, 1989).

b) Teniasis.

La teniasis es la enfermedad causada por los gusanos adultos del género *Taenia*. La teniasis en humanos puede ser causada por los adultos de *T. solium* o *T. saginata*, mientras que otros animales, especialmente perros, son huéspedes definitivos para varias otras especies de ténidos tales como *T. hydatigena*, *T. ovis* y *T. pisiformis* (Gemmell et al., 1985). La prevalencia de la teniasis por *T. solium* y *T. saginata* en población abierta en México es de 1.52% (Tay et al., 1976; Díaz, et al., 1989). En algunos estudios se han citado prevalencias que oscilan entre 0.1% para el estado de Nuevo León a 4.5% para el estado de Hidalgo (Tay et al. 1976).

La teniasis es una infección que produce poco o ningún problema de salud, los síntomas que se han descrito son insomnio, anorexia, o bulimia, pérdida de peso y algunos trastornos abdominales ligeros (Soulsby, 1982). Sin embargo, su importancia radica en que los individuos teniásicos son focos de infección para ellos mismos y para los humanos y animales que viven a su alrededor. Por ejemplo, en un estudio epidemiológico realizado en una comunidad de Sinaloa, se encontró un 12% de seropositividad global, que aumentó al 50% en familiares y otros individuos que viven cerca de los portadores de tenia adulta (Díaz-Camacho et al., 1989).

3. DIAGNOSTICO.

Varios métodos han sido utilizados en el diagnóstico de la neurocisticercosis humana. Métodos imagenológicos como la tomografía axial computarizada (TAC) y la resonancia magnética nuclear

(RMN) han mostrado ser muy efectivos para la localización e identificación del parásito. Estos métodos junto con la evaluación clínica y los resultados de las pruebas inmunológicas, han resuelto razonablemente el diagnóstico hospitalario de la cisticercosis.

Sin embargo, una de las necesidades actuales es la de obtener componentes (proteínas, DNA o RNA) especie-específicos para el desarrollo de métodos de uso más amplio para definir las áreas endémicas, detectar animales infectados que van a ser sacrificados en los rastros, así como para la diferenciación entre adultos y huevecillos de *T. solium* y *T. saginata*.

Entre los métodos inmunológicos que se han utilizado para el diagnóstico de la cisticercosis se encuentran el ensayo inmunoenzimático (ELISA), la inmunolectrotransferencia (IET), la inmunolectroforesis (IEF), la hemaglutinación indirecta (HI), la inmunofluorescencia indirecta (IFI) y la fijación del complemento (FC) en suero y líquido cefalorraquídeo (LCR) de pacientes (Niето, 1956; Rydzewski *et al.*, 1975; Flisser, 1980; Miller *et al.*, 1984; Mohammad *et al.*, 1984; Espinoza *et al.*, 1986).

Diferentes estudios que utilizaron ELISA reportaron una sensibilidad entre el 70-100% en suero y LCR (Schantz *et al.*, 1980; Diwan *et al.*, 1983; Grogl *et al.*, 1985; Corona *et al.*, 1986; Espinoza *et al.*, 1986; Larraide *et al.*, 1986; Rosas *et al.*, 1986; Nascimento *et al.*, 1987; Nascimento *et al.*, 1987; Pammenter *et al.*, 1987). Sin embargo, la determinación de anticuerpos tiene varias limitaciones, por un lado la sensibilidad obtenida con el suero es menor que la obtenida con LCR (Espinoza *et al.*, 1986). Además, la mayoría de las pruebas inmunológicas utilizan extractos crudos de la larva, por lo que se han demostrado reacciones cruzadas con otros parásitos (Schantz *et al.*, 1980; Espinoza *et al.*, 1986). Cabe mencionar que el uso de antígenos puros tales como el antígeno B y algunas glicoproteínas de superficie del cisticerco han disminuido las reacciones cruzadas con algunos parásitos, pero no han permitido realizar un diagnóstico diferencial entre cisticercosis e hidatidosis (Espinoza *et al.*, 1986) y probablemente otras cestodiasis, debido a que estos antígenos se encuentran presentes en otros parásitos platemintos (Landa, 1988; Olivo *et al.*, 1988).

Recientemente, aplicando la técnica de inmunolectrotransferencia como prueba diagnóstica utilizando un extracto completo de *T. solium* y sueros de pacientes cisticercosos y con otras infecciones helmínticas, mostraron que existen polipéptidos específicos (Gottstein *et al.*, 1986; Gottstein *et al.*, 1987). Por ejemplo, se han identificado 2 polipéptidos de 26 y 8 kDa, que solamente son reconocidos por anticuerpos del suero y LCR de pacientes con cisticercosis confirmada mostrando una especificidad del 100% (Gottstein *et al.*, 1987). Aplicando la misma estrategia pero utilizando fracciones glicoproteicas purificadas de *T. solium* por medio de cromatografías de afinidad con lectinas, otros grupos han encontrado un 98% de sensibilidad y un 100% de especificidad (Landa, 1988; Tsang *et al.*, 1989).

Por otro lado, la sola presencia de anticuerpos en los fluidos orgánicos no es demostración de la presencia del cisticerco sino que solamente representa que el individuo ha tenido contacto con

éste u otro organismo que presente reacción cruzada con *T. solium*. Existen pocos reportes para la investigación de antígenos de *T. solium* en el suero y LCR de pacientes cisticercosos. En la actualidad se han comenzado a desarrollar métodos que informan de la presencia de antígenos con resultados con una sensibilidad que oscila entre un 70-90% (Tellez-Girón *et al.*, 1987; Correa *et al.*, 1989). Asimismo, la detección de cisticercos vivos en individuos infectados utilizando ELISA y anticuerpos monoclonales específicos en contra de epítomos altamente representados en glicoproteínas de superficie y secretadas de *T. saginata* (Harrison y Parkhose, 1989). Sin embargo, ninguno de los métodos antes mencionados se encuentran estandarizados para suero humano y en ningún caso se han analizado las reacciones cruzadas con otros parásitos. Por otro lado, los antígenos parasitarios no son blancos ideales para tales ensayos, puesto que por definición, ellos generan una respuesta de anticuerpos y por esto son eliminados rápidamente de la circulación del huésped.

En contraste, las pruebas inmunológicas para el diagnóstico de la cisticercosis porcina y la teniasis humana que son usualmente enfermedades asintomáticas, se encuentran muy pocas desarrolladas. Por ejemplo, en la cisticercosis porcina las pruebas inmunológicas han sido poco y mal utilizadas, algunos datos indican que la seropositividad es extremadamente alta en comparación con la frecuencia detectada por inspección veterinaria (Inclan, 1980; Romero, 1980). No se ha determinado la sensibilidad, debido a que el diagnóstico ha sido confirmado en muy pocos casos, pero es probable que los métodos reportados sean de muy baja especificidad. El diagnóstico post-mortem de cerdos se realiza normalmente mediante un corte en los músculos triceps/ancóneo e inspección visual del mismo en los diferentes rastros de México (Contreras, 1989). No obstante, se sabe que un número considerable de cerdos son sacrificados clandestinamente (Aluja, 1982), por lo que el efecto de la inspección para impedir su acceso para consumo humano se ve muy disminuido.

Asimismo, el diagnóstico de la teniasis humana presenta también problemas. Puesto que no representa un problema de salud pública, no se le ha dado un impulso al desarrollo de mejores métodos. Los procedimientos para determinar huevecillos en las heces (Mazzotti, 1944; Rijpstra, 1981; Beaver *et al.*, 1984; Ash y Orihel, 1987) fueron descritos hace muchos años, ellos tienen una sensibilidad cercana al 50% (Schantz y Sarti, 1989) y han sido poco modificados. Otra dificultad para el diagnóstico de la teniasis es que los seres humanos pueden alojar tanto a *T. solium* como a *T. saginata* cuyos proglótidos y huevecillos no son diferenciables entre sí, por lo que para realizar un diagnóstico diferencial se requiere de otros materiales como el escolex o de proglótidos grávidos. Finalmente, también se han desarrollado métodos inmunológicos para la detección de antígenos de *T. solium* adulta en las heces. Se ha mostrado que algunos antígenos pueden ser detectados durante varias semanas en las heces de individuos teniásicos. Sin embargo, su utilidad es disminuida por reacciones cruzadas con *T. saginata* (Allan y Craig, 1989; Allan *et al.*, 1990).

En los últimos años, se han empezado a desarrollar nuevos métodos para el diagnóstico de la teniasis-cisticercosis, combinando el uso de: a) métodos inmunológicos con los productos de genes (proteínas recombinantes) o b) métodos de hibridación de DNA-DNA con fragmentos de DNA específicos de parásitos, obtenidos por medio de la tecnología del DNA recombinante. Asimismo, las técnicas de clonación molecular han permitido la identificación y expresión de algunos antígenos de diferentes ténidos parásitos (Bowtell *et al.*, 1984; Howell y Hargreaves, 1988; Howell *et al.*, 1989; Johnson *et al.*, 1989; Cogle *et al.*, 1991). Hasta ahora, solamente dos antígenos recombinantes han sido aplicados en el diagnóstico. Los antígenos recombinantes EM4 y II/3 de *E. multilocularis* han sido ensayados en el ELISA contra sueros heterólogos humanos, para la detección de equinococosis alveolar. El antígeno EM4 mostró una sensibilidad del 37% y una especificidad del 100% (Hemmings y McManus, 1991), mientras que el antígeno II/3 mostró una sensibilidad del 98% y una especificidad del 96% (Vogel *et al.*, 1988; Müller *et al.*, 1989).

Por otro lado, se han descrito nuevos métodos para la diferenciación e identificación de especies por medio del análisis de DNA (Ashall y Miles, 1988; Barker, 1989). En el campo de los ténidos se han descrito sondas específicas de DNA, las cuales parecen distinguir a *T. solium* de *T. saginata* y viceversa, así como a *T. saginata* o a *T. solium* de otras especies de ténidos (Harrison *et al.*, 1987; Rishi y McManus, 1987; Flisser *et al.*, 1988; Harrison *et al.*, 1988; Rishi y McManus, 1988). Cabe mencionar que los métodos de hibridación DNA-DNA potencialmente pueden desplazar a los basados en la bioquímica y la morfología.

4. VACUNACION-PROTECCION.

Diversos estudios han demostrado que los cisticercos pueden ser eliminados por mecanismos inmunes. Se puede inducir resistencia a un reto por cisticercos a través de distintos procedimientos: por una infección previa (inmunidad concomitante) o bien por inmunización con extractos parasitarios (Gallie y Sewell, 1972; Gallie y Sewell, 1974; Gallie y Sewell, 1976; Lloyd y Soulsby, 1976; Gallie y Sewell, 1981; Rickard y Brunley, 1981). La oncosfera, la membrana oncosférica y sus productos de secreción, han sido identificados como potentes inmunógenos. Sin embargo, pocos trabajos se han realizado sobre la caracterización a nivel molecular de los antígenos involucrados en la respuesta inmune (Rickard y Bell, 1971; Rickard y Bell, 1971; Rickard y Adolf, 1977; Harrison y Parkhouse, 1985).

Existe evidencia de la importancia de la inmunidad humoral en resistencia a los estadios tempranos de ténidos parásitos. Por ejemplo: La inmunidad a la reinfección y la inmunidad adquirida como resultado de la inmunización con antígenos oncosféricos han mostrado estar asociados con la aparición de anticuerpos protectores en el huésped. Asimismo, estudios de protección por transferencia pasiva de suero inmune en sistemas tales como en *T. taeniasiformis* y *T. ovis*, han mostrado que los anticuerpos juegan un papel definitivo en la inmunidad y que la oncosfera es vulnerable

al ataque inmune (Sutton, 1979; Rickard, 1977; Soulsby y Lloyd, 1982). La protección contra la infección por *T. saginata* y *T. ovis*, puede similarmente ser transferida por suero inmune a ganado vacuno y ovino neonatal, respectivamente (Lloyd y Soulsby, 1976; Sutton, 1979; Rickard *et al.*, 1977). Todo ello sugiere que la vacuna anticisticercos es una meta alcanzable.

Estudios de IET utilizando oncosferas de *T. saginata* con sueros de bovinos resistentes y susceptibles, identificaron componentes oncosferales que son reconocidos por anticuerpos de animales resistentes. Por otro lado, ratones Balb/c inmunizados con oncosferas parecen responder a los mismos antígenos. El análisis de los componentes de superficie, somáticos y de productos de excreción/secreción de oncosferas de *T. saginata*, utilizando una combinación de marcaje biosintético y de gel de poliacrilamida con SDS (PAGE-SDS), revelaron un restringido número de componentes. Anticuerpos monoclonales derivados de ratón contra los estadios oncosferales reconocen determinantes estadio específico, así como determinantes comunes sobre la superficie de las oncosferas y cisticercos. Uno de esos anticuerpos monoclonales al ser inyectado en el ganado confirió protección contra el reto con huevecillos de *T. saginata* (Harrison y Parkhouse, 1986).

Aunque las oncosferas invasivas son consideradas el blanco de la respuesta inmune protectora algunos componentes de los cisticercos son también posibles blancos. Al respecto, se han utilizado extractos de cisticercos para vacunar cerdos contra la infección causada por *T. solium* (Molinari *et al.*, 1983). Asimismo, extractos de proglótidos de *T. saginata* han sido utilizados para inmunizar ganado contra la infección causada por *T. saginata* (Gallie *et al.*, 1974). Los estudios de inmunización antes mencionados generaron la hipótesis de la existencia de dos fases de inmunidad en contra de los parásitos ténidos: la temprana y la tardía. Esta hipótesis ha sido ya confirmada; se ha logrado identificar y producir ambos tipos de inmunidad en contra de la infección causada por *T. taeniaeformis* en ratones vacunados simultáneamente con antígenos oncosferales y antígenos de cisticercos (Bogh *et al.*, 1988).

El uso de anticuerpos monoclonales dirigidos contra oncosferas de *T. saginata* (Harrison y Parkhouse, 1986), han mostrado que algunos epítopes son compartidos entre oncosferas y metacéstodos. Esto también es válido para *T. taeniaeformis*. Sin embargo, otros componentes del cisticercos pueden ser únicos (Gibbens *et al.*, 1986). Estudios recientes de los componentes de superficie, somáticos, de excreción-secreción y del fluido de *T. saginata* indican que la respuesta contra ciertos componentes del metacéstodo pueden no estar asociadas con la inmunidad (Parkhouse y Harrison, 1987; Joshua *et al.*, 1988). Por otro lado, estudios en *T. solium* sugieren que la resistencia contra cisticercos longevos pueden tener un componente celular (Molinari *et al.*, 1983). La evidencia de infecciones por *T. taeniaeformis* en ratones apunta a la existencia de un componente celular en la muerte de larvas de céstodos (Letonja y Hammerberg, 1978; Letonja y Hammerberg, 1987).

Los avances recientes en la tecnología del DNA recombinante

han traído nuevas alternativas para el desarrollo de una vacuna. Recientemente, un antígeno de *T. ovis* y uno de *T. taeniaeformis* han sido clonados y expresados. Ambas proteínas recombinantes han inducido altos niveles de protección: 75-94% de protección al reto por *T. ovis* en borregos y 90-91% de protección al reto por *T. taeniaeformis* en ratas (Johnson *et al.*, 1989; Ito *et al.*, 1991).

5. TRATAMIENTO

Hasta hace poco tiempo la única opción quimioterapéutica de la neurocisticercosis eran las drogas esteroides, que solamente controlan los síntomas y la inflamación. Por otro lado, la cirugía en algunos casos logra erradicar a los cisticercos, sin embargo, es costosa y de alto riesgo (Escobedo, 1989; Earnest *et al.*, 1987; Estañol *et al.*, 1986; Sotelo *et al.*, 1985; Willms, 1992). Recientemente se han descrito nuevas drogas con efecto cestocida tales como el Praziquantel, Albendazol, Mebendazol y el Flubendazol, con diferentes mecanismos de acción en contra del parásito (Groll, 1982; Andrews *et al.*, 1983; Escobedo, 1989; Sandoval, 1989; Tellez-Girón, 1989). El Praziquantel produce buenos resultados en el tratamiento de la neurocisticercosis, cuando el cisticerco vivo se localiza en el parenquima o subaracnoideo cortical. Sin embargo, esta droga tiene poca utilidad para el tratamiento de quistes alojados en ventrículos cerebrales, en ojo o para larvas calcificadas. En algunos casos se han presentado severas reacciones inflamatorias por lo que el tratamiento cestocida debe ser acompañado con tratamiento antiinflamatorio. Estudios recientes reportan que el Albendazol, el Mebendazol y el Flubendazol, especialmente el último, producen resultados comparables con los obtenidos con Praziquantel (Escobedo, 1989). Cabe mencionar que algunos reportes indican que los cerdos cisticercosos pueden ser tratados con Praziquantel (Flisser *et al.*, 1989).

La Niclosamida y el Praziquantel han mostrado ser efectivas en el tratamiento de la teniasis humana y en la actualidad son las drogas más usadas (Groll, 1980; Gemmell *et al.*, 1985; Escobedo, 1989; Willms, 1992). El Mebendazol y el Albendazol también han mostrado alta eficacia contra la teniasis (Groll, 1980). La Niclosamida además, no tiene contraindicaciones y puede ser usada sin riesgos aún en el embarazo (Willms, 1992; Escobedo, 1989).

6. CONTROL Y PREVENCIÓN.

La teniasis/cisticercosis causada por *T. solium* es una enfermedad comúnmente asociada con la pobreza, ignorancia, bajo nivel de educación, malas condiciones de higiene, métodos primitivos para la crianza de cerdos, así como otras condiciones ambientales y socioeconómicas. Existen un buen número de reportes científicos que dan una idea de la magnitud del problema en México y en otros países. Asimismo, se han descrito una serie de medidas para el control y la prevención, que de aplicarse sin duda producirían resultados positivos a corto plazo (Hird y Pullen, 1979; Aluja, 1982; Larralde *et al.*, 1982; Pawlowski, 1982; Flisser, 1985; Gemmell *et al.*, 1985; Willms, 1992).

- Algunas medidas propuestas son:
- a) Organizar campañas educativas a nivel nacional en especial en las áreas de mayor riesgo de contraer la infección, informando a la población de los mecanismos de infección en los humanos y el ganado, así como su prevención y su cura.
 - b) Mejorar las condiciones higiénicas del ganado porcino, para evitar su infección, así como vigilar estrictamente la salud de trabajadores que tengan contacto con este tipo de ganado.
 - c) Establecer una inspección sanitaria efectiva que permita desechar la carne de cerdos cisticercosos en los rastros.
 - d) Control sanitario de las aguas negras para evitar que al ser utilizadas como aguas de riego, contaminen alimentos.
 - e) Dotar de recursos sanitarios (agua potable, drenajes, fosas sépticas, etc.) a los centros urbanos y áreas rurales marginadas para una adecuada eliminación de las excretas.
 - f) Organizar campañas masivas para la desparasitación de los portadores de *T. solium* adulta, así como cuidar de que éstos no tengan participación en la preparación de alimentos.
 - g) Impulsar la investigación para el mejoramiento de los métodos de diagnóstico, así como para continuar con la búsqueda de una vacuna que ayude a reducir el riesgo de contraer la enfermedad.
 - h) Realizar evaluaciones periódicas y estudios seroepidemiológicos frecuentes, que vigilen el efecto de las medidas antes mencionadas.

En nuestro país, la Secretaría de Salud estableció desde 1984, el Programa Prioritario para el Control y Erradicación de la teniasis/cisticercosis causada por *T. solium* (Secretaría de Salud, Diario Oficial de la federación; 1984).

II. ANTECEDENTES

1. EL ANTIGENO B (AgB) DE Taenia solium.

La respuesta inmune de seres humanos con neurocisticercosis ha sido estudiada en diversas pruebas en las que esencialmente se enfrentan los sueros de pacientes con un extracto crudo parasitario. El ensayo de inmunoelectroforesis permitió establecer una clasificación de los antígenos detectados, de acuerdo a su movilidad electroforética (Woodhouse *et al.*, 1982). De esta manera se definieron ocho antígenos, a los cuales se les denominó con las primeras letras del alfabeto. El antígeno isoelectrico denominado antígeno B, fue el antígeno más frecuentemente reconocido (84%) por sueros de pacientes con neurocisticercosis comprobada.

El AgB fue purificado de un extracto crudo de cisticerco utilizando un procedimiento que involucra diferentes pasos de purificación, tales como: extracción y precipitación con sales, cromatografía de filtración e intercambio iónico. El AgB purificado por este procedimiento está constituido por 2 cadenas polipeptídicas (95 y 85 KDa), conteniendo aproximadamente un 12% de residuos de azúcares (Guerra *et al.*, 1982). Posteriormente se describió un método para la purificación del AgB basado en su afinidad por colágena (Laclette, *et al.*, 1990). Usando el nuevo procedimiento se demostró que el polipéptido de 85 Kda es un producto proteolítico del polipéptido de 95 KDa (Laclette *et al.*, 1989; Laclette *et al.*, 1990). Los análisis de aminoácidos de la proteína mostraron que el AgB está constituido por aproximadamente un 52% de residuos de Asp, Glu (y sus amidas), Lys y Arg. Interesantemente, cuando el AgB se incubaba en presencia de ATP precipita formando estructuras fibrosas. Esta precipitación no ha sido claramente entendida, pero no depende de la hidrólisis del ATP (Guerra *et al.*, 1982). El uso de AgB puro en ensayos de ELISA resultó en una sensibilidad similar (85%) que cuando se utiliza un extracto crudo de cisticerco para el diagnóstico de la neurocisticercosis humana (Espinoza *et al.*, 1986; Flisser *et al.*, 1984).

Además, se ha demostrado que el antígeno B no es exclusivo de T. solium; sino que se encuentra también presente en otros cestodos (Ciclofilidos, Pseudofilidos y Proteocefalidos), así como en varias especies de Tremátodos y Turbellarios. En contraste no está presente en los Phyla Acanthocephala, Nematoda y Annelida, por lo que parece estar restringido a los Platyhelminthes (Olivo *et al.*, 1988).

2. EL AgB EN LA RELACION HUESPED-CISTICERCO.

Estudios de inmunofluorescencia y de inmunoperoxidasa indirecta a nivel de microscopía óptica y electrónica, han mostrado que este antígeno se localiza en forma difusa en el tejido del cisticerco con predominancia en los citones tegumentales (Laclette *et al.*, 1987). Debido a que los citones tegumentales están involucrados en la síntesis de productos proteicos y glicoproteicos

en céstodos (Lumsden, 1966; Oaks y Lumsden, 1971; Trimble y Lumsden, 1975), se ha sugerido que el AgB es sintetizado en estas células. Estudios de cultivo *in vitro* de cisticercos, sugieren que el AgB es secretado a la interfase huésped-parásito (Laclette *et al.*, 1989). Asimismo, se ha mostrado que existe una síntesis activa de anticuerpos anti-AgB por células plasmáticas en el granuloma alrededor del cisticerco en el músculo esquelético de cerdo (Willms *et al.*, 1982; Díaz, 1983). Por otro lado, la presencia de antígenos y anticuerpos en la interfase huésped-parásito debiera resultar en la formación de complejos inmunes, los cuales conducen al desarrollo de una respuesta inflamatoria por ellos mismos, así como por la activación del sistema del complemento. Sin embargo, la presencia de un moderado infiltrado inflamatorio alrededor del cisticerco en el músculo esquelético del cerdo (Aluja y Vargas, 1988), sugiere que existen algunos mecanismos para reducir el reclutamiento de células en el granuloma.

Algunos estudios han mostrado que el antígeno B tiene la propiedad de unirse a colágena (Plancarte, *et al.*, 1982; Plancarte *et al.*, 1983, Laclette *et al.*, 1990). Además, se han aportado evidencias que sugieren que el AgB puede estar involucrado en el mantenimiento de la relación huésped-parásito (Laclette, *et al.*, 1992). Estudios *in vitro* han demostrado que el AgB es un potente inhibidor de la vía clásica del complemento a través de un bloqueo de la función del C1 (Laclette, *et al.*, 1992). También se ha demostrado que el AgB se une al C1q, que es un subcomponente del C1, que inicia la vía clásica del complemento (Laclette, *et al.*, 1992). Estos hallazgos potencialmente amplían el papel del AgB y sugieren que juega un papel inmunomodulador de la respuesta inmune del huésped. La inhibición de la activación de la vía clásica del complemento por el AgB puede no sólo permitir al cisticerco evitar daño a la membrana por el complemento (Podack, 1980), sino también disminuir el reclutamiento de células inflamatorias en la interfase huésped-parásito debido a la carencia de anafilotoxinas (Chenoweth, 1986); facilitando así la coexistencia de estos dos organismos filogenéticamente distantes (Laclette *et al.*, 1989).

Las propiedades antes mencionadas hacen del AgB un buen candidato para ser utilizado en el desarrollo de mejores herramientas diagnósticas. Asimismo, algunas de sus propiedades, tales como su actividad anticomplemento sugieren que este antígeno juega un papel relevante en el mantenimiento de la relación huésped-cisticerco, por lo que también podría ser utilizado en ensayos de vacunación, así como ensayos *in vitro* para el estudio de la relación huésped-cisticerco. Finalmente, su propiedad de unirse al C1q podría tener importancia en el desarrollo de pruebas diagnósticas de enfermedades causadas por complejos inmunes, tales como enfermedades autoinmunes y algunas enfermedades parasitarias.

III. OBJETIVO

El objetivo de este trabajo fue la clonación, caracterización y expresión del gen que codifica para el antígeno B de *Taenia solium* en *E. coli*.

IV. MATERIALES Y METODOS

1. MATERIALES

a) Materiales biológicos

i) Metacéstodos:

Los cisticercos de *T. solium* fueron obtenidos por disección del músculo esquelético de cerdos infectados provenientes de diferentes rastros oficiales de la ciudad de México. Los cisticercos fueron colectados y almacenados inmediatamente a -70°C hasta su uso.

ii) Bacterias:

Todas las bacterias utilizadas fueron de la especie *Escherichia coli*. Las cepas utilizadas fueron:

1. Y1088: $-(\text{LacU169})$, supE, supF, metB hsdR (r_k^- , m_k^+), trpR, tonA21, proC::Tn5, [pMC9-pBR322, lacIq].
2. Y1090: $-(\text{lacU169})$, $-(\text{lon})$, araD139, strA, supF, C22::Tn10, [pMC9], (r_k^+ , m_k^+).
3. C600: SupE44, thi^{cl} , leuB6, lacY1, tonA21, L- $(r_k^+$, $m_k^+)$ mcrA-,mcrB+.
4. C600hf1: SupE44, thi^{cl} , leuB6, lacY1, tonA21, L- (r_k, m_k^+) mcrA-, hf1-.
5. TG1: SupE, hsd 5, thi, $-(\text{lac-proAB})$, F'[traD36, proAB+, lacI^q, lacZ-M15].

iii) Reactivos, estuches y Enzimas.

Las endonucleasas de restricción, la RNasa, la DNasa I, la T4 polinucleótido cinasa, así como otras enzimas utilizadas fueron obtenidas comercialmente de New England Biolabs y de Bethesda Research Lab. El vector de expresión pMal-c fue obtenido de New England Biolabs. Los estuches para la realización de secuencia y la construcción de las bibliotecas de cDNA fueron obtenidos de Unites States Biochemical Corp. e Invitrogen Corp., respectivamente. La albúmina sérica bovina fracción V, el DNA de esperma de Salmón tipo III, la tripsina tipo I y las columnas de oligo(dT)-celulosa fueron obtenidos de Sigma Chemical Co. El ficoll tipo 400 y la polivinilpirrolidona de Pharmacia Inc. Las membranas de nitrocelulosa (NC) y de Polyvinylidene Difluoride (PVDF) de 0.45 um de Millipore Corp. La metionina α - ^{35}S -dATP, los isotópos α - ^{32}P -dCTP y γ - ^{32}P -ATP de Amersham Co. Todos los demás reactivos fueron de la mejor calidad disponible comercialmente.

2. METODOS

a) Métodos bioquímicos.

i) Obtención de un extracto crudo (ECI):

Los cisticercos recién descongelados fueron homogeneizados en un volumen de 5 ml de solución de extracción/gr de tejido húmedo, utilizando un homogeneizador Polytron a máxima potencia durante 1 minuto a 4°C. La solución de extracción contenía NaCl 0.15 M, $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 0.015 M, pH 7.4 (PBS), EDTA 2.5 mM, PHMB 0.04%, PMSF 0.006%, TLCK 0.1mM y leupeptin 25 ug/ml. El homogenado fue aclarado por centrifugación a 39,200 Xg durante 5 min a 4°C. El sobrenadante fue utilizado para la purificación del AgB.

ii) Purificación del AgB:

El sobrenadante del extracto crudo de cisticercos (30 ml) fue incubado con colágena polimérica de tipo I de tendón bovino, durante 1 h con agitación lenta. El material no unido a la colágena fue eluido con PBS hasta que la absorbencia a 280 nm en los lavados se acercara a cero. El material unido a la colágena fue eluido con NaCl 0.5 M en PBS y concentrado en una cámara de ultrafiltración (Amicon) usando una membrana que sólo permite el paso de proteínas menores de 30 KDa (PM30 de Amicon) y posteriormente se dializó contra PBS. Todo los pasos del procedimiento fueron llevados a cabo a 4°C (Laclette *et al.*, 1989; Laclette *et al.*, 1990).

iii) Determinación de la concentración de Proteínas:

La concentración de proteínas en las fracciones fue determinada por el método de Lowry modificado por Hartree (Hartree, 1972).

iv) Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (PAGE-SDS):

La composición polipeptídica de todas las fracciones obtenidas fue determinada en geles en placa al 7.5%, 10% y 12.5% de acrilamida, de acuerdo al método descrito por Laemmli (Laemmli, 1979). La visualización de las bandas proteicas se realizó por tinción de los geles con azul brillante de Coomassie al 0.06% en metanol 30% y acético 10%. La determinación del peso molecular de las bandas proteicas se llevó a cabo utilizando una mezcla de proteínas globulares como estándares (Bio-Rad).

v) Secuencia de aminoácidos del AgB:

Aproximadamente, 100 ug de AgB purificado por el método antes descrito fueron digeridos con 5 ug (1 ul) de tripsina tipo I al 0.5% en una solución de HCl 0.001 N a diferentes tiempos: 0.5, 1, 2, 5, 10 min (Greene y Bartlet, 1977; Smyth, 1967). Los péptidos generados fueron separados mediante una PAGE-SDS y transferidos a una membrana de PVDF de poro 0.45 um (Millipore Corp.). La membrana fue teñida con azul de Coomassie al 1% en agua destilada. Las bandas seleccionadas fueron recortadas y secuenciadas por el Dr. Alvin E. Davis (Children's Hospital, Boston, MA) en un secuenciador de pulso de fase líquida (Applied Biosystems 477A) (LeGrendre y Matsudaira, 1988; Moos, *et al.*, 1988; Matsudaira, 1987).

vi) Síntesis de oligonucleótidos:

La secuencia **QMDYDN** fue utilizada para diseñar dos mezclas de oligonucleótidos en ambos sentidos de la cadena (5'-3' y de 3'-5') y denominadas (AgB1 y AgB2), respectivamente. Los oligonucleótidos fueron preparados en un sintetizador de DNA (Biosearch modelo 8750 de Pharmacia Inc.).

b) Métodos inmunológicos.

i) Preparación de un suero hiperinmune anti-AgB.

Se obtuvo un suero hiperinmune en contra del AgB por inmunización subcutánea en conejos Nueva Zelanda de acuerdo al siguiente protocolo. Una primera dosis de 50 ug de AgB puro, homogeneizado en 250 ul de PBS y 250 ul de adyuvante completo de Freund al día uno, seguida de 2 dosis de 100 ug de AgB con adyuvante incompleto de Freund en los días 15 y 30. Los conejos fueron sangrados 7 días después de la última inmunización. Los sueros fueron obtenidos por centrifugación de la sangre coagulada a 600 Xg durante 10 min y almacenados a -20°C hasta su uso.

ii) Inmuno-electrotransferencia (IET):

La IET consistió en la resolución de las bandas proteicas de las fracciones por una PAGE-SDS. La cantidad de proteína aplicada en cada carril del gel fue variable (100, 50, 25 ug) dependiendo de cada una de las fracciones. Al finalizar la electroforesis, las proteínas resueltas en el gel fueron transferidas a una membrana hidrofóbica de PVDF o de NC con un tamaño de poro de 0.45 um. La transferencia se llevó a cabo en una cámara de electrotransferencia (Trans-blot cell, Bio-Rad), Aplicando 250 mA durante 2 hr o aplicando 1 A durante 1 hr, ambos a 4°C. La hoja de NC se incubó en una solución BSA al 3% en PBS durante 20 min o toda la noche a 4°C y se lavó en PBS durante 10 min a temperatura ambiente (t/a) con agitación suave. A continuación se recortaron los carriles de acuerdo al esquema de ensayos por realizar y las tiras recortadas se incubaron con el primer anticuerpo diluido 1:1000 en una solución de PBS-BSA, durante 1 h a t/a con agitación suave. Las tiras se lavaron 2 veces con PBS-BSA conteniendo Tween 20 al 0.3% y una sola vez con PBS. Después de este lavado, las tiras de papel se incubaron con un segundo anticuerpo caprino anti-IgG de conejo acoplado a peroxidasa diluido 1:2000 en PBS-BSA, durante 1 h a t/a. Las tiras se lavaron 2 veces con PBS-Tween 20 y una sola vez con PBS. Finalmente se revelaron en una solución que contenía 50 mg de 3, 3 diamino bencidina, 100 ul de H₂O₂ al 3% en 100 ml de PBS durante un tiempo de 5-10 min a t/a (Towbin et al., 1979).

c) Métodos de biología molecular.

i) Preparación de RNA total:

Los cisticercos (5 g) fueron reducidos a un polvo fino en un mortero en presencia de nitrógeno líquido e inmediatamente homogeneizados en un Polytron (Brinkman Inst.) a máxima potencia durante 20-30 seg a 4°C en 15 ml de una solución que contenía: isotiocianato de guanidina 4 M, Tris-HCl 50 mM (pH 7.5), EDTA 25 mM, Mercaptoetanol 1.2 M (GuSCN/ME). Al homogeneizado obtenido se

le adicionaron 0.3 volúmenes de etanol absoluto enfriado previamente a -20°C , se mezcló por inversión repetidas veces y se centrifugó a 16,000 Xg durante 5 min a 4°C . El sobrenadante fue descartado por aspiración. El precipitado fue resuspendido en 75 ml de la solución antes mencionada utilizando el Polytron durante 10 seg a un 70% de su potencia y centrifugado a 16,000 Xg durante 3 min a 4°C . El sobrenadante obtenido fue transferido a un tubo nuevo y el precipitado descartado. El sobrenadante fue precipitado utilizando 0.025 volúmenes de ácido acético 1 M y 0.75 volúmenes de etanol, mezclado por inversión varias veces, enfriado a -20°C durante 10 min y centrifugado a 7,000 Xg durante 10 min a 4°C . El precipitado anterior fue resuspendido con una pipeta Pasteur en 10 ml de una solución de: hidrocloreuro de guanidina 6 M (pH 7.5), EDTA 25 mM y 2-mercaptoetanol 0.0112 M (GuHCl/ME). La suspensión anterior fue precipitada adicionando 0.05 volúmenes de ácido acético 1 M y 0.5 volúmenes de etanol, mezclada invirtiendo el tubo repetidas veces, enfriada a -20°C durante 10 min y centrifugada a 7,000 Xg durante 10 min a 4°C . El precipitado obtenido fue redisolto en 7 ml de GuHCl/ME y vuelto a precipitar como en el paso anterior. El precipitado fue nuevamente resuspendido con pipeta Pasteur en 5 ml de GuHCl/ME y precipitado como en el paso anterior. Una vez más el precipitado fue disuelto en 3 ml de una solución de Tris-HCl 10 mM (pH 7.5), EDTA 1 mM, NaCl 0.3 M, SDS 1% (amortiguador para la unión del RNA poli-A⁺) y precipitado con 2 volúmenes de etanol, mezclado, enfriado y centrifugado como en el paso anterior. Finalmente, el precipitado obtenido (RNA total) fue resuspendido en amortiguador de unión y su concentración determinada a 260 nm (Chirgwin et al., 1979; Han et al., 1987; MacDonald et al., 1987).

ii) Obtención de RNA Poli-A⁺:

El RNA total obtenido en el paso anterior y resuspendido en amortiguador de unión fue calentado a 70°C durante 5 min y enfriado en hielo durante 5 min, antes de ser sometido a cromatografía en una columna de 1.5 ml de oligo(dT) celulosa, previamente equilibrada con amortiguador de unión. La columna fue entonces lavada con 3 volúmenes de amortiguador de unión para terminar de eluir el RNA no unido a la columna. El RNA Poli-A⁺ fue eluido con un volumen de Tris-HCl 10 mM (pH 7.5), EDTA 1 mM y SDS 0.1% (amortiguador de elución) y colectado como una sola fracción. Esta fracción fue precipitada con 90 ul de NaCl 1 M y 3 ml de etanol a -20°C toda la noche y centrifugado a 7,000 Xg durante 20 min a 4°C . El precipitado anterior fue lavado cuidadosamente con 1 ml de etanol frío, centrifugado a 7,000 Xg durante 2 min a 4°C y secado a t/a aproximadamente 30 min. Finalmente, el RNA Poli-A⁺ fue disuelto en 5-50 ul de una solución conteniendo EDTA 1 mM (pH 7.5) y almacenado en alícuotas a -70°C hasta su uso (Aviv y Leder, 1972; Taylor, 1979; Kedes, 1979; Jacobson, 1987).

iii) Traducción *in vitro*:

A 5 ul de RNA Poli-A⁺ con una concentración de 0.10 mg/ml se le adicionó un volumen igual de una solución que contenía: KCl 0.12

M, acetato de potasio 0.3 M (pH 7.2), creatina fosfato 0.03 M, Hepes 0.075 M (pH 7.2), mezcla de L-aminoácidos 0.15 mM (A, C, D, E, F, G, H₃S, I, K, L, N, P, Q, R, S, T, V, W, Y) y 15 uCi de metionina (³⁵S, Amersham Co.), así como 5 ul de lisado de reticulocitos (tratados previamente con nucleasa para abatir su RNA endógeno), creatina cinasa 50 ug/ml y hemina 0.02 mM. La mezcla anterior fue incubada 1 h a 30°C. La reacción fue terminada adicionando 2.5 ul de RNasa 1 mg/ml (Pelham y Jackson, 1976). La síntesis de la traducción fue evaluada precipitando 5 ul de la reacción con TCA al 12% y la cantidad de radioactividad incorporada fue determinada en un contador beta (Packard Tricarb 300 de United Packard Technology). Algunos productos de traducción fueron incubados con suero de conejo hiperinmune anti-AgB (1:50) y los complejos antígeno-anticuerpo fueron precipitados con 30 ul de una solución de proteína-A unida a sefaroza 4B al 50% en PBS. Los complejos inmunes precipitados fueron lavados con PBS, pH 7.4 y sometidos a una PAGE-SDS al 12.5% (Palmiter, 1973). Los geles fueron tratados para autoradiografía con PPO al 20% en DMSO, deshidratados y expuestos a placas de rayos X a -70°C durante 2 días (Laskey y Mills, 1975). Finalmente, las placas fueron reveladas para observar el patrón de las proteínas sintetizadas por el RNA Poli-A⁺ del cisticerco.

iv) Análisis tipo Northern:

El RNA (1 ug de RNA Poli-A⁺ y 10 ug de RNA total) fue sometido a electroforesis en un gel de agarosa al 1% con formaldehído al 6% y transferido a membranas de nylon (Amersham Corp), de acuerdo a las condiciones descritas por el fabricante. Al término de la transferencia la membrana fue secada a temperatura ambiente y horneada por 2 h a 80°C. La hibridación se llevó a cabo a 42°C durante toda la noche en una solución de hibridación para Northern (apéndice 4). Como sondas se utilizaron: un fragmento de un gen de actina (pAT5, Bgl II-XhoI) y el el fragmento de la región codificadora de la clona de cDNA del AgB. Los fragmentos fueron marcados con α -³²P-dCTP por el método de "Random primer" (Amersham Int. pcl.). Las membranas fueron lavadas en una solución conteniendo SSC 0.1 X y SDS 0.2% durante 30 min a 37°C, en 3 ocasiones. Finalmente la membrana fue expuesta a placas de rayos X en presencia de una pantalla intensificadora, durante 12 h a -70°C (Lehrach et al., 1977).

v) Síntesis de cDNA:

La síntesis de la primera cadena de cDNA se llevó a cabo utilizando 10 ug de RNA Poli-A⁺ en un volumen de 40-120 ul. El RNA Poli-A⁺ fue tratado con una solución de MeHgOH 0.1 M por 7 min a t/a, pasado este tiempo fueron adicionados 25 ul de agua libre de RNasas y 11 ul de 2-mercaptoetanol 0.7%, e incubado 5 min a t/a. La mezcla fue colocada en hielo y se le adicionó en el siguiente orden: 1 ul (1 ug) de oligo(dT)₁₇₋₂₁, 2 ul (25 U) de inhibidor de RNasa de placenta humana, 25 ul de amortiguador de primera cadena 10X (apéndice 4), 5 ul de 25 mM dNTP's, H₂O a un volumen final de 240 ul, 10 ul (200U/ul) de transcriptasa reversa murina RNasa H-

(BRL) y los componentes fueron mezclados a 4°C. En un tubo nuevo se colocaron 10 ul de la primera reacción y se le adicionaron 1 uCi de α -³²P-dCTP 400 Ci/ mmol; 10 Ci/ul), esta reacción fue denominada piloto. Las reacciones anteriores fueron incubadas 90 min a 37°C. Las reacciones fueron terminadas adicionándoles 10 y 0.1 ul de EDTA 0.5 M, respectivamente y colocadas en hielo. La reacción principal fue tratada con 250 ul de fenol y la fase acuosa fue precipitada adicionándole un volumen igual de NH₄OAc y 2 volúmenes de etanol, mezclada, congelada en hielo seco por 10 min y centrifugada 15 min a 4°C. El precipitado fue resuspendido en 100 ul de agua y vuelto a precipitar como antes. La mezcla anterior, así como la reacción piloto fueron colocadas a -20°C hasta su uso.

La síntesis de la segunda cadena del cDNA: El híbrido cDNA/RNA del paso anterior fue centrifugado 15 min a 4°C y el precipitado obtenido lavado con 500 ul de etanol al 80% y secado a t/a. El precipitado fue resuspendido en 33.5 ul de agua, 5 ul de amortiguador 10X de segunda cadena (apéndice 4), 2.5 ul de BSA (1 mg/ml), 1 ul de Beta-NAD+ 10 mM, 2 ul de dNTP's, 1 ul de RNasa H (1 U/ul), 1 ul de ligasa de *E. coli*, 2 ul de DNA polimerasa I (10 U/ul), 1 uCi de alfa ³²P-dCTP y agua hasta un volumen de 50 ul. Los componentes fueron mezclados e incubados 60 min a 15°C y 60 min a t/a. La mezcla de reacción fue calentada 10 min a 70°C, centrifugada brevemente y colocada en hielo. A la mezcla de reacción anterior se le adicionaron 3.5 ul de T4 DNA polimerasa (3 U/ul) y la mezcla incubada 10 min a 37°C. La reacción fue terminada adicionando 2 ul de EDTA 0.5 M. Una alícuota de 5 ul de la reacción fue retirada para ser analizada posteriormente y el resto de la reacción tratada con 50 ul de fenol/cloroformo. La fase acuosa obtenida fue precipitada como ya se describió anteriormente y colocada a -20°C, hasta su uso (Okayama y Berg, 1982; Gubler y Hoffman, 1983; Sambrook et al., 1989).

vi) Análisis de cDNA:

La radiactividad total y la radioactividad incorporada fueron determinadas por precipitación con TCA al 10%, utilizando 0.5 ul de muestra de la primera y segunda cadena de la síntesis de cDNA. Los tamaños de los productos de la síntesis del cDNA fueron analizados en un gel alcalino de agarosa al 1% (apéndice 4), utilizando fragmentos de un DNA del fago lambda digerido con Hind III y marcados con α -³²P-dCTP. Aproximadamente 100,000 cpm fueron utilizadas por pozo (Okayama y Berg, 1982; Gubler y Hoffman, 1983; Sambrook et al., 1989).

vii) Adición de Ligadores:

El cDNA con los extremos rasurados fue descongelado y centrifugado 15 min a 4°C y el precipitado lavado con etanol al 80%. El precipitado fue resuspendido en 22 ul de agua, 3 ul de amortiguador de ligasa 10X (apéndice X), 3 ul de ligadores EcoRI con un sitio interno Not I (5'-AATTCGCGCCGC-3, 1 ug/ul) y 2 ul de T4 DNA ligasa (2.7 U/ul), mezclado e incubado toda la noche a 15°C. La reacción fue terminada adicionando 2 ul de EDTA 0.5 M y tratada con 50 ul de fenol/cloroformo. La fase acuosa obtenida fue

precipitada por la adición de 0.1 volumen de acetato de sodio 2 M y 2 volúmenes de etanol, mezclado y congelado en hielo seco por 10 min, centrifugado 15 min a 4°C. El precipitado obtenido fue lavado con etanol al 80% (Okayama y Berg, 1982; Gubler y Hoffman, 1983; Sambrook *et al.*, 1989).

viii) Tratamiento con T4 polinucleótido cinasa:

El precipitado anterior fue disuelto en 12 ul de agua y posteriormente se le adicionaron 1.5 ul de amortiguador de cinasa (apéndice 4) y 2 ul de T4 polinucleótido cinasa (5 U/ul). La reacción fue mezclada, centrifugada momentáneamente e incubada por 30 min a 37°C. Después de este tiempo la reacción fue mantenida en hielo (Okayama y Berg, 1982; Gubler y Hoffman, 1983; Sambrook *et al.*, 1989).

ix) Selección del tamaño de los fragmentos de cDNA:

La reacción de la mezcla anterior fue tratada con 5 ul de RNasa en Tris-HCl (pH 8), e incubada durante 10 min a 37°C. La reacción fue cargada en un gel de agarosa al 1% en Tris-acetato (apéndice 4) y sometido a electroforesis a 5 V/cm, hasta que el colorante había migrado lo suficiente para separar la muestra (2-3 cm). El gel fue teñido con bromuro de etidio por 15 min y fotografiado en un transiluminador de UV onda corta. Se utilizaron marcadores de DNA como referencia para recortar los tamaños de cDNA seleccionados (0.5-2 Kb y 2-7 Kb).

Los fragmentos de gel conteniendo el cDNA fueron recortados en 4 a 5 pequeños fragmentos y electroeluidos con el sistema de elución GeneEluter (InVitroGen, Inc) en un amortiguador de 0.25X de Tris-acetato. Al cDNA recuperado en un volumen de 300-400 ul se le adicionó 1 ul de tRNA (5 mg/ml) como acarreador y toda la mezcla fue tratada con 350 ul de fenol/cloroformo. La fase acuosa obtenida fue precipitada con 0.5 volúmenes de NH₄OAc 8 M y 2 volúmenes de etanol, congelado en hielo seco, centrifugado 15 min a 4°C y el precipitado obtenido lavado con 500 ul de etanol 80% (Sambrook *et al.*, 1989).

x) Ligación con el vector:

El precipitado de cDNA del paso anterior fue resuspendido en 3 ul de agua, 0.5 ul de 10X amortiguador de ligasa (apéndice 4), 1 ul de brazos de fago lambda (1 ug) desfosforilados con fosfatasa alcalina intestinal (CIP) y 0.5 ul de T4 DNA ligasa (2.7 U/ul), e incubados toda la noche a 4°C (Young y Davis, 1983; Huynh *et al.*, 1985; Sambrook *et al.*, 1989).

xi) Empacamiento del cDNA+DNA fágico:

La reacción anterior fue adicionada a un extracto sonificado de fagos (GIGA II Gold Packing extract de Stratagene Cloning Systems) siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Los extractos de fagos fueron rápidamente descongelados entre los dedos y los DNAs ligados de la reacción anterior (fagos lambda gt10 y gt11 + insertos de cDNA) adicionados inmediatamente (5ul conteniendo 5 ug), e incubados por 2 h a t/a (22°C). La reacción de empacamiento

fue terminada adicionando 500 ul de SM (apéndice 4) y 20 ul de cloroformo, mezclada suavemente y centrifugada brevemente. El sobrenadante fue titulado en la bacteria huésped correspondiente (Y1090 r-, Y1088 para lambda gt11, C600 y C600 hfl- para gt10 (Young y Davis, 1983; Huynh et al., 1985; Kretz et al., 1989; Sambrook et al., 1989).

xii) Titulación de las bibliotecas de cDNA:

Una colonia de la bacteria huésped fue inoculada en 50 ml de medio TB (apéndice 4), e incubada toda la noche a 30°C. Las bacterias fueron centrifugadas 10 min a 600 Xg y resuspendidas gentilmente en MgSO₄ 10 mM a una concentración de DO₆₀₀ = 0.5. Aproximadamente 200 ul de bacterias fueron infectadas con 10 ul de solución de fagos diluida en SM (10⁻², 10⁻⁴, 10⁻⁵) a 37°C. Posteriormente, 3 ml de agar fundido a una temperatura de 48°C, fueron mezclados con las bacterias infectadas y sembradas en cajas de petri (100 mm) conteniendo medio SOBm (apéndice 4) e incubadas toda la noche a 37°C (Young y Davis, 1983; Huynh et al., 1985; Kretz et al., 1989; Sambrook et al., 1989). La eficiencia y el título de las bibliotecas se determinaron con las fórmulas presentadas en el manual de empacamiento de GIGA II Gold Packing extract (Stratagene Cloning Systems).

xiii) Amplificación de bibliotecas:

Las bacterias a una concentración DO₆₀₀ = 0.5, fueron infectadas en una relación de 600 ul de bacterias/50,000 fagos en medio líquido y sembradas en cajas de petri (150 mm) e incubadas 6-8 h a 37°C (8 cajas cada vez). Los fagos fueron recuperados de la superficie de las cajas de petri con 10 ml de SM con agitación suave toda la noche a 4°C. La suspensión de bacteriófagos obtenida fue tratada con cloroformo al 5% total, centrifugada a 600 Xg durante 5 min y el sobrenadante transferido a un tubo nuevo. El sobrenadante fue guardado en alícuotas de 1 ml con cloroformo al 3% a 4°C o en DMSO al 7% a -70°C. El título de las bibliotecas amplificadas fue determinado como se describió arriba (Young y Davis, 1983; Huynh et al., 1985; Kretz et al., 1989; Sambrook et al., 1989).

xiv) Tamizaje de las bibliotecas:

Los tamizajes se llevaron a cabo siguiendo la técnica de Benton and Davis (Benton y Davis, 1977; Kretz et al., 1989). Las bacterias fueron infectadas con los fagos correspondientes a 37°C, en medio líquido y posteriormente sembradas en medio sólido e incubadas toda la noche a 37°C, hasta la obtención de placas de lisis. Los fagos contenidos en las placas fueron transferidos a papel de nitrocelulosa. El DNA de los fagos fue fijado a las membranas por el siguiente procedimiento: El papel de nitrocelulosa con los fagos fue tratado con una solución conteniendo NaOH 0.5 M y NaCl 1.5 M por 5 min. Posteriormente la membrana fue transferida a una solución de Tris-HCl 1.5 M (pH 8) y NaCl 1.5 M, por 5 min y finalmente la nitrocelulosa fue secada en un horno con vacío a 80°C, por 2 h (Benton y Davis, 1977; Sambrook et al., 1989). El

oligonucleótido AgB2 obtenido a partir de la secuencia parcial de aminoácidos obtenida del AgB, marcado con γ - ^{32}P -dATP por el método de la T4 polinucleótido cinasa, fue utilizado como sonda (Sambrook *et al.*, 1989). La hibridación se llevó a cabo en solución de hibridación para tamizaje con oligonucleótidos (apéndice 4) a una temperatura de 37°C, durante toda la noche. Los filtros fueron lavados 2 veces con la solución de lavado (6X SSC y 0.1% SDS) por 5 min cada vez a t/a y 3 veces por 10 min cada vez a la temperatura a la que se llevó a cabo la hibridación. Finalmente los filtros, fueron expuestos a placas de rayos X (X-Omat de Kodak), en presencia de una pantalla intensificadora durante toda la noche a -70°C (Young y Davis, 1983; Huynh *et al.*, 1985; Kretz *et al.*, 1989; Sambrook *et al.*, 1989).

Los DNAs de los fagos positivos obtenidos en los tamizajes, fueron aislados y los fragmentos de las clonas fueron liberados utilizando las endonucleasas de restricción Eco RI y Not I (Sambrook *et al.*, 1989).

xv) Mapas de restricción de las clonas:

Aproximadamente 1 ug de DNA de las 2 clonas aisladas conteniendo el fragmento de cDNA de 3.6 Kb (Sambrook *et al.*, 1989), fueron caracterizados por digestiones sencillas y dobles con diferentes endonucleasas de restricción: (Bam HI, Bgl II, Hinc II, Hind III, Sal I, Pst I, Xba I, Xho I, etc). Las condiciones para cada enzima, amortiguador, temperatura, así como la relación de 1 unidad de enzima por ug de DNA fueron las recomendadas por la casa comercial.

xvi) Secuenciación de DNA:

Los fragmentos de cDNA de 3.6 Kb obtenidos por digestión con Eco RI fueron subclonados en el bacteriófago M13mp18 y 19. El DNA de cadena sencilla fue purificado a partir de las partículas virales de M13 recombinantes y utilizadas como molde en la reacción de secuencia. La reacción de secuencia se llevó a cabo por el método de Sanger utilizando el estuche de la secuencia (United States Biochemical Corp.). Las reacciones fueron sometidas a electroforesis en un gel de 0.4mm de grosor compuesto por acrilamida al 8%, bis acrilamida 0.4%, urea ultrapura 50% en Tris-Borato EDTA, a un voltaje de 1,400 a 2,000 voltios (35-40 mA) (Sanger *et al.*, 1977). Los análisis de secuencias de los fragmentos de DNA se llevaron a cabo en computadora con la ayuda de los programas contenidos en el paquete PC/Gene de Intelligenetics, Inc. y en el programa predict 7 (Cármenes *et al.*, 1989).

xvii) Amplificación del DNA por reacción en cadena de la polimerasa (PCR):

Dos oligonucleótidos específicos conteniendo el principio (posiciones 238-255 con la adición de un sitio para la endonucleasa Eco RI) y el final (posiciones 2812-2829 con la adición de un sitio para la endonucleasa Hind III) fueron sintetizados a partir de la secuencia obtenida del fragmento de DNA que codifica para el AgB en un sintetizador de oligonucleótidos (Biosearch 8750) (Fig. 17). La

amplificación del DNA que codifica para el AgB se llevó a cabo en 100 ul de reacción. La reacción contenía 5 ng de la clona de AgB (3.6 Kb), 100 pmol de cada oligonucleótido, amortiguador de PCR (apéndice 4) y 2.5 U de Taq polimerasa. Después de un ciclo a 95°C, 3 min; 40°C, 3 min; 72°C, 3 min y de 30 ciclos a 95°C, 1 min; 50°C, 3 min; 72°C, 3 min (Sambrook *et al.*, 1989). Los productos de la reacción fueron sometidos a un gel de agarosa al 1% en Tris-acetato (TAE) 1X. El fragmento amplificado (2.6 Kb) fue purificado por el método de Vogelstein y Gillespie, 1979.

xviii) Clonación de fragmentos de PCR en el vector pMal-c (New England BioLabs, 1991):

Los extremos del DNA amplificado de la clona de AgB (2.6 Kb), fueron rellenados con Klenow (Sambrook *et al.*, 1989), y digerido con las enzimas Eco RI/Hind III. El fragmento de DNA de 2.6 Kb del AgB Eco RI/Hind III fue clonado en el vector pMal-c (apéndice 2c), previamente digerido con Eco RI/Hind III y desfosforilado con CIP. La reacción de ligación se llevó a cabo con 50 ng de pMal-c, 100 ng del fragmento DNA-AgB, amortiguador de Ligasa 5X, agua a 20 ul y 1 ul de ligasa (5 U/ul) a 15°C toda la noche (Sambrook *et al.*, 1989). La mezcla de reacción fue calentada a 65°C por 5 min y enfriada en hielo.

xix) Transformación bacteriana:

Un precipitado de 50 ml de bacterias crecidas a una $D.O_{600}=0.4$ a partir de un cultivo de toda la noche diluido 1:100 de la cepa TG1, fueron hechas competentes por el método de cloruro de rubidio (Sambrook *et al.*, 1989). Las células fueron resuspendidas en 2 ml de la solución TFB (apéndice 4).

De la reacción de ligación anterior aproximadamente 10 ul fueron adicionados a 100 ul de células competentes e incubadas por 30 min a 4°C. Pasado ese tiempo, las células recibieron un choque de calor a 42°C por 2 min y fueron sembradas en LB sólido (apéndice 4) conteniendo ampicilina (100 ug/ml) e incubadas toda la noche a 37°C. Las colonias crecidas fueron resembradas en una caja conteniendo LB-ampicilina la cual fue denominada como maestra y una caja conteniendo LB-ampicilina, X-gal 80 ug/ml e IPTG 0.1 mM e incubadas a 37°C, toda la noche. Las clonas que perdieron el fenotipo Lac fueron recuperadas de la caja maestra que no contiene X-gal ni IPTG (Kellerman y ferenci, 1982; Yanisch-Perron *et al.*, 1985; Guan *et al.*, 1987; Nagai y Thogersen, 1987; Maina *et al.*, 1988; Sambrook *et al.*, 1989).

xx) Purificación del DNA plasmídico:

Se obtuvieron minipreparaciones de DNA plasmídico a partir de diferentes clonas con fenotipo Lac⁻. El DNA fue digerido con las enzimas Eco RI/Hind III para confirmar la presencia del plásmido correcto (Sambrook *et al.*, 1989).

xxi) Producción de proteínas de fusión:

Las clonas de bacterias conteniendo plásmidos recombinantes fueron crecidas a una $DO_{600}=0.4$ en 5 ml de LB-ampicilina (100

u/ml). Un ml de muestra fue centrifugado durante 2 min y el sobrenadante descartado. El precipitado de bacterias fue resuspendido en 50 ul de amortiguador de muestra para PAGE-SDS. Las bacterias restantes fueron inducidas a producir la proteína de fusión con IPTG a 0.3 mM e incubadas durante 2 h. Pasado este tiempo otra alícuota de 0.5 ml fue tomada y centrifugada como antes. El precipitado de bacterias fue resuspendido en 100 ul de amortiguador de muestra. Las muestras fueron hervidas 3 min y sometidas a una PAGE-SDS como ya se mencionó anteriormente (Kellerman y ferenci, 1982; Yanisch-Perron *et al.*, 1985; Guan *et al.*, 1987; Nagai y Thogersen, 1987; Maina *et al.*, 1988; Sambrook *et al.*, 1989).

xxii) Purificación de la proteína de fusión:

La proteína de fusión fue purificada a partir de un cultivo de 100 ml de bacterias. Las bacterias fueron centrifugadas a 600 Xg y el precipitado de bacterias resuspendido en 1 ml de agua. La suspensión fue congelada a -70°C, sonicada 10 seg en 3 ocasiones a 4°C y centrifugada a 8,100 Xg durante 10 min. El precipitado (cuerpos de inclusión) fue resuspendido en PBS pH 7.4 conteniendo EDTA 10 mM, EGTA 10 mM y PMSF 1 mM, y la suspensión centrifugada como en el paso anterior. Posteriormente, el precipitado (cuerpos de inclusión) fue resuspendido en 5 ml de amortiguador de fosfatos pH 7.4 conteniendo urea 6 M, NaCl 0.5 M, 2-mercaptoetanol 10 mM, EDTA 10 mM, EGTA 10 mM y PMSF 1 mM. La suspensión fue congelada a -70°C y sonicada 10 seg en 3 ocasiones a 4°C, centrifugada a 8,100 Xg por 10 min y el sobrenadante obtenido dializado contra NaCl 0.3 M amortiguado con fosfatos pH 7.4. El sobrenadante fue nuevamente centrifugado y la proteína de fusión purificada por el método de la colágena polimérica, descrito anteriormente. La proteína unida a la colágena fue eluida con amortiguador de fosfatos pH 7.4 conteniendo NaCl 0.5 M y concentrada por ultrafiltración.

La proteína de fusión obtenida fue incubada con el factor Xa en una relación de 1:5 (concentración) por 6-8 horas a t/a en una solución de amortiguador de fosfatos o Tris-HCl 20 mM pH 8, conteniendo NaCl 0.35 M y CaCl₂ 1mM. Una vez terminada la reacción, la mezcla anterior fue dializada contra NaCl 0.3 M amortiguado con fosfatos y pasada a través de la columna de amilosa con un volumen de cama de 5 ml. La proteína unida a la columna fue lavada con 3 volúmenes de NaCl 0.3 M y 1 mM EGTA amortiguado con fosfatos, pH 7.4. La proteína unida a la columna fue eluida con una solución conteniendo maltosa 10 mM en amortiguador de fosfatos, pH 7.4. Fracciones de 3 ml fueron colectadas y su absorbencia determinada a 280 nm. La proteína no unida y la proteína unida a la amilosa fueron dializadas contra NaCl 0.3 M amortiguado con fosfatos pH 7.4 y concentradas por ultrafiltración utilizando membranas PM<10. El contenido de cada fracción fue analizado en una PAGE-SDS (Kellerman y ferenci, 1982; Yanisch-Perron *et al.*, 1985; Guan *et al.*, 1987; Nagai y Thogersen, 1987; Maina *et al.*, 1988; Sambrook *et al.*, 1989).

xxiii) Análisis tipo Southern:

El DNA genómico de *T. solium* (10 ug) fue digerido con diferentes endonucleasas de restricción (Bam HI, Bgl II, Eco RI, Hind III, Pst I, Sal I, Xba I), siguiendo las condiciones recomendadas por la casa comercial. El DNA digerido fue fraccionado por electroforesis en un gel de agarosa 1% en TAE a 0.15 V/cm. El DNA fue visualizado con bromuro de Etidio (1ug/ul) en un transiluminador de UV de onda corta y transferido a una membrana de nitrocelulosa de acuerdo al método descrito por Southern (Sambrook et al., 1989; Southern, 1975). La hibridación se llevó a cabo a 65°C durante toda la noche en una solución de hibridación para Southern (apéndice 4), utilizando el fragmento de la región codificadora de la copia de cDNA del AgB obtenido por PCR como sonda, marcado con ³²P-dCTP por el método de "Random primer" (Amersham Int. p.c.). Las membranas fueron lavadas en una solución conteniendo SSC 2X y SDS 0.5% durante 5 min cada vez a t/a y 3 veces por 10 min cada vez a la temperatura a la que se llevó a cabo la hibridación. Finalmente los filtros, fueron expuestos a placas de rayos X como ya se menciona anteriormente (Sambrook et al., 1989).

V. RESULTADOS

1. PURIFICACION DEL AgB.

El antígeno B fue purificado por el método de afinidad por colágena como se describió anteriormente (Laclette *et al.*, 1990). La figura 6 muestra los patrones electroforéticos del extracto crudo (ECI) inicial preparado con inhibidores de proteinasas, del AgB purificado y los resultados de IET obtenidos usando anticuerpos anti-AgB. El extracto crudo obtenido en presencia de inhibidores está formado por más de 30 proteínas diferentes con pesos moleculares entre 10,000 y 200,000 (carril 1). En contraste, el material eluido de la colágena con NaCl 0.5 M presenta una banda de aproximadamente 95 kDa que constituye alrededor del 90% de la fracción (carril 2). En la IET, los anticuerpos anti-AgB, reconocen la banda de 95 kDa en ambas fracciones (carril 5). Cabe mencionar que la banda de 95 kDa coincide con la migración relativa característica del antígeno B, previamente reportada (Laclette *et al.*, 1989; Laclette *et al.*, 1990). En un experimento típico se obtuvieron 300 a 500 ug de proteína cuando se incubaron 30 ml de ECI con 2 g de colágena polimérica.

2. SECUENCIA DE AMINOACIDOS DEL AgB.

La secuencia del extremo amino terminal del AgB purificado no pudo ser obtenida probablemente debido a algún tipo de bloqueo químico en el extremo amino, por lo que se intentaron diversos tipos de hidrólisis enzimática con el objeto de obtener fragmentos a partir de los cuales se pudiera conseguir secuencias parciales de aminoácidos. La digestión del AgB (100 ug) con tripsina (2 ug) durante un minuto de incubación generó dos péptidos de 55 y 50 kDa visibles con tinción de Coomassie. El carril 3 de la figura 7A, muestra el patrón de bandeos de la tripsina de tipo I utilizada en los ensayos.

Para confirmar que los péptidos obtenidos por la digestión con tripsina provenían del AgB se realizaron pruebas de IET con anticuerpos anti-AgB. Como se muestra en la figura 7B, los anticuerpos anti-AgB reconocieron a las bandas de 55 y 50 kDa, así como a otro péptido de tamaño similar al de la tripsina (carril 4). Una vez encontradas las condiciones adecuadas para obtener fragmentos del AgB, 100 ug de AgB fueron digeridos con tripsina durante un minuto, resueltos en PAGE-SDS y transferidos a una membrana de PVDF. La membrana fue teñida con azul brillante de Coomassie y las bandas correspondientes recortadas para ser procesadas en un secuenciador de aminoácidos. La figura 8A, muestra los 18 residuos de aminoácidos del AgB obtenidos del polipéptido de 55 kDa. De acuerdo al experto en secuenciación, los cromatogramas de la secuencia de aminoácidos sugieren que la posición X, se encuentra constituida por un residuo de serina. Ninguna homología fue encontrada, cuando este polipéptido de 17 residuos fue comparado con otras secuencias de aminoácidos de la base de datos Swiss-Prot usando el programa FSTPSCAN, basado en el algoritmo FASTP de Lipman-Pearson (Lipman y Pearson, 1985).

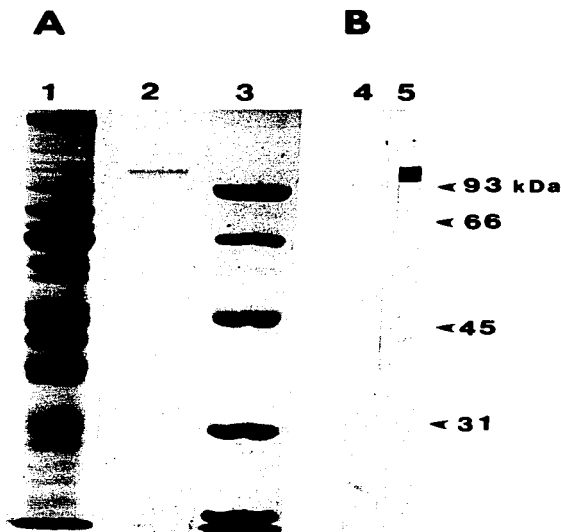


Figura 6. Purificación del AgB a partir de un extracto crudo del cisticerco de *T. solium*. **A:** Gel de poliacrilamida al 10% con SDS teñido con azul de Coomassie de 1: Extracto crudo de cisticerco, 2: Fracción unida a la colágena polimérica en presencia de inhibidores de proteínas, 3: Marcadores de peso molecular: fosforilasa B (93,000), BSA (66,000), ovoalbumina (45,000), anhidrasa carbónica (31,000). **B:** IET de la fracción unida a la colágena polimérica incubada con suero normal de conejo (carril 4) y con suero anti-AgB (carril 5).

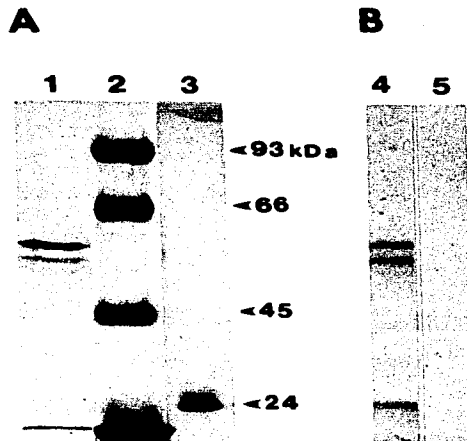


Figura 7. Digestión triptica del AgB de *T. solium*. A: PAGE-SDS 10% teñido con azul brillante de Coomassie; 1: AgB digerido con tripsina por 1 min, 2: Proteínas marcadoras de bajo peso molecular (ver figura 6), 3: Tripsina tipo I. B. IET del AgB digerido con tripsina incubado con: 4: Suero anti-AgB y 5: Suero normal de conejo. Los anticuerpos unidos fueron revelados con un segundo anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa.

La secuencia **QMDYDN** fue seleccionada para diseñar una mezcla de oligonucleótidos (Fig. 8B), los cuales fueron utilizados como sonda para aislar el gen del AgB en las bibliotecas de cDNA de *T. solium*.

3. CONSTRUCCION DE LAS BIBLIOTECAS DE cDNA DE *Taenia solium*.

a) Purificación del RNA Poli-A⁺.

La purificación del RNA total de cisticercos y del RNA Poli-A⁺ se llevó a cabo mediante procedimientos convencionales (Chirgwin *et al.*, 1979, Han *et al.*, 1987, MacDonald *et al.*, 1987) En la figura 9 se muestra una electroforesis en agarosa del RNA total y RNA Poli-A⁺ de *T. solium*. El RNA total fue purificado por el método de guanidina y el RNA Poli-A⁺ por cromatografía de afinidad usando una columna de oligo(dT). En el carril 1, se muestra un RNA purificado de hígado de ratón como control. Se observan claramente las bandas de los RNA ribosomales 18S y 28S. En el caso del RNA total de *T. solium* (carril 2) solo se observa una banda de aproximadamente de 2.8 kb en la posición que corresponde a los RNAs ribosomales 28S (4.8 kb) y 18S (2.0 kb) en Eucariotes. Además, la mayor cantidad de RNA Poli-A⁺ se encuentra entre 1.5 a 7.0 kb, a diferencia de otros RNA eucariotes en donde la mayoría se encuentra entre 5 a 10 kb (Ausubel *et al.*, 1987; Sambrook *et al.*, 1989).

La caracterización de los diferentes lotes de RNA Poli-A⁺ obtenidos, se llevó a cabo por traducción *in vitro* en un sistema libre de células y por hibridizaciones tipo Northern blot. En la figura 10 se muestran los productos de traducción del RNA Poli-A⁺. Los productos generados se encuentran en un intervalo de 10,000 a 200,000 kDa. Asimismo, para determinar si el mensajero del AgB había sido traducido, los productos de traducción fueron inmunoprecipitados con anticuerpos anti-AgB y analizados en PAGE-SDS. Como se muestra en el carril 2 (Fig. 10) se obtuvo una banda de 90 kDa que es consistente con el peso molecular del AgB. Ningún antígeno fue precipitado por anticuerpos normales de conejo. El Northern blot del RNA Poli-A⁺ del cisticerco hibridado contra un fragmento de 0.5 kb (Bgl II-Xho I) del gen de actina PAT 6 de *T. solium* marcado con ³²P (Campos *et al.*, 1990) mostró una banda de aproximadamente 1.5 kb. Este tamaño del transcrito de actina coincide con el reportado previamente (Campos *et al.*, 1990). Cabe mencionar que en los geles de agarosa en los que se corrieron muestras del RNA Poli-A⁺ del cisticerco, no se observó ninguna degradación.

b) Preparación y caracterización del cDNA.

Se utilizaron aproximadamente 10 ug de RNA Poli-A⁺ de cisticercos de *T. solium*; el objetivo era elaborar 500 ng de cDNA siguiendo el método de Gluber y Hoffman (Fig. 11). La caracterización del cDNA sintetizado (marcado con ³²P) se llevó a cabo en geles alcalinos. La figura 12 muestra la autorradiografía de los productos de cDNA sintetizados en donde se observa que el cDNA sintetizado tiene un intervalo de tamaño que va de 0.3 a 7.0

A

LSLQTQLQXLOMDYDNLQ

X= SERINA

B

1) CAA/G-ATG-GAC/T-TAT/C-GAT/C-AA

2) GTT/C-TAC-CTG/A-ATA/G-CTA/G-TT

Figura 8. A: secuencia de los 18 aminoácidos obtenida a partir de un fragmento triptico de 55 kDa del AgB, y B: Secuencia de oligonucleótidos diseñados a partir de la secuencia de aminoácidos QMDYDN.

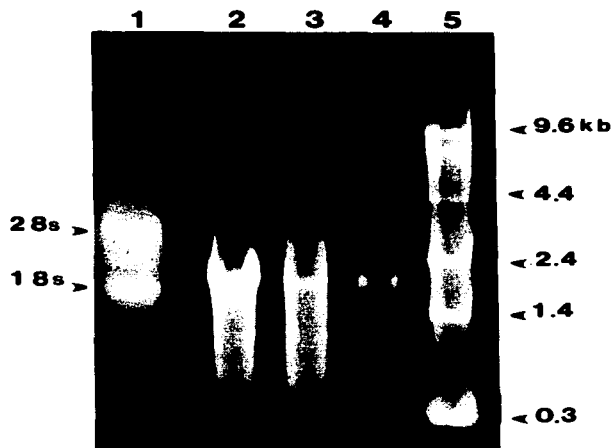


Figura 9. Purificación del RNA Poli-A⁺ del cisticerco de *T. solium* por el método de oligo(dT). Electroforesis en un gel desnaturalizante teñido con bromuro de Etidio de: 1: RNA total de hígado de ratón, 2: RNA total de *T. solium*, 3: RNA Poli-A⁺, 4: RNA Poli-A⁺⁺ y 5: Marcador de Tamaño de los RNAs. Las posiciones de los RNAs ribosomales 28S y 18S son indicadas a la izquierda del gel; los superíndices indican el número de pasajes del RNA a través de la columna de oligo(dT).

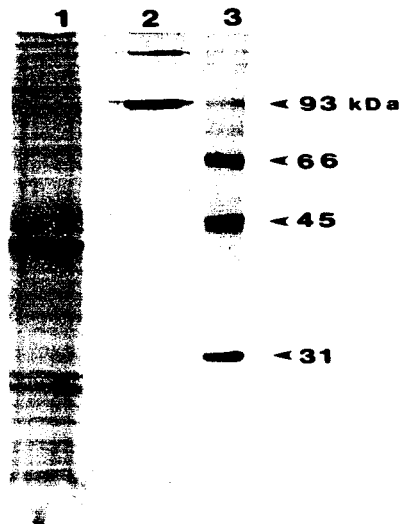


Figura 10. Fluorografía de un gel de poliacrilamida con SDS mostrando los productos generados en la traducción *in vitro* del RNA Poli-A⁺ de *T. solium*. Los productos de traducción fueron marcados radiactivamente con metionina ³⁵S en un lisado de reticulocitos. 1: Productos totales de la síntesis *in vitro*, 2: Inmunoprecipitación de productos de traducción totales con un suero anti-AgB y 3: Marcadores de peso molecular marcados con ³⁵S (ver figura 6).

SINTESIS DE cDNA

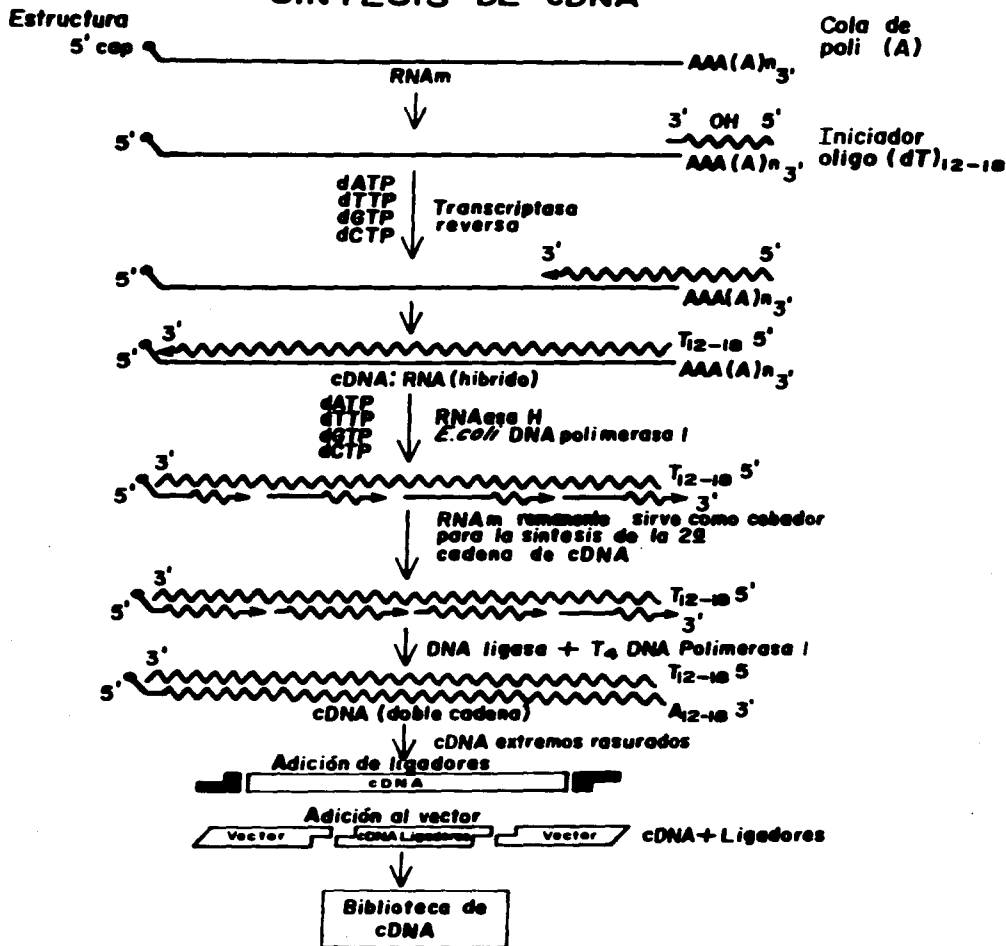


Figura 11. Síntesis de cDNA por el método de reemplazamiento de la segunda cadena (Gubler y Hoffman, 1983).

kb. Nótese la ausencia de productos de degradación en la región del gel por debajo de 0.3 kb. Los fragmentos de cDNA fueron ligados con adaptadores Eco RI con un sitio interno Not I. Para la construcción de las bibliotecas, el cDNA fue fraccionado en geles de agarosa en dos poblaciones de fragmentos con tamaños de 0.5 a 2.0 kb y de 2.0 a 7.0 kb.

c) Construcción y caracterización de bibliotecas de cDNA.

Se prepararon seis diferentes bibliotecas de cDNA. Por un lado se utilizó la población total de fragmentos (tamaños de 0.3 a 7 kb) y por el otro, se prepararon bibliotecas con fragmentos de tamaño entre 0.5 a 2 kb y con fragmentos de 2 a 7 kb. Como vectores se usaron lambda gt10 y/o lambda gt11 previamente digeridos con Eco RI y tratados con fosfatasa alcalina (Fig. 13). El DNA ligado fue empacado *in vitro* en las cápsides de fagos. Los títulos obtenidos para cada una de las bibliotecas se muestran en la tabla I. Alrededor del 60 al 70% de los fagos de todas las bibliotecas fueron fagos recombinantes. Las bibliotecas fueron amplificadas infectando bacterias *E. coli* de la cepas Y1088 (lambda gt11) y C600 (lambda gt10) en medio SOBm y sembradas en cajas de petri a 37°C durante 6 horas. Los fagos fueron colectados en medio SM y las bibliotecas amplificadas y tituladas como ya se describió en los métodos. Los títulos obtenidos para todas las bibliotecas amplificadas construidas en lambda gt10 y gt11, oscilaron en el intervalo de 2-4 X10¹⁰ y de 1-2 X10¹⁰, respectivamente.

TABLA I. Títulos de las bibliotecas de cDNA de *T. solium* construidas en los vectores lambda gt10 y gt11.

Tipo de Biblioteca	Vector lambda	Título fagos/ml
cDNA total	gt10	6 X10 ⁶
cDNA total	gt11	7 X10 ⁷
Fragmentos de:		
0.5 a 2 kb	gt10	9 X10 ⁷
2.0 a 7 kb	gt10	4.5X10 ⁷
0.5 a 2 kb	gt11	4.5X10 ⁷
2.0 a 7 kb	gt11	3 X10 ⁷



Figura 12. Autorradiografía de un gel alcalino de agarosa de los productos de la síntesis de la primera y segunda cadena del cDNA, siguiendo el método de Gubler y Hoffman, (1983). 1: Productos del cDNA de la primera cadena, 2: Productos del cDNA de la segunda cadena y 3: DNA de fago lambda digerido con Hind III fue usado como marcador de tamaño. Ambas cadenas del cDNA fueron marcadas radiactivamente con ^{32}P . El DNA del fago lambda fué marcado con ^{32}P usando polinucleótido cinasa del fago T4.

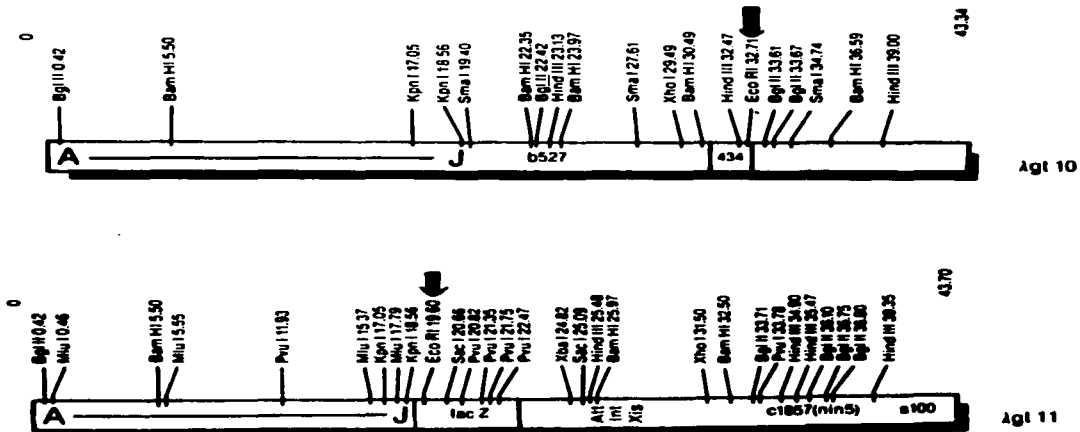


Figura 13. Mapas de los vectores de los fagos lambda gt10 (parte superior) y lambda gt11 (parte inferior). Las flechas indican el sitio único Eco RI para la clonación de fragmentos de DNA.

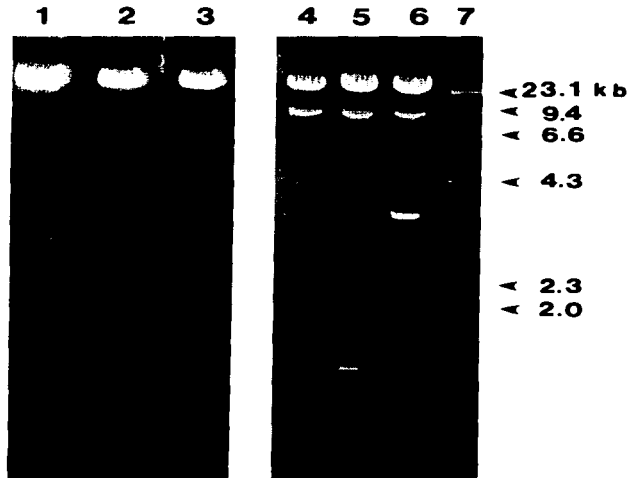


Figura 14. Gel de agarosa del DNA de los fagos recombinantes aislados en el tamizaje de las bibliotecas de lambda gt10, usando oligonucleótidos sintéticos diseñados a partir de la secuencia QMDYDN del AgB. Los insertos de los fagos fueron liberados por digestión con Eco RI. 1: Fago lambda gt10 (no recombinante), 2: Clona del grupo 1, 3: Clona del grupo 2, 4: Fago lambda gt10 (no recombinante), digerido con Eco RI, 5: Clona del grupo 1, digerida con Eco RI, 6: Clona del grupo 2, digerida con Eco RI y 7: DNA de fago lambda digerido con Hind III como marcador de tamaño de fragmentos.

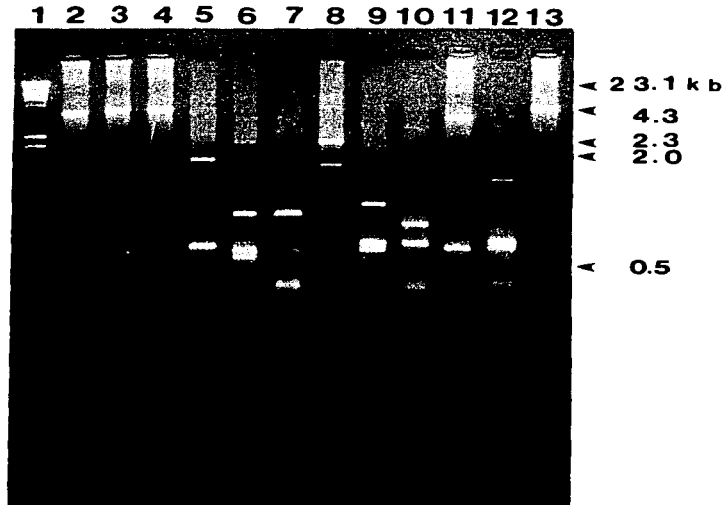


Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa de una clona completa del grupo 2 aislada en el tamizaje de las bibliotecas de lambda gt10, usando oligonucleótidos sintéticos diseñados a partir de la secuencia QMDYDN del AgB. Se muestran digestiones con diferentes endonucleasas de restricción, 2: Sin endonucleasa, 3: Bam HI, 4: Hind III, 5: Sal I, 6: Pst I, 7: Pst I/Sal I, 8: Xba I, 9: Sal I/Bgl II, 10: Hinc II, 11: Bgl II, 12: Bgl II/Hinc II, 13: Xho I y Lambda Hind III como marcador de tamaño de fragmentos en el carril 1.



0.2 Kb

ENZIMAS QUE NO CORTAN EL GEN: Bam HI, Eco RI, Hind III, Kpn I
Not I, Pvu I, Sma I y Xho I

REGION CODIFICADORA: 2591 pb

• SITIOS DE RESTRICCIÓN: UNICOS

Figura 16. Mapa de restricción de la clona del grupo 2 mostrada en la figura 15.

4. TAMIZAJE DE LA BIBLIOTECA DE cDNA CON FRAGMENTOS DE TAMAÑO SELECCIONADO DE 2 A 7 kb EN LAMBDA gt10.

Puesto que se pretendía conseguir clonas conteniendo la secuencia completa del AgB, se decidió utilizar la biblioteca de fragmentos mayores a 2 kb. Además, como se planeaba llevar a cabo el tamizaje utilizando sondas de DNA se eligió la biblioteca construida en lambda gt10. Los oligonucleótidos diseñados a partir de la secuencia QMDYDN obtenida por digestión parcial de AgB fueron utilizados en el tamizaje. Se obtuvieron 6 clonas a partir de 60,000 fagos recombinantes ensayados. Finalmente 4 clonas fueron escogidas para su caracterización.

Para determinar el tamaño de los insertos en las 4 clonas y además probar los sitios de ligación, se realizaron digestiones con Eco RI y Not I (sitios contenidos en los adaptadores). También, se realizaron ampliificaciones de los insertos por PCR utilizando como iniciadores, oligonucleótidos diseñados a partir de las secuencias que flanquean el único sitio Eco RI en lambda gt10. El análisis de los productos de PCR (resultados no mostrados) y de la digestión del DNA fágico con Eco RI (Fig. 14) y Not I mostró que había un grupo de clonas con insertos de 3.6 kb (2 clonas) y otro grupo con insertos de 0.5 kb (2 clonas).

5. MAPAS DE RESTRICCIÓN.

La figura 15 muestra un gel de agarosa en el que se corrieron muestras de un fragmento de 3.6 kb después de ser tratado con algunas endonucleasas en digestiones sencillas y dobles. Por ejemplo, digestiones con Bam HI, Eco RI y Hind III no produjeron ningún corte en los insertos. A partir de resultados obtenidos en experimentos similares se elaboraron los mapas de restricción de los insertos de las dos clonas de 3.6 kb (Fig. 16). Los insertos produjeron mapas de restricción similares, por lo que los 2 fueron subclonados en fagos M13mp 18 y 19 para su secuenciación.

6. SECUENCIA DEL AgB.

Las secuencias nucleotídicas de las 2 clonas de 3.6 kb resultaron idénticas (Fig. 17). El análisis computacional mostró la presencia de un marco abierto de lectura que comienza en el codón ATG en la posición marcada como 1 y que continua hasta la posición 2591, donde se encuentra el codón de terminación TAG. La estructura primaria y secundaria de la secuencia de aminoácidos deducida a partir de la secuencia nucleotídica indicó que la proteína consiste de 863 aminoácidos (Fig. 17), con un peso molecular 98,579 y un punto isoelectrónico de 5.0. Estos resultados son consistentes con las características previamente descritas del AgB (peso molecular de 95,000 y punto isoelectrónico de 5.1 a 5.3). La secuencia obtenida del péptido triptico del AgB corresponde a las posiciones 238 a 256 de la secuencia deducida a partir del cDNA, con excepción de la posición 246 en donde se encontró una serina en lugar de glutamina (Fig. 17). La identidad de la proteína codificada en el marco abierto de lectura y el AgB, se refuerza al comparar el contenido de aminoácidos reportado para el AgB con el deducido a partir del

CTCTCCAGCTTTTGATCCCTCTGCCAACGGTTTGTC

1 TTCTTCCAATAGACTCGAACCGGTGTAACTTTCGAATTTCCCTGTGACTGCTTTGACTAGGAAAGAAATTTCTGAGCGGTGCGATTCAAATTTGAGAATC
 CGGTCCGTTTCTGACTTTCGAATCTACTTCACGCCACACCAACCAATCCATTCGGCCAGCTGCCGTGATTCACACCAAAAACGGGACCTTACAGAGACGGAAGC
 1 ATCTCTGATGACGGTCAAATTTCTGTACCATCATACGCCGGACTCCCAAGTCTGTTGCACTTGAGAGTCCGCTACGAGAACTGGAGGACCGTCT
 NS ESNV RST I S R G T I S I R G G T E P S T E S V R E I L D L L 34
 101 CGATCTTGAGGCGAGATCGTCCGGTCCGGGCTGAACCCAATGCCAACGAGATGAGCATTCAGCTGGACCATGCTGCTGAACCTCTTGCAAGTATGAGTGGTA
 D L E R D A R V R A E R N A E N S I O L D T M A E R T L D G E T L S G 67
 201 CTTCCTCTCAGACTCAGGATGCTATCCGCCGTAAAGGATATGGAGATCTCGAAGACTGCCGAAGGATCGGAAATGCCAACGCTGTTTCGAAACTCCGCCAG
 T S S O T H D A I R R K D M E I S K L R K D L E N A N A A F T A E A E 101
 301 GCCACTCTGCCCGCAAACACACACACTGCTCCGAGATCTCCAGCGAGGTGAGAATTTGCAGAACGAGAGCGGACGGAGAGAAAGCCAGGACCA
 A T T S E N T S I E R K S A L E S Q L O D D K R A W D E A R 101
 401 CECTCATGCTTGAATCGATAACGTTCTTCGTCACCTTGATGGCCTTTAAAGGCCAAGGCTCAGCCGGAGAGCAACTCGAGGCGTTGGACAGCCAGTGA
 L M L E I D N V L G L O D G A L K A K A S A E S K L E G L D S G L 168
 501 CGCGCTTGAAGGCGTACCCAGCAGATCTCAACGCCAAATGCCGAGCTAACTCTGCCAAGTCCGCTTTGCCCCGAGAGAATTCGAAATGGTTCGGCTA
 T R L K A L T D L O L R Q M A D A N S A K S R L A A E N F E L L V R V 202
 601 AATCAGGAGTATGAGCACAAGTTCGTCACTTCTCTAAGACAAGAGGCCGCTCTGAAAGCCAGCTGGATGACCTTAAACGGGCGCATGGATGAGATGACG
 N G E A G V V T F S K T K A L E S Q L O D D K R A W D E A R 236
 701 CAATCGCTTAAGCTTCAACACAGTGTGCGAGTTCGAAATCGACTACCAACCTGCAGCAGCTGCAGGAGGAGGCGAGGCGAGCCGGAATCTGC
 N R L S L Q T L O M D Y D M L Q A R V E E A E A A G N L 269
 801 GCAACCAAGTTGCAAAATTCACGCCGATATGGCTGCCCTCAAGACCCGCTTGTAGAGAGAATTTAGCCCAAGACTGAAGAGTTTGAAGAATCAACCC
 R N O V A F M A D M A A L K R A L E R L M A K T E F E F E L K R 303
 901 AAGCTGACTGTTCGCAATCCAGGATTTGGAGGATATGGCTGAACTGAGCCGACTCGTCCCAACCACTGGAGGAGGAGCAAGTTCAGCTGACTTGTGAGAT
 K L T V R I T E L D M A E N E R T R A N M L E K T C K V L I 337
 1001 CAAGGATCTACAGGCTGAGAAGCAGGCGTTGGCAGAGAAATGGAGAGTTAACCGATCGGGGCAACGAGGAGAGATTTAACTAGCTGACGCGGCTC
 K D L Q A E N E A L A E N G E L T H R A N E A N L A M E L R 370
 1101 GAATGACGAGATGACAGTGGAAATCAACACCCCTCAACTCGGCCAACAGCGCTCTAAGAGGGGCAACATCGCCCTCGAGGGGCGAGGTGGGACCTCACC
 R I D E N T V E I N T L N S A N S A L E A D M N R L K G O V G D L 404
 1201 GACCGCATGCCAATCTCGACCCGGAAACCCGCAACTTGGCGATCAACTGAAGGAGACGAAATGACCCCTGGGTATGCGAATCTGCGACTGACCGATT
 D R L D E R T E R G D L R E T H S A R L K R E T I S E L E 438
 1301 GGAGGCGCTGAGCAGCTTGGAGCGAGGCTGACAACCTCCGCTCTGCTCCATGATGCTGAGAGGCGCTGAGGAGATGGAGCGGAATGACTGCTG
 E A L R S Q L E A E R D H L A S A L H D A E A L K E M E A K Y V 471
 1401 CCTCGAGAAAGCTCTTAATCACTCAAGTCGAGATGGAAACAACCTGCTCGGTGAGAGGAGCAGGAACTGGAGAATTCGAAAGAGCAGCAGCTCCGAC
 A S O M A L N H L K S E M E O R L R E K D E E L E N L R K S T T R T 505
 1501 ATTGAGGAGTGTGACAACTCCATCTCAGATGAGGAGTTCGCTCAAGTGGATATGCTCGCTCTGAAGAAGAAGTACGAGGGCAGCAATCAGCGAGTGA
 I E E L V T T I S E R V R F T S R L K R E T I S E L E 539
 1601 GGTGCAACTGAGCTGGCGAAGCGCAAGCTCAACCTCAACCGGAGAACACCCCTGCTCAACCGAGTTCAGAGCTGCGAGCTCGCTTGGAGGAG
 V Q L D V G K A A N V N L N R E N K T L A O R V O E L G A G G T 572
 1701 AGCCAGAGCTCGCGAAGCTCAGAGAGCAACTTCGAGTGTAGCGAGCGCAACCCATCGCCCTTGCCTTCGGAAGTGAAGAGATTTCGAGCAGCACTGGAA
 E R R A R E A A E S N L O V S E R K R I A L A S E V E I R S Q L E 606
 1801 CTCACTGACCCGCTCCGAAACCCGAGTCCGAACTCAACGATGCCAATGGAGCTATCTCGGAGCTCACTTATCCGTCAACACTCTTACCAATGACAA
 L D C G A T T G A A G G C A T T G C C T C A G T C G A G G G G A T C T C A T A G G C C T C A A T G C C G C A A G G T T G A G A T A G A C T G C T G A A C C G T G
 1901 A C T C G A C T T G A A G G C A T T G C C T C A G T C G A G G G G A T C T C A T A G G C C T C A A T G C C G C A A G G T T G C G A G A T A G A C T G C C G T G A A C C G T G
 R R L E G D I G V M O G D I D E A V N A R K A E D R A D R L N A 673
 2001 AGGTACTCCGCTGGCTGATGAGCTGCCAGGAAACAAGAAATACAAGGCTGCTGAGACTCTGCCCAAGCAGCTGAGATCGGATCGGATGAGTACCG
 E V L R A L E R L O A E L R K R A E T L R K O L E I R E I R E I T 707
 2101 GTCAGTGTGAGGAGGCTGAGGCTTTCCTACTCTGTGAGGCTCCCGGTATGGTTCAAAGCTCCAGNATCGGGTGAAGGAGCTTGAAGGCGAGCTGGAGCG
 V K L E E A E A E F T A T R E G R F M N V O K L O N R V R E L E A D V D G 741
 2201 AGAAATCTGCTCCGCGCAAGAGGCTTCCGCAACCGCCGCAATACGAGCGCTCAATCAAGGACTCCAGACAGGAGGATGATTAACAGCATGATT
 E R K Y E D F S L O G S F D K R S I 774
 2301 TGGACTCTCAAGACTCTGACAGCACTCAGATCAAGTGAAGGCTCAACAACGCTGAGCTTGAAGGACAGGAGGCTGCTCAGCTGACGATGACCAAG
 L E L O D L D L K T O I K M K A Y K R O L E E A E A G V S A T T M S K 808
 2401 TACCCTAAGGCGCAGCAACAGATTGAGGAGGCGGAACATCGTGCAGATGGCGGAGAGGAGCATCACCAATTAAGAGGCAAAATTTGGTGGACCCGGTCCCG
 Y R K A G O Q I E A E A H R O M A E R T I T I K R G I A C T G P G S R 842
 2501 CGCCCTTTCCGGTGTTCGGAGATCAACAGTCTCCCGGTAAACCGTCAACCAACATCATETTTATGTGCTTCAAAGGCGAGACTCGTGACTTTTT
 A V S I N S V S R G N R A T S I N - 863
 2601 TAGCCCTTATCC /APPROX. 0.85 kb

CCTTTGTCAAATTCGGCTTTTCTTCTCTCTCCACCATCGTCCGTTCTTCCCTTACCTGAACTGCTCTGCCGCCACAGAACTCTAGGGTCTTTTCT
 CTACACTGCTACCACCTTAAGCGGCTTCTTGGCTTCGACTGCCAGTTTGCCEACCTCTTCCCTATTCAGTTTGGCTTTATTTGAATGCTCTCT
 GCTGCCAATCAATCAACACCCTGCCACCAACCGTCCACTACCACCTCTGAGTGTATGTTTATGATTTAGAAATGTTTCAGAAAAAATAAAAAA

Figura 17. Secuencia nucleotídica (2591) y de aminoácidos de la región codificadora de la clona de cDNA del AgB (863 aminoácidos). El codón de iniciación (ATG), el de terminación (TAG), así como la región homóloga a la secuencia QMDYDN se muestran en letras oscuras y subrayados. La región utilizada para diseñar el oligo 5'(bases 238-255) y el oligo 3'(bases 2812-2829), para amplificar la región codificadora, se muestran en letras oscuras.

cdNA (Tabla II). Cabe hacer notar la ausencia total de cisteínas en la proteína deducida, lo que indica que el plegamiento de esta proteína no es mantenida por puentes disulfuro.

La figura 18 muestra el análisis de la secuencia deducida, éste indica que alrededor del 85% de la proteína se estructura en α -hélice. Exceptuando los XX residuos en el extremo amino terminal y los YY en el carboxilo terminal, la secuencia deducida presenta las unidades repetitivas de 7 y de 28 aminoácidos que son características de α -hélices superenrolladas (α -helix coiled coil), tales como las de cadenas pesadas de miosina, las de paramiosina y tropomiosina (Parry, 1975; McLachlan, y Karn, 1982; Lanar *et al.*, 1986; Phillips *et al.*, 1986; Kagawa *et al.*, 1989; Cohen y Parry, 1990; Limberger y McReynolds, 1990). Además, la ausencia de una secuencia líder para secreción es congruente con resultados de otros análisis computacionales (Cármenes *et al.*, 1989) que sugieren que no existe ningún dominio claramente hidrofóbico (según el método de Kyte & Doolittle, 1982), característicos de proteínas de membrana. En contraste, la secuencia deducida posee grandes dominios hidrofílicos a lo largo de toda la molécula (según el método de Janin, 1978 y de Emini, 1985), reforzando la idea de que se trata de una proteína estructural. Otros resultados del análisis de la secuencia deducida es la presencia de 2 sitios potenciales de glicosilación del tipo unido a N "N-linked" (Asn-XXX-Ser/Thr) en los residuos 556 y 788 (Garnier *et al.*, 1978).

El fragmento total de cdNA de 3.6 kb tiene una composición de bases de: A = 27%; T = 19%; G = 27.8% y C = 25.6%. La figura 19 muestra la comparación en el uso de codones entre dos genes de actina (Campos *et al.*, 1990) y el del AgB, que son los tres genes de *T. solium* para los cuales se tiene la secuencia completa. Las preferencias en el uso de codones de las actinas son diferentes de las preferencias en el AgB.

7. HOMOLOGIA DEL AgB CON LAS PARAMIOSINAS.

En la figura 20 se muestra una comparación de la secuencia de aminoácidos del AgB con las secuencias de las otras paramiosinas previamente reportadas: *Caenorhabditis elegans* (Kagawa *et al.*, 1989), *Piroplaria immitis* (Limberger y McReynolds, 1990), *Schistosoma mansoni* (Laclette *et al.*, 1991) y *Drosophila melanogaster* (Vinos *et al.*, 1992). El AgB tiene una homología del 75% con respecto a la paramiosina de *S. mansoni* y de un 32.5%, 34.2%, 35.7% con las paramiosinas de *C. elegans*, *P. immitis* y *D. melanogaster*, respectivamente. Como se mencionó arriba, todas ellas presentan unidades repetitivas con aminoácidos cargados en las posiciones e y f, y residuos apolares en las posiciones a y d. Por ejemplo, en el AgB, la leucina ocupa el 47% de las posiciones d y el 40% de la suma de las posiciones a y d, en las unidades repetitivas de 7/28 residuos. Además, el AgB contiene 21 leucinas en las posiciones 15 de las 29 unidades repetitivas de 28 residuos. Además, los residuos de leucina y de ácido glutámico, constituyen el 51.5% de los 163 residuos conservados en todas las paramiosinas (Fig. 21).

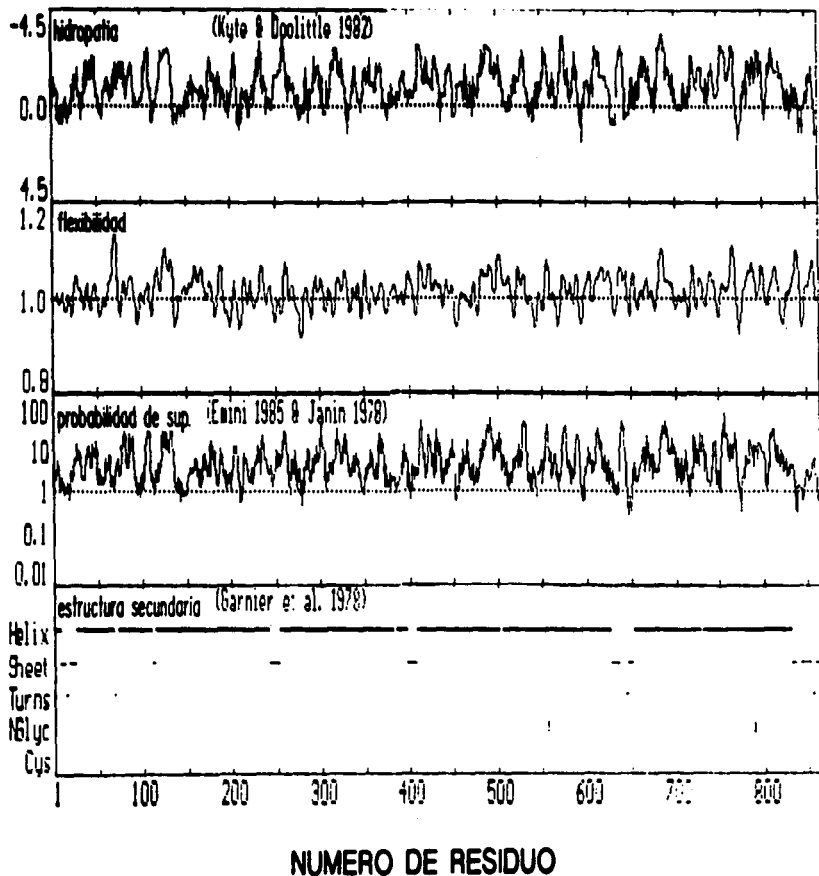


Figura 10. Análisis estructural de la secuencia de aminoácidos del AgB, realizado con los programas de PC/Gene de Intelligenetics, Inc. y Predict7 (Cármenes *et al.*, 1989).

Codon	pAT5	pAT6	AgB (TPmy)
TAT Tyr	(1) 0.3%	(2) 0.5%	(1) 0.1%
TAC Tyr	(14) 3.7%	(13) 3.5%	(8) 0.8%
TAA ---	(1) --	- -	(0) 0.0%
TAG ---	(0) 0.0%	- -	(1) 0.1%
CAT His	(2) 0.5%	- -	(6) 0.6%
CAC His	(7) 1.9%	- -	(7) 0.7%
CAA Gln	(1) 0.3%	- -	(25) 2.6%
CAG Gln	(12) 3.2%	- -	(27) 2.8%
AAT Asn	(1) 0.3%	- -	(21) 2.2%
AAC Asn	(8) 2.1%	- -	(34) 3.5%
AAA Lys	(3) 0.8%	(2) 0.5%	(14) 1.4%
AAG Lys	(16) 4.3%	(17) 4.5%	(46) 4.8%
GAT Asp	(7) 1.9%	(9) 2.4%	(27) 2.8%
GAC Asp	(14) 3.7%	(12) 3.2%	(31) 3.2%
GAA Glu	(8) 2.1%	(6) 1.6%	(40) 4.2%
GAG Glu	(20) 5.3%	(22) 5.9%	(83) 8.7%

Codon	pAT5	pAT6	AgB (TPmy)
TTT Phe	(1) 0.3%	- -	(5) 0.5%
TTC Phe	(12) 3.2%	- -	(10) 1.0%
TTA Leu	(0) 0.0%	- -	(2) 0.2%
TTC Leu	(3) 0.8%	- -	(17) 1.7%
CTT Leu	(1) 0.3%	- -	(25) 2.6%
CTC Leu	(15) 4.0%	- -	(21) 2.2%
CTA Leu	(1) 0.3%	(0) 0.0%	(9) 0.9%
CTG Leu	(8) 2.1%	(9) 2.4%	(39) 4.1%
ATT Ile	(1) 0.3%	(2) 0.5%	(14) 1.4%
ATC Ile	(24) 6.4%	(23) 6.1%	(21) 2.2%
ATA Ile	(1) 0.3%	- -	(2) 0.2%
ATG Met	(16) 4.3%	- -	(24) 2.5%
GTT Val	(4) 1.1%	- -	(14) 1.4%
GTC Val	(8) 2.1%	- -	(12) 1.2%
GTA Val	(3) 0.8%	(2) 0.5%	(3) 0.3%
GTC Val	(9) 2.4%	(10) 2.7%	(10) 1.0%

Codon	pAT5	pAT6	AgB (TPmy)
TGT Cys	(0) 0.0%	- -	(4) 0.4%
TGC Cys	(5) 1.3%	- -	(2) 0.2%
TGA ---	(0) 0.0%	- -	(3) 0.3%
TGG Trp	(4) 1.1%	- -	(0) 0.0%
CGT Arg	(13) 3.5%	(14) 3.7%	(28) 2.9%
CGC Arg	(5) 1.3%	(4) 1.1%	(39) 4.1%
CGA Arg	(0) 0.0%	- -	(11) 1.1%
CGG Arg	(0) 0.0%	- -	(6) 0.6%
AGT Ser	(0) 0.0%	- -	(6) 0.6%
AGC Ser	(5) 1.3%	- -	(18) 1.8%
AGA Arg	(0) 0.0%	- -	(4) 0.4%
AGG Arg	(0) 0.0%	- -	(4) 0.4%
GGT Gly	(15) 4.0%	(16) 4.3%	(8) 0.8%
GGC Gly	(14) 3.7%	(12) 3.2%	(7) 0.7%
GGA Gly	(0) 0.0%	(3) 0.8%	(8) 0.8%
GGG Gly	(2) 0.5%	(0) 0.0%	(1) 0.1%

Codon	pAT5	pAT6	AgB (TPmy)
TCT Ser	(7) 1.9%	- -	(11) 1.1%
TCC Ser	(8) 2.1%	(9) 2.4%	(12) 1.2%
TCA Ser	(3) 0.8%	(2) 0.5%	(8) 0.8%
TCG Ser	(4) 1.1%	- -	(11) 1.1%
CCT Pro	(8) 2.1%	(6) 1.6%	(1) 0.1%
CCC Pro	(6) 1.6%	(8) 2.1%	(3) 0.3%
CCA Pro	(4) 1.1%	- -	(2) 0.2%
CCG Pro	(1) 0.3%	- -	(2) 0.2%
ACT Thr	(8) 2.1%	- -	(17) 1.7%
ACC Thr	(11) 2.9%	- -	(17) 1.7%
ACA Thr	(2) 0.5%	- -	(9) 0.9%
ACG Thr	(3) 0.8%	- -	(9) 0.9%
GCT Ala	(8) 2.1%	- -	(33) 3.4%
GCC Ala	(7) 1.9%	(8) 2.1%	(34) 3.5%
GCA Ala	(5) 1.3%	(4) 1.1%	(15) 1.5%
GCG Ala	(7) 1.9%	- -	(19) 1.9%

Figura 19. Comparación del uso de codones en los 3 genes secuenciados de *T. solium*: AgB=TPmy y los genes de actina pAT 5 y pAT 6 (Campos *et al.*, 1990). Los números entre () indican el número de veces que se encuentra el codón en la secuencia de DNA del gen. Los números con el % indican el uso de cada uno de los codones en la secuencia del DNA del gen. Los guiones indican igualdad en el uso de codones.

CANTIDAD DE AMINOACIDOS ESTRUCTURA DE α HELICE

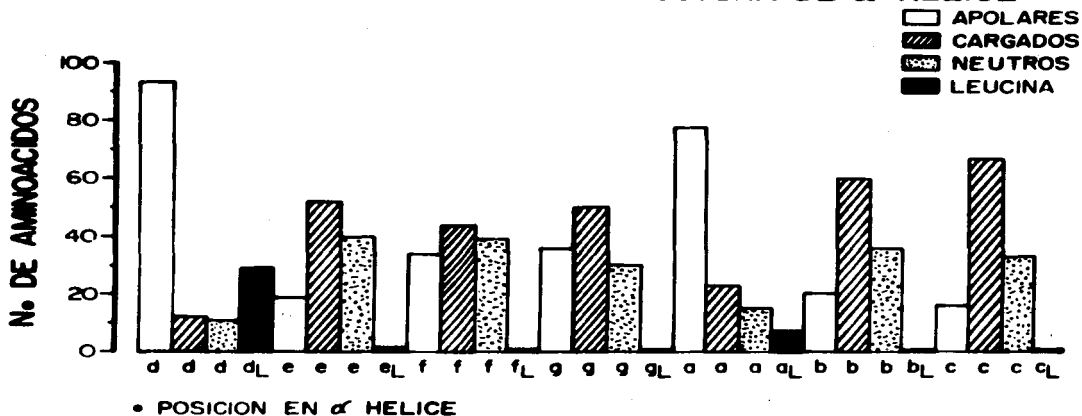


Figura 21. Histograma del número de aminoácidos cargados, apolares, neutros y de leucinas en cada una de las 7 posiciones de la estructura de repetición de 7 aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de la TPay.

Las propiedades hasta aquí mencionadas, así como la identidad inmunológica reportada anteriormente (Laclette, *et al.*, 1991) demuestran que el AgB es la paramiosina de *T. solium* (TPmy). En consecuencia, a partir de aquí ambos términos (AgB y TPmy) se utilizarán indistintamente.

Tabla II. Comparación de la composición de aminoácidos del antígeno B nativo y de la secuencia de aminoácidos deducida de la secuencia del cDNA de la TPmy.

Codigo AA		moles %	
		AgB*	TPmy
A	Ala	11.9	11.3
R	Arg	9.7	9.9
C	Cys	-	0.0
G	Gly	2.7	2.4
H	His	0.7	1.0
I	Ile	2.7	3.7
L	Leu	12.7	12.0
K	Lys	7.2	6.6
M	Met	2.2	2.6
F	Phe	0.7	1.0
P	Pro	0.0	0.4
S	Ser	5.2	6.1
T	Thr	5.2	5.3
W	Trp	-	0.0
Y	Tyr	0.7	1.0
V	Val	3.5	4.2
N	Asn		6.0
D	Asp		6.3
	AsX	12.58	12.3
Q	Gln		6.0
E	Glu		13.0
	Glx	22.0	19.0

Datos:

- No determinado
- * Tomado de Guerra *et al.*, 1982.

8. CONSTRUCCION DEL PLASMIDO RECOMBINANTE PARA EXPRESION DE PARAMIOSINA RECOMBINANTE RTPmy.

El fragmento de cDNA que codifica para la TPmy fue amplificado por PCR utilizando como molde el DNA fágico de una clona de 3.6 Kb y como iniciadores a dos oligonucleótidos conteniendo el principio y final de la secuencia codificadora del gen (Fig. 17). La adición de los sitios para las endonucleasas Eco RI (extremo 5')/Hind III (extremo 3') en los oligonucleótidos, permitió su digestión con las mismas endonucleasas. Como vector se utilizó pMal-c previamente digerido con Eco RI/Hind III. En pMal-c el producto recombinante se expresa como proteína de fusión con una proteína que se une a maltosa. Esta fracción que se une a maltosa permite la purificación por afinidad, de la proteína de fusión en una columna de amilosa. Posteriormente, la proteína recombinante puede ser liberada por digestión con factor Xa, que es una esterasa sérica que reconoce una secuencia de cuatro aminoácidos (ile-glu-gli-arg) que unen a la proteína recombinante con la que se une a maltosa (ver los detalles del vector en el apéndice 3). Para facilitar la ligación del fragmento en el plásmido pMal-c, a los oligonucleótidos que se usaron de iniciadores, se les adicionó una secuencia con sitios para Eco RI en el extremo 5' e Hind III en el 3'. El fragmento de 2.6 kb obtenido en la PCR fue tratado con Klenow y posteriormente digerido con Eco RI/Hind III y ligado a pMal-c (Fig. 22). Después de la transformación de las bacterias con el plásmido recombinante, seis clonas seleccionadas al azar, fueron escridas en cultivos líquidos e inducidas a expresar la proteína de fusión con IPTG.

9. EXPRESION Y PURIFICACION DE LA TPmy RECOMBINANTE.

Para determinar si las clonas seleccionadas expresaban una proteína con un peso molecular consistente con la proteína de fusión (140,500 - 98,5 TPmy + 42,000 MBP), se realizaron PAGE-SDS de extractos crudos de las bacterias transformantes, obtenidas antes y después de la inducción con IPTG. De esta manera se obtuvieron dos clonas (Vd2-14 y Vd2-15) que expresaban grandes cantidades de la proteína recombinante. En la figura 23 se muestra el análisis por PAGE-SDS de las fracciones obtenidas durante la expresión y purificación de la TPmy recombinante usando la clona Vd2-14.

En primer lugar, se encontró que la clona Vd2-14 expresaba una proteína de 140 kDa (que constituye alrededor del 40% de la proteína total bacteriana), al ser inducida con IPTG. Esta proteína de 140,000, se obtenía en la fracción correspondiente a los cuerpos de inclusión bacterianos, en los que comúnmente se acumulan las proteínas recombinantes expresadas en altos niveles. Para solubilizar la proteína de los cuerpos de inclusión fue necesario utilizar urea 6 M y otros agentes disociantes. Después de dializar la fracción en contra de un amortiguador de fosfatos, pH 7.4 conteniendo NaCl 0.3 M se realizaron ensayos de purificación por afinidad a una columna de amilosa, para aprovechar la propiedad de unirse a maltosa en la proteína de fusión. Desafortunadamente, la proteína de fusión no era retenida en la columna de amilosa, lo

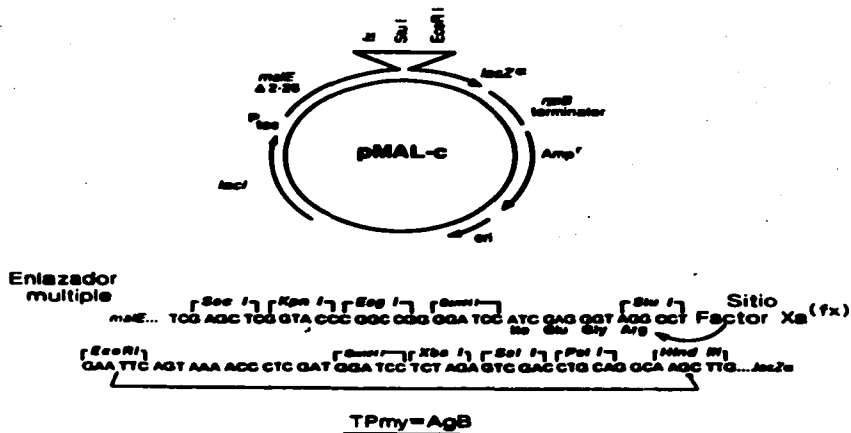


Figura 22. Representación esquemática de la construcción para expresión del fragmento de DNA que codifica a la paramiosina de *T. solium*. El fragmento de 2.6 kb fué insertado en los sitios Eco RI/Hind III del gen maeE (que expresa la MBP), en el vector plasmidico pMal (New England BioLabs, Beverly, MA).

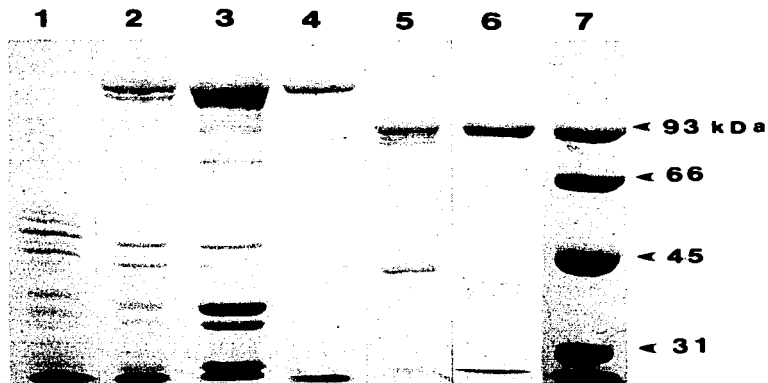


Figura 23. Expresión de la Paramiosina de *T. solium*: análisis por PAGE-SDS (tinción de Coomassie). Proteínas celulares totales de *E. coli* transformada con el plásmido recombinante Vd2-14 no inducidas (1), e inducidas (2) a expresar la proteína de fusión MBP-TPmy, carril 3: Sobrenadante de una extracción en urea de las células de *E. coli*, transformadas con Vd2-14 e inducidas a expresar MBP-TPmy, 4: Fracción unida a la colágena, 5: Digestión de la fracción anterior (MBP-TPmy) con la proteinasa sérica factor Xa, 6: Fracción no unida a la columna de amilosa después de la digestión de la MBP-TPmy con factor Xa y 7: Marcadores de peso molecular, rango menor (ver figura 6).

cual indica que la afinidad de la MBP hacia la maltosa es afectada en la proteína de fusión. En contraste, la afinidad de la TPmy por colágena permitió la purificación de la proteína de fusión por afinidad a colágena. En el carril 5 de la figura 23 se muestra que la digestión de la proteína de fusión con factor Xa produce dos péptidos: de 98.5 kDa (consistente con el peso molecular de la TPmy) y de 42 kDa (consistente con el peso molecular de la MBP). Al pasar esta fracción por una columna de amilosa, la proteína de 42 kDa fue retenida, lo cual permite obtener la proteína de 98.5 kDa razonablemente pura. El hecho de que la proteína de 42 kDa es retenida por la columna de amilosa indica que la propiedad de la MBP de unirse a la maltosa se recupera al escindirse de la proteína de fusión.

Para determinar si la proteína de fusión y el péptido recombinante de 98.5 kDa son inmunológicamente idénticos a la TPmy/AgB, se realizaron pruebas de IET usando anticuerpos anti-AgB (Fig. 24). Los anticuerpos de un suero hiperinmune anti-AgB reconocen tanto a la proteína de 140 kDa como a otras bandas de menor peso molecular resultado de la degradación de la proteína de fusión. El suero anti-AgB también reconoció la banda de 98.5 kDa en la fracción digerida con factor Xa y a la proteína purificada por afinidad a colágena. En contraste, un suero normal de conejo no reconoció ninguna banda en los extractos de bacterias expresando la proteína de fusión. Similarmente, el suero anti-AgB no reconoció ninguna proteína en los extractos de bacterias no inducidas con IPTG que contenían el plásmido no recombinante. Estos resultados demuestran que la TPmy recombinante mantiene tanto las características funcionales como las inmunológicas de la TPmy natural.

La cantidad de proteína purificada por la combinación de cromatografías de afinidad con colágena polimérica (2 gr) y amilosa (5 ml) fue de 1-2 mg a partir de un cultivo de bacterias de 100 ml.

10. NUMERO DE COPIAS DEL GEN DE TPmy EN EL GENOMA DE *Taenia solium*.

Para obtener un estimado del número de copias del gen de la TPmy en el genoma de *T. solium*, se realizaron ensayos tipo Southern. Siete lotes de 10 ug de DNA genómico de cisticercos fueron digeridos con diferentes enzimas de restricción (Eco RI, Bam HI, Xba I, Pst I, Hind III, Sal I, Bgl II). Cada uno de los lotes digeridos fue sometido a electroforesis en agarosa al 1% (Fig. 25A) y transferidos a membranas de nitrocelulosa. Las membranas fueron hibridadas con el fragmento que contiene la región codificadora completa de la TPmy obtenido por PCR (2.6 kb), marcado con α -³²P-dCTP. La autorradiografía, mostró patrones de 1, 2 ó 3 bandas de diferentes tamaños en cada uno de los lotes de DNA genómico (Fig. 25B), lo cual sugiere que existe una sola copia de este gen. El DNA de lambda gt10 no recombinante marcado con ³²P-dCTP, no hibridó con el DNA del cisticerco.

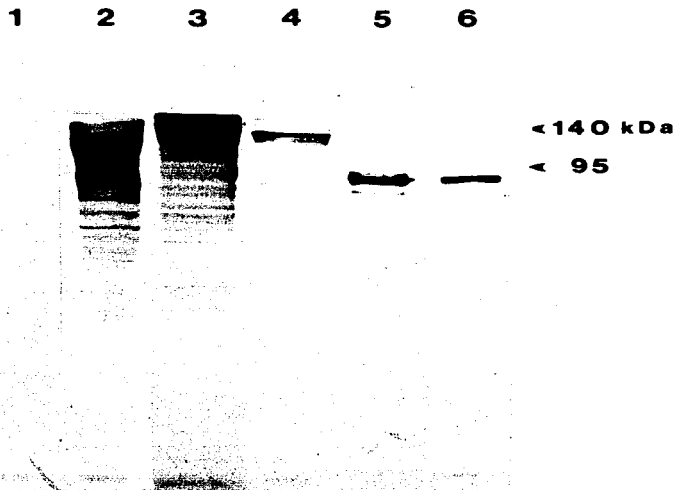


Figura 24. Expresión de la Paramiosina de *T. solium*: análisis por inmunoelectrotransferencia. Proteínas celulares totales de *E. coli* transformada con el plásmido recombinante Vd2-14 no inducidas (1), e inducidas (2) a expresar la proteína de fusión MBP-TPmy, carril 3: Sobrenadante de una extracción en urea de las células de *E. coli*, transformadas con Vd2-14 e inducidas a expresar MBP-TPmy, 4: Fracción unida a la colágena, 5: Digestión de la fracción anterior (MBP-TPmy) con la proteinasa sérica factor Xa, 6: Fracción no unida a la columna de amilosa después de la digestión de la MBP-TPmy con factor Xa. Todos los carriles fueron incubados con suero anti-TPmy (AgB). Los anticuerpos unidos fueron revelados con un segundo anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa.

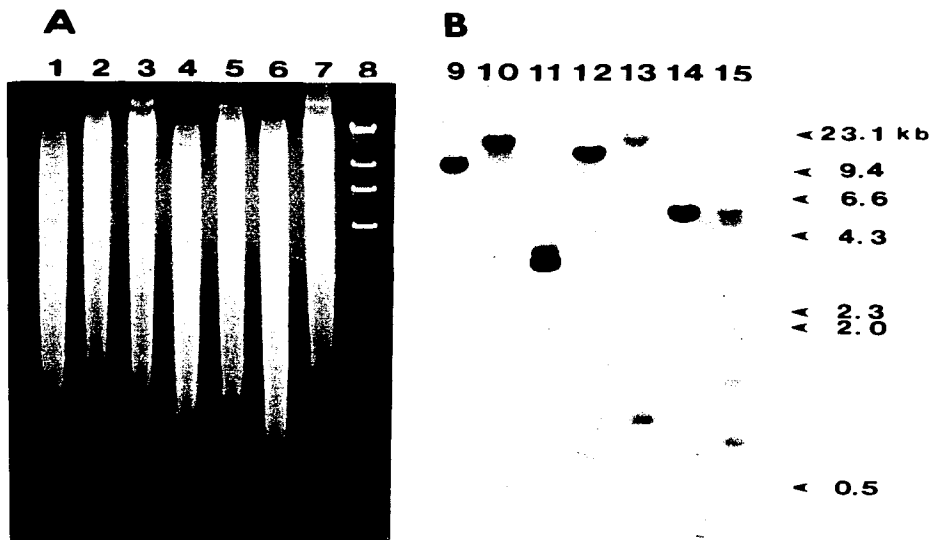


Figura 25. Análisis tipo Southern de muestras de 10 ug de DNA genómico de *T. solium*: **A.** Electroforesis en gel de agarosa del DNA digerido con diferentes endonucleasas de restricción: 1: Pst I, 2: Bgl II, 3: Sal I, 4: Eco RI, 5: Xba I, 6: Hind III, 7: Bam HI, 8: Lambda/Hind III. **B.** Igual que A pero transferido a una membrana de nitrocelulosa e hibridado con una sonda de la región codificadora completa de la TPmy.

11.- DETERMINACION DEL TAMAÑO DEL RNA MENSAJERO DE LA TPmy.

Para determinar el tamaño del mensajero que codifica para la TPmy, se realizó un análisis tipo Northern. Un lote de 10 ug de RNA total de *T. solium* fue sometido a electroforesis en un gel de agarosa al 1% en presencia de formaldehído. El RNA fue transferido a una membrana de nitrocelulosa e hibridado con el fragmento que contiene la región codificadora completa de la TPmy obtenido por PCR (2.6 kb), marcado con α -³²P-dCTP. La autorradiografía, mostró una sola banda con un tamaño de aproximadamente 3.9 Kb (Fig. 26).

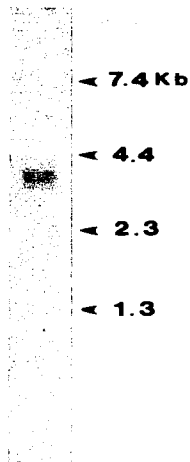


Figura 26. Análisis tipo Northern de 10 ug de RNA total de *T. solium* hibridado con una sonda de la región codificadora completa de la clona de cDNA de la TPmy. El tamaño del mensajero para la TPmy fue determinado utilizando un RNA escalera de la casa BRL.

VI. DISCUSION

La purificación del AgB se realizó por medio de una cromatografía de afinidad utilizando colágena polimérica siguiendo el procedimiento descrito anteriormente (Laclette *et al.*, 1990). Los intentos para secuenciar el extremo amino terminal del AgB aislado resultaron infructuosos por lo que se decidió obtener una secuencia parcial de alguna otra región de la proteína. Para lograr esto el AgB fue digerido parcialmente con tripsina, lo que generó tres polipéptidos de aproximadamente 55, 50 y 25 kDa. Los péptidos de 55 y 50 kDa fueron purificados y sometidos a secuenciación. El péptido de 25 kDa no fue utilizado debido a su movilidad similar a la tripsina, lo cual aumentaba el riesgo de contaminaciones con la enzima.

La secuencia LSLQTQLQXLQMDYDNLQ se obtuvo a partir del péptido de 55 kDal, en donde la posición marcada como X fue incierta aunque el residuo más probable era serina. La secuencia de aminoácidos deducida a partir de la secuencia nucleotídica de la clona de cDNA de AgB de 3.6 Kb, confirmó la secuencia anterior con excepción de una serina en lugar de una glutamina, correspondiente a la posición 246 de la secuencia deducida (Fig. 17). Puesto que la secuencia nucleotídica del cDNA fue confirmada en dos clones independientes secuenciadas en las dos direcciones, se concluyó que se trataba de un error en la secuenciación del péptido.

La secuencia QMDYDN fue seleccionada porque los aminoácidos son codificados por un número pequeño de codones, lo que permite cubrir todas las posibles secuencias nucleotídicas en la mezcla de oligonucleótidos sintéticos. La mezcla de oligonucleótidos fue utilizada como sonda para el tamizaje de las bibliotecas de cDNA.

La construcción de bibliotecas de cDNA se inició con la purificación de RNA total de cisticercos. El RNA total purificado presentó un patrón diferente a otros RNAs de eucariotes en los que aparecen dos bandas correspondientes a los fragmentos 28S (4.8 kb) y 18S (2.0 kb) del RNA ribosomal. El RNA de *T. solium* presenta sólo una banda de aproximadamente 2.8 kb en la región que corresponde al RNA ribosomal 18S. Esta observación coincide con otros estudios realizados en varias especies de moscas, protozoarios y en el trematodo *S. mansoni* en donde el RNA que corresponde al 28S contiene un corte "nick" justo en la parte media del RNA, lo que rompe la molécula en dos partes casi iguales (Harry *et al.*, 1985). Se ha sugerido que este corte es debido a una secuencia de DNA no ribosomal insertado en el gen 28S que es eliminada durante su procesamiento. El corte no parece afectar la capacidad del RNA 28S cortado, para ensamblarse con las proteínas del ribosoma.

El RNA Poli-A⁺ aislado en la columna de oligo(dT) mostró una predominancia de material con tamaño entre 1.0 y 4.0 kb, a diferencia de otros organismos eucariotes en donde la mayoría se encuentra entre 5-10 kb (Ausubel *et al.*, 1987; Sambrook *et al.*, 1989). El RNA Poli-A⁺ fue usado para sintetizar cDNA por el método de Gubler y Hoffman (Fig. 11). Este método se modificó en varios pasos, siendo los más importantes: 1) Uso de transcriptasa reversa sin actividad de RNasa H- lo que resulta en un alto rendimiento de

productos completos copiados a partir del RNA Poli-A⁺, 2) Uso de ligadores o adaptadores con doble sitio de restricción Eco RI externo y Not I interno, evitando el paso de metilación y corte con endonucleasas y 3) Modificación de las condiciones para la ligación de los vectores al cDNA (ver sección III.2.c.x). Estas modificaciones mejoran substancialmente la eficiencia de clonación del cDNA, aumentan el tamaño promedio de los fragmentos de cDNA y facilitan la posterior subclonación de los fragmentos.

El uso de α -³²P-dCTP en la síntesis del cDNA, permitió calcular el rendimiento de cDNA unido a los adaptadores (500 ng) a partir de 10 μ g de RNA Poli-A⁺. Se prepararon seis bibliotecas en fago lambda gt10 y gt11 (dos de población total de fragmentos, y cuatro de fragmentos de tamaño seleccionado) que produjeron títulos altos. La construcción de éstas bibliotecas permite no solo el aislamiento del gen descrito en la presente tesis, sino que constituye un valioso recurso para clonar, caracterizar y manipular otras proteínas expresadas por el cisticerco. Cabe hacer notar, que las bibliotecas reportadas aquí son las primeras descritas para *T. solium*.

El tamizaje de la biblioteca, de fragmentos de 2-7 kb en lambda gt10, usando como sonda la mezcla de oligonucleótidos que codifican la secuencia parcial del AgB, resultó en el aislamiento de 6 clonas. Las secuencias de dos clonas de 3.6 kb resultaron idénticas y contienen un marco abierto de lectura que codifica para una proteína de 863 aminoácidos con un peso molecular de 98.579 kDa. El análisis por computadora de la secuencia de aminoácidos indicó que se trata de una paramiosina (Kagawa *et al.*, 1989; Maclachlan *et al.*, 1982). La identidad inmunológica del AgB con la paramiosina ya había sido encontrada en ensayos de IET enfrentando un antisuero anti-AgB contra una paramiosina recombinante del *S. mansoni* (Laclette, *et al.*, 1990). Esta secuencia es la tercera secuencia completa reportada de genes de ténidos, después de la descripción de dos genes de actinas (Campos, *et al.*, 1989).

El análisis de las secuencias de aminoácidos indica que el AgB de *T. solium* tiene una homología del 75% con la paramiosina de *S. mansoni*. Esta homología disminuye a menos de 35% cuando se compara con paramiosinas de nemátodos y de la *D. melanogaster*.

La paramiosina es una proteína estructural muy interesante ya que su secuencia se conserva sólo en las características fisicoquímicas que mantienen su estructura de α -hélice superenrollada. La mayoría de las sustituciones involucran cambios conservativos, es decir cambios por aminoácidos con propiedades fisicoquímicas parecidas. Además, la estructura de la proteína favorece a ciertos aminoácidos como la leucina que tiene una cadena lateral hidrofóbica que estabiliza la interacción de las dos cadenas de alfa hélice en el dímero de la proteína (cierres "zipper" de leucinas). Recientemente se ha descrito que la homo y heterodimerización producida por los cierres de leucina en varios factores de transcripción permiten su unión cooperativa con el DNA (William *et al.*, 1988; Busch y Sassone-Corsi, 1990; Jones, 1990; Frankel y Kim, 1991).

Los extremos amino y carboxilo terminal de la TPmy no se encuentran tan conservados como el resto de la molécula, lo que sugiere la ausencia de una presión selectiva en esta parte de la molécula, en contraposición a la región de α -helice que mantiene las unidades repetitivas de 7/28 residuos.

El uso de codones en los tres genes caracterizados de *T. golium* muestra diferencias con respecto a la preferencia en el uso de codones observada en genes de actinas, a pesar de que se trata de dos proteínas de tejido muscular. Se requiere conocer la secuencia de más genes para determinar el uso y la preferencia global de codones en este parásito. La información sobre el uso de codones es interesante ya que permite predecir el probable marco de lectura de secuencias nuevas, además de que facilita el diseño de oligonucleótidos para diversos usos.

Los experimentos de expresión y purificación de la paramiosina recombinante fueron muy exitosos, como ya se mencionó en la sección de resultados. Este éxito se debe en parte a los vectores de expresión seleccionados, así como al gran desarrollo de la genética bacteriana que posibilita disponer de huéspedes óptimos para la expresión de los genes extraños.

En la actualidad existen tres clases de vectores de expresión en bacterias: los fagos derivados de lambda (como el gt11 y el gt22), los fagémidos (como los lambda ZAP I y II) y los plásmidos (como el pMal, el pREST, los pURs, y los pDS/pQE). Esta última clase de vectores ha sido muy desarrollada y se dispone de un gran número de variantes. Las principales características de los vectores plasmídicos utilizados para expresión son: a) un promotor bacteriano fuerte que pueda ser regulado en la transcripción y b) un eficiente sitio de unión a ribosomas para la buena traducción del gen de interés. Los promotores más usados en estos vectores son los P_L/P_R del fago lambda que se regulan por cambios de temperatura, el promotor híbrido *trp-lac* que se induce con IPTG, y el promotor del bacteriofago T7 que se induce por la presencia de la T7 polimerasa. Otras características útiles de los vectores de expresión incluyen secuencias accesorias de DNA que codifican péptidos señal para inducir la secreción de la proteína tal como la secuencia señal del gen de fosfatasa alcalina bacteriana (pho A). También, las secuencias de DNA que codifican polímeros de histidina o proteínas que se unen a sustratos (como la proteína que se une a maltosa, la beta-galactosidasa o la glutatión-S-transferasa), facilitan la purificación de la proteína de fusión. Finalmente, la introducción de secuencias que permiten la liberación del péptido de interés a partir de la proteína de fusión, son de uso común en los plásmidos de expresión. Este es el caso de la enterocinasa y el factor Xa (Sambrook *et al.*, 1989, Murrells y Roberts, 1989).

Los niveles de expresión en estos sistemas varían entre el 1 y el 30% de la proteína total en la célula bacteriana, lográndose obtener hasta 10-20 mg de proteína recombinante/litro de cultivo bacteriano transformado. El potencial de estos vectores en la producción de proteínas parasitarias es enorme.

La figura 22 muestra la estructura del plásmido recombinante para la expresión de TPmy recombinante. La región codificadora del cDNA de la TPmy se fusionó al carboxilo terminal de la proteína que une a maltosa (MBP), a través del péptido ile-glu-gly-arg, que es la secuencia reconocida por el factor Xa. Además, la expresión de la proteína de fusión es regulada por el promotor trp-lac, lo que permite la producción de grandes cantidades de proteína de fusión.

Los altos niveles de expresión de proteínas recombinantes en bacterias, frecuentemente resultan en la formación de gránulos densos llamados cuerpos de inclusión en los cuales la célula bacteriana acumula la proteína extraña. Estos gránulos, en los que se encuentra la proteína recombinante en forma insoluble, pueden ser inicialmente aislados del resto del material bacteriano. Posteriormente, son solubilizados utilizando agentes desnaturalizantes como el hidrocloreuro de guanidina, la urea, SDS, Tritón X-100, Tween-20, 2-mercaptoetanol, soluciones alcalinas, acetonitrilo o propanol. Finalmente, estos agentes son eliminados por diálisis o dilución para permitir el correcto plegamiento de la proteína. Cabe mencionar que cada proteína, por sus propiedades intrínsecas, tales como puentes disulfuro, de hidrógeno y otros factores que componen sus estructura primaria, secundaria y cuaternaria, se considera un caso particular por lo que se requiere probar diferentes estrategias de purificación. La purificación de la TPmy recombinante no fué la excepción y los altos niveles de expresión resultaron en la formación de cuerpos de inclusión en el citoplasma bacteriano. El empleo de amortiguadores comunes tales como PBS y Tris con sales como NaCl, KCl, no solubilizaron a la proteína de fusión, por lo que agentes como la urea 6 M, 2-mercaptoetanol 10 mM, NaCl 0.5 M fueron utilizados para su solubilización. La diálisis en amortiguador de fosfatos conteniendo NaCl 0.5M resultó en una renaturalización de la proteína de fusión. Se usó una concentración de NaCl 0.5 M, debido a que la TPmy se mantiene soluble y estable a esta concentración, sin embargo, los ensayos de unión a colágena fueron realizados en una concentración de NaCl 0.3 M.

El análisis de la proteína retenida en la colágena mostró que la proteína de fusión constituía un 40% de la proteína total en la fracción. La digestión con el factor Xa, permitió la separación de la proteína de fusión. Una segunda cromatografía a través de amilosa, de la proteína de fusión digerida con el factor Xa permitió la purificación del dominio del AgB. El rendimiento para la TPmy recombinante fué de 1-3 mg a partir de un cultivo de 100 ml de bacterias conteniendo el plásmido recombinante. La TPmy recombinante mostró características idénticas a la proteína natural (TPmy).

El patrón obtenido en los análisis tipo Southern indican que la TPmy existe como una copia única en el genoma de *T. solium*. Por otro lado la TPmy es una proteína relativamente abundante en los tejidos del cisticerco, presente no sólo en el músculo sino también en los citones tegumentales y en el tegumento. Los resultados del tamizaje de las bibliotecas de cDNA mostraron que alrededor del 1 % de los mensajeros totales del cisticerco son RNAM de TPmy, lo

cual sugiere que la transcripción de este gen es regulada por un promotor fuerte y que su traducción a proteína se lleva a cabo por un transcrito muy estable y fácil de traducir.

El análisis tipo Northern muestra un RNA mensajero de 3.9 Kb que concuerda con el tamaño de la proteína de la TPmy, así como con el RNA mensajero de 4.1 ya reportado para la paramiosina de *S. mansoni* (Grossman *et al.*, 1990).

La ausencia de una secuencia líder para secreción en la secuencia de aminoácidos de la TPmy no parece estar de acuerdo con la naturaleza secretoria propuesta para el AgB (Laclette *et al.*, 1987). Por otro lado, existe evidencia de que la paramiosina del *S. mansoni* (SPmy) se localiza asociada a las vesículas tegumentales (Matsumoto *et al.*, 1988), por lo que también se ha propuesto que es secretada. Asimismo se ha reportado que la SPmy y la TPmy son glicoproteínas (Guerra, *et al.* 1982; Pearce *et al.*, 1986). Esto sugiere que la TPmy pudiera tener una función en el tegumento además de su función como proteína estructural del músculo.

Los datos anteriores hacen surgir una serie de preguntas: ¿Es posible que una proteína muscular pueda ser secretada? ¿Como es glicosilada y transportada al tegumento? ¿Por qué es la proteína inmunodominante en la cisticercosis humana si las proteínas estructurales son en general pobremente inmunogénicas? ¿cual es su función en la relación huésped-parásito?. Para responder a las dos primeras preguntas se puede proponer que la TPmy enviada al tegumento podría presentar algunas modificaciones post-traduccionales; por ejemplo, la población de moléculas de TPmy que será enviada al tegumento es primero glicosilada. También es posible que los platyhelminthes posean mecanismos de secreción distintos a los conocidos en otros organismos. En cuanto a su inmunodominancia, una de las posibles explicaciones es la propia variabilidad en la secuencia de las paramiosinas, que generaría epítopos de secuencia no presentes en vertebrados incluso en proteínas estructuralmente relacionadas como la miosina y la tropomiosina. Esta hipótesis parece corroborarse por la observación de que en otras parasitosis de humanos la paramiosina es el antígeno inmunodominante (Pearce, *et al.*, 1986; Grandea *et al.*, 1989).

Uno de los aspectos de mayor interés acerca de la TPmy tiene que ver con su propiedad de unirse a colágena y de inhibir la cascada del complemento. Algunos resultados recientes demuestran que la TPmy es un potente inhibidor del C1, que es el primer componente de la cascada. Aparentemente, la inhibición se lleva a cabo a través de una unión con el C1q que es una proteína multimérica con una región con estructura tridimensional similar a la colágena (Laclette, *et al.*, 1992). Es posible que una proteína estructural haya adquirido una nueva función durante la adaptación de los helmintos a la vida parasitaria. Si este es el caso, se trataría de un ejemplo único en el que una proteína estructural provee una preadaptación para el modo de vida parasitario.

Algunas de las proteínas clonadas y caracterizadas de gusanos parásitos son proteínas de músculo con estructura de α -helice superenrollada como la paramiosina. Todas estas proteínas han sido

antisueros de pacientes. La paramiosina es un antígeno dominante que además confiere un nivel significativo de protección en la esquistosomiasis murina, por lo que se ha convertido en uno de los principales candidatos para vacunación en contra de la esquistosomiasis (Lanar, *et al.*, 1986; Pearce, *et al.*, 1986 y 1988). La paramiosina también ha sido descrita como antígeno inmunodominante en varias filariasis (Grande *et al.*, 1989), por lo que se trata de un inmunógeno prominente de los parásitos helmintos.

Algunas drogas sintéticas como el Praziquantel han sido utilizada con éxito en el tratamiento de la cisticercosis y esquistosomiasis (Pawlowski *et al.*, 1978; Groll, 1982; Andrews, 1985; Flisser *et al.*, 1989; Escobedo, 1989; Sandoval, 1989; Willms, 1992). Otros estudios han mostrado que el Praziquantel bloquea funciones vitales del parásito, y favorece un sinergismo entre la respuesta inmune del huésped y la quimioterapia en contra del parásito (Brindley y Sher, 1987; Flisser *et al.*, 1989). El disponer de la TPmy recombinante nos permitirá determinar por ensayos de vacunación si esta molécula sola es capaz de inducir inmunidad protectora, así como estudiar el sinergismo entre el efecto del Praziquantel y la respuesta inmune en el modelo de cisticercosis murina.

Recientemente, se ha reportado que la TPmy y otras paramiosinas de varios invertebrados se unen a colágena e inhiben la función del complemento a través de una inhibición específica de su primer componente el C1, posiblemente mediada por una unión de TPmy con C1q (subcomponente del C1), el cual es una molécula con una región similar a la colágena (Laclette, *et al.*, 1992). Con base en estas observaciones se ha sugerido que las paramiosinas pueden jugar un papel inmunomodulador en la respuesta del huésped (Laclette, *et al.*, 1992). Es concebible que una inmunización previa hacia esta proteína permita al huésped humano o porcino bloquear la acción inhibitoria de la TPmy y destruir al cisticerco. Algunos antígenos recombinantes han sido exitosamente usados en el desarrollo de métodos específicos de inmunodiagnóstico en varias enfermedades parasitarias (Vogel *et al.*, 1988; Müller *et al.*, 1989; Hemmings y McManus, 1991). La disponibilidad de TPmy recombinante abre las puertas para que se investigue la posibilidad de utilizarla en el diagnóstico de la cisticercosis humana y porcina. Actualmente se está investigando la composición epitópica de la TPmy con la idea de encontrar epitopes que sean específicos del cisticerco de *T. solium*. Para ello se han preparado construcciones que permiten la expresión de péptidos parciales de la TPmy que serán evaluados con sueros de pacientes con cisticercosis. El propósito es investigar si existe un fragmento de la TPmy que posea epitopes que sean reconocidos por la mayoría de los pacientes y que no presenten reacción cruzada con sueros de otras parasitosis por helmintos. La posibilidad de producir cantidades prácticamente ilimitadas de TPmy resuelve otros problemas que normalmente limitan el diagnóstico de las enfermedades parasitarias, como la escasez de material antigénico que impide la estandarización de métodos diagnósticos.

La evidencia previa indica que en las infecciones por taénidos se produce una respuesta inmune humoral altamente protectora (ver introducción, sección 4) hacia una infección subsecuente (inmunidad concomitante). Esto sugiere que es posible el desarrollo de una vacuna contra la cisticercosis por *T. solium*. Las bibliotecas desarrolladas en este trabajo son un recurso valioso para conseguir las cantidades necesarias de proteínas parasitarias que sean candidatos para la vacunación. Por ejemplo, el disponer del gen clonado de la TPmy nos permitirá realizar estudios de vacunación con la TPmy recombinante, en el modelo murino de cisticercosis por *T. crassiceps*. Además, se tienen planeados algunos estudios de caracterización dirigidos a localizar, a nivel molecular, las regiones responsables de la interacción con la colágena y el Ciq. Esta información sería de gran utilidad para el desarrollo de una vacuna, puesto que permitiría utilizar únicamente los dominios de la molécula que interaccionan con el Ciq, excluyendo los dominios más inmunogénicos, para disminuir las reacciones alérgicas no deseadas. Resultados preliminares de experimentos usando fragmentos de TPmy recombinante, han mostrado que todos los fragmentos de la molécula tienen la propiedad de unirse a la colágena pero solamente el tercio del amino terminal tiene la propiedad de unirse al Ciq y de inhibir el complemento.

El trabajo aquí descrito constituye uno de los primeros esfuerzos en la construcción de bibliotecas de cDNA del cisticerco de *T. solium* y en el aislamiento, caracterización y expresión de genes de taénidos. Además, la integración y aplicación de diversas metodologías inmunológicas, bioquímicas y de DNA recombinante utilizadas aquí, permitirán aumentar nuestra comprensión de la relación huésped-cisticerco.

VII. APENDICES.

1. TAXONOMIA DE *T. solium*.

Los gusanos del Phylum Platyhelminthes son gusanos acelomados, de cuerpo aplanado, simetría bilateral y con órganos ya organizados en sistemas (Margulis y Schwartz, 1976). Los hay de vida libre, comensales y parásitos; se conocen alrededor de 15,000 especies. El Phylum Platyhelminthes se encuentra dividido en ocho clases: Turbellarida, Tennocephaloidea, Monogenea, Aspidogastrea, Trematoda, Didymozoida, Cestodaria y Céstoda.

Clasificación taxonómica de *T. solium*:

Reino:	Animalia
Subreino:	Metazoa
Phylum:	Platyhelminthes
Clase:	Céstoda
Orden:	Cyclophyllidea
Superfamilia:	Taenoidea
Familia:	Taenidae
Género:	Taenia
Especie:	<i>solium</i>
Etapa larvaria:	Cisticerco

2. DESCRIPCION DE LOS VECTORES.

a) Lambda gt10:

Lambda gt10 es un miembro de la familia de los vectores de inserción, tiene un tamaño de aproximadamente 43 kb. El lambda gt10 contiene un único sitio EcoRI localizado dentro de la región del gen cI, dentro del cual se pueden insertar fragmentos de DNA extraño hasta de 7.6 kb. El gen cI codifica para el represor de los genes que producen la lisis de la célula bacteriana. Los fagos que llevan un gen funcional de cI, como los fagos silvestres, forman placas turbias sobre muchas cepas de *E. coli*. Por el contrario, si el gen cI se encuentra interrumpido o inactivado, generará bacteriófagos (cI-) que forman placas claras.

El lambda gt10 con o sin fragmento de DNA extraño, puede empacarse en sus cápsides. Las bibliotecas construidas en lambda gt10 consisten de una mezcla de bacteriófagos recombinantes y no recombinantes. Estos dos bacteriófagos, como ya se mencionó anteriormente pueden ser distinguibles fenotípicamente por su habilidad de formar placas claras (recombinantes) o turbias (no recombinantes). La proporción de placas recombinantes en esas bibliotecas pueden ser incrementadas, sembrando el fago en una cepa de *E. coli* que lleva una mutación hfl-. Esto es posible debido a que el gen cII del bacteriófago es un activador de la síntesis de cI. La estabilidad del producto del gen cII está determinada por el producto del gen hfl y cIII de la bacteria. Por lo que una mutación en el gen hflA incrementa la estabilidad del producto del gen cII, resultando en un incremento del producto del gen cI y por lo tanto

una alta frecuencia de lisogenización. El crecimiento de los bacteriófagos que llevan un gen CI intacto es suprimido por las cepas de *E. coli* que llevan una mutación hfl-, en contraste con el crecimiento de fagos recombinantes que no pueden sintetizar el producto del gen CI (Ausubel *et al.*, 1987; Sambrook *et al.*, 1989).

b) Lambda gtl1:

El lambda gtl1 es un vector de expresión con un tamaño de aproximadamente de 43.7 kd que contiene una copia del gen Lac Z de *E. coli*, con un sitio único Eco RI localizado a 53 kb hacia el extremo 5' del codón de terminación del gen LacZ. Este fago puede aceptar fragmentos de DNA extraño de hasta 7.2 kb en el sitio Eco RI. Los fragmentos con secuencias codificadoras que mantienen un marco de lectura y orientación adecuadas son expresados como proteínas de fusión con la enzima β -galactosidasa. Frecuentemente, las proteínas de fusión retienen los epitopes antigénicos por lo que pueden ser detectados con anticuerpos específicos dirigidos hacia la proteína natural.

El lambda gtl1 codifica para un represor sensible a la temperatura (cits857) y contiene una mutación ámbar (Sam 100) en el gen de lisis. Por eso puede formar placas sobre bacterias *E. coli* que llevan el supresor ámbar (supF) y puede también dar elevados lisógenos a temperaturas a las cuales el represor es activo. Usualmente, los bacteriófagos son plaqueados a 42°C sobre una cepa de *E. coli* Y1090 (genotipo relevante: hdsR, supF, dlac, dlon, pMC9). Después de 4 horas, las placas son cambiadas a 37°C y cubiertas con un filtro de NC estéril impregnado con IPTG. La temperatura de 42°C inactiva el represor lac y el IPTG induce la expresión de la proteína de fusión. Después de varias horas de incubación a 37°C, los filtros son incubados con anticuerpos que reconocen al antígeno de interés y las clonas que producen los antígenos son detectadas por medio de pruebas bioquímicas o radioquímicas.

c) Vectores pMAL (pMal-c/pMal-p):

Los vectores pMal han sido diseñados para la expresión y fácil purificación de proteínas de fusión. Los vectores contienen el promotor P_{tac} que permite transcribir un gen híbrido compuesto por los genes malE-lacZ. Además contiene el gen lacI que codifica para el represor de lac, el cual apaga la transcripción de P_{tac} hasta que IPTG es adicionado. La interrupción del gen lacZ por insertos, permite la diferenciación por color azul (no recombinantes) o blanco (recombinantes) en un medio conteniendo X-gal. La región del enlazador "polylinker" contiene un sitio Eco RI y un sitio Stu I para insertar secuencias codificadoras que se expresan como proteínas de fusión con el gen de malE. Existen otros sitios para endonucleasas de restricción en la región del enlazador para una fácil manipulación de los fragmentos insertados. Estos vectores también incluyen una secuencia que codifica para el sitio de reconocimiento de una proteinasa sérica factor Xa (Ile-Glu-Gly-Arg), lo cual permite liberar el péptido de interés a partir de la proteína de fusión. El vector pMal-c contiene una

delección de la secuencia señal del gen de *malE*, por lo que la proteína de fusión se acumula en el citoplasma de la bacteria. El pMal-p si contiene la secuencia señal del gen *malE*, lo que permite que la proteína de fusión pueda ser transportada a la región periplásmica de la bacteria. Esta última propiedad permite una fácil recuperación de la proteína recombinante.

El gen de interés es insertado dentro del gen *malE*, que codifica para la proteína que une maltosa (MBP), lo que resulta en la expresión de una proteína de fusión con MBP. El uso de un promotor fuerte (*P_{tac}*) y las señales de inicio de la replicación de MBP permiten expresar grandes cantidades de la proteína de fusión. La unión de MBP a la proteína de fusión permite la purificación de ésta por cromatografía de afinidad en una columna de amilosa. El sitio de reconocimiento de la proteinasa factor Xa permite cortar la proteína de interés después de su purificación.

3. PARAMIOSINA.

La paramiosina es una proteína estructural que forma el núcleo de los filamentos gruesos en los músculos de invertebrados. La paramiosina existe como un dímero superenrollado, estabilizado por una interacción hidrofóbica entre sus dos cadenas (McLachlan y Karn, 1982; Cohen y Parry, 1986; Kagawa *et al.*, 1989). Se ha propuesto que la paramiosina interacciona con la miosina y consigo misma por las cargas de superficie de una manera análoga a la miosina, permitiendo mantener la contracción muscular sin gasto de energía, característica de los músculos de invertebrados (McLachlan y Karn, 1982; Cohen *et al.*, 1987). Todas las paramiosinas comparten una estructura similar característica de una α -hélice superenrollada. La α -hélice se origina por la presencia de unidades repetitivas de 7 aminoácidos cargados y apolares. Particularmente importantes son las posiciones de los aminoácidos apolares, que forman una cinta hidrofóbica entre las dos cadenas de la paramiosina induciendo su asociación. En las otras posiciones comúnmente aparecen aminoácidos cargados que se encuentran expuestas hacia el medio acuoso.

La paramiosina es la principal proteína reconocida por sueros de ratones vacunados con extractos solubles de *S. mansoni* (Lanar *et al.*, 1986). Además se ha observado que la paramiosina dada intradérmicamente con el bacilo Calmette-Guerin (BCG) protege a los ratones contra la infección por cercarias de *S. mansoni* (Pearce *et al.*, 1988). Estudios similares a los antes mencionados también, han demostrado que la paramiosina es uno de los principales inmunógenos en infecciones causadas por filarias (Grande *et al.*, 1989). En la actualidad algunos genes de paramiosina de diversos organismos parásitos han sido clonados y caracterizados (Kagawa *et al.*, 1989; Grande *et al.*, 1989; Lacleite *et al.*, 1991).

4. MEDIOS, AMORTIGUADORES, SOLUCIONES.

Medio de Luria-Bertani (LB)

Bacto-triptona.....10 gr
Extracto de levadura..... 5 gr
NaCl.....10 gr

Medio SOB

Bacto-triptona.....20 gr
Extracto levadura..... 5 gr
NaCl..... 0.5 gr

MgSO₄.7H₂O..concentración final..10 mM
KCL.....concentración final.. 2.5 mM

Medio caldo Terrífico (TB)

NaCl..... 5 gr
Bactotriptonas.....10 gr
MgSO₄.7H₂O concentración final..10 mM
Maltosa...concentración final.. 0.2%

Medio SM

NaCl..... 5.8 gr
MgSO₄.7H₂O..... 2 gr
1 M de Tris-HCl (pH 7.5).....50 ml
Gelatina al 2%..... 5 ml

Disuelva los componentes, ajuste el pH a 7.0. Afore la solución a 1 L con agua desionizada y esterilize por autoclave por 20 min a 15 lb/sq en un ciclo líquido. Para medio sólido adicione bacto-agar o agarosa a una concentración final de 1.5% y para top-agar agarosa a una concentración final de 0.75%

Las soluciones de Mg⁺⁺ y K⁺ son esterilizadas por filtración a través de filtros de 0.22 um y posteriormente adicionadas justo después de la esterilización del medio por autoclave. Los medios pueden ser almacenados a temperatura ambiente.

La maltosa, un inductor del gen (lambB) que codifica para el receptor del bacteriófago Lambda, es utilizada al 0.02% en los cultivos. La solución de maltosa es preparada al 20% y esterilizada por filtración.

SOLUCIONES DE HIBRIDIZACION

a) Northern para 100 ml

Formamida desionizada.....50 ml (50%)
Denhardt's 50X..... 8 ml (4X)
SDS al 20%..... 1 ml (0.2%)
EDTA 0.5 M..... 0.4 ml (2mM)
Amortiguador de fosfatos pH 7.4,
1.2 M.....10 ml (120mM)
SSC 20X..... 5 ml (1X).

b) Solución para Southern y Tamizajes para 500 ml
SSC 20X.....150 ml (6X)
Denhardt's 50X..... 50 ml (50X)
SDS 20%.....12.5 ml (0.5%)

SOLUCION SSC 20X (1L)

NaCl.....175 gr (3M)
Citratato de Na₂H₂O..... 88 gr (0.3 M)
Ajustar el pH a 7.0.

SOLUCION DE DENHARDT'S 50X (0.5 L)

Ficoll 400..... 5 gr
Polivinilpirrolidona..... 5 gr
BSA (Fracción V)..... 5 gr
Disuelva los componentes, filtre y guarde en alícuotas de de
25 ml a -20°C.

Antes de su utilización a las soluciones de hibridización se les adicionó DNA de esperma de Salmón, previamente desnaturalizado a 100°C/5 min a una concentración de 100 ug/ml.

Los tiempos y concentración de la sondas utilizadas fueron:

Sondas de oligonucleótidos..... 1-2 pm/ml por 1-3 h.
Sondas de DNA..... 1-2 ng/ml toda la noche.

Las temperaturas de hibridización fueron:
Sondas de oligonucleotidos... $T_m = 2(\#A+\#T) + 4(\#G+\#C) - 5$ grados
Sondas de DNA..... 65°C.

AMORTIGUADOR DE PRIMERA CADENA 10X

500 mM Tris.HCl, pH 7.6
750 mM KCl
100 mM MgCl₂
5 mM espermidina (opcional).

AMORTIGUADOR DE SEGUNDA CADENA 10X

500 mM Tris.HCl, pH 7.6
1000 mM KCl
50 mM MgCl₂
100 mM sulfato de amonio
50 ug/ml de BSA (Fracción V).

AMORTIGUADOR DE LIGASA 10X

60 mM Tris.HCl, pH 7.6
60 mM MgCl₂
500 mM NaCl
10 mM DTT
60 mM 2-mercaptoetanol
1 mg/ml BSA (Fracción V) opcional.
10 mM espermidina.

AMORTIGUADOR DE CINASA 10 X
500 mM Tris.HCL, pH 7.5
100 mM MgCl₂
10 mM EDTA

AMORTIGUADOR DE LIGASA (VECTOR)
500 mM Tris.HCL, pH 8
70 mM MgCl₂
10 mM DTT

AMORTIGUADOR DE PCR
200 mM (NH₄)₂SO₄
700 mM Tris pH 8.8
20 mM MgCl₂
1 mg/ml BSA (Fracción V)
1 % Tritón

AMORTIGUADOR DE TFB 1X
100 mM RbCl
45 mM MnCl₂.4 H₂O
50 mM CaCl₂.2 H₂O
10 mM MES

GEL ALCALINO DE AGAROSA AL 1%

1. - Preparación de soluciones:
Amortiguador de muestra:
50 mM NaOH
1 mM EDTA
2.5% Ficoll 400
.025% Verde de bromocresol en H₂O.

Amortiguador de electroforesis (1 L).

30 mM NaOH
1 mM EDTA

- 2.- Disolver hirviendo 1 gr de agarosa en 100 ml de: NaCl 10 mM, EDTA 1 mM.
- 3.- Vaciar el gel en un aparato de electroforesis, esperar hasta que solidifique.
- 4.- Sumergir el gel aproximadamente 30 min en amortiguador de electroforesis.
- 5.- Adicionar las muestra manteniendo una relación de 1 ul de cDNA por cada 6 ul de amortiguador de muestra.
- 6.- Correr la electroforesis a 20-40 volts, hasta que el colorante ha recorrido 1/2-3/4 del gel.
- 7.- Lavar el gel en TCA al 10% por 15 min.
- 8.- Lavar el gel brevemente en agua destilada.
- 9.- Secar el gel sobre papel Whatman 3 MM con un secador de geles (no usar calor) o bien a temperatura ambiente toda la noche.

10.- Exponer el gel a placas de rayos X-Omat de Kodak.

Nota: Para la realización de este protocolo, estándares de DNA de tamaño conocido marcados con ³²P son indispensables

GEL DE TRIS-ACETATO (TAE) AL 1x

- 1.- Preparación de soluciones:
Amortiguador de muestra (6X).
0.25% Azul de bromofenol
15 % Ficoll 400 en H₂O

Preparación de TAE 50X (1 L)

Tris base.....	242	gr
Acido acético glacial.....	51.7	ml
EDTA (0.5 M, pH 8).....	100	ml

- 2.- Disolver hirviendo 1 gr de agarosa en 100 ml de TAE 1X (0.04 M Tris-acetatos; 0.001 M EDTA).
- 3.- Vaciar la agarosa en el aparato de electroforesis y esperar a que solidifique.
- 4.- Sumergir el gel en amortiguador de TAE 1X.
- 5.- Adicionar las muestras de DNA, guardando una relación de 1 ul de muestra por cada 6 ul de amortiguador de muestra.
- 6.- Correr la electroforesis a 5 volts/cm, hasta que el colorante ha migrado 1/4, 1/2 o 3/4 del gel, según el caso.
- 7.- El gel es teñido con bromuro de etidio (0.5 ug/ml) disuelto en agua destilada, por 15 min y visualizado en un transiluminador de UV de onda larga. Tomar fotografía (opcional).
- 8.- Para la recuperación de fragmentos de DNA, recorte con un bisturí, la banda del DNA de interés, tomando como referencia los marcadores de DNA.

Nota: No exponga demasiado el DNA a la luz UV, debido a que la UV hace cortes "nicks" en el DNA.

VIII. BIBLIOGRAFIA

- Acevedo-Hernández, A.** (1982) Economic impact of porcine cysticercosis. In *Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives*. Flisser, A., Willms, K., Lacleste, J.P., Larralde, C., Ridaura, C. and Beltrán, F. (eds). Academic Press, New York. 47.
- Acevedo-Hernández, A.** (1989) Epidemiología de la cisticercosis porcina. En: *Cisticercosis humana y porcina. Su conocimiento e investigación*. Flisser, A. y Malagón, F. (eds). Limusa. México, 251.
- Aluja, A.** (1982) Frequency of porcine cysticercosis in México. In *Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives*. Flisser, A., Willms, K., Lacleste, J.P., Larralde, C., Ridaura, C., Beltrán, F. (eds). New York: Academic Press. 532.
- Aluja, A. y Vargas, G.** (1988) The histopathology of porcine cysticercosis. *Vet. Parasitol.* 28: 65.
- Allan, J.C. y Craig, P.S.** (1989) Coproantigens in gut tapeworm infections: *Hymenolepis diminuta* in rats. *Parasitol. Res.* 76: 68.
- Allan, J.C., Avila, G., Garcia Noval, J. Flisser, A. y Craig, P.S.** (1990) Immunodiagnosis of taeniasis by coproantigen detection. *Parasitology* 101: 473.
- Andrews, P. Thomas, H. Fohler, R. y Subert, J.** (1983) Praziquantel. *Med. Res. Rev.* 3: 147.
- Andrews, P.** (1985) Praziquantel: Mechanism of antischistosomal activity. *Pharmacology and Therapeutics* 29: 129.
- Asada, J., Otagaki, K., Kaji, F., Aokage, K. y Ochi, G.** (1956) On the longevity and development of the pork and beef tapeworms in human host. *Tokio Iji Shinshi*, 153.
- Ash, L.R. y Orihel, T.C.** (1987) *Parasites: Guide to laboratory procedures and identification*. Chicago: ASCP Press. 256.
- Ashall, F. y Miles, M.A.** (1988) Diagnosis of parasitic diseases using DNA-DNA hybridizations. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 82: 235.
- Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R., Moore, D., Smith, J., Seidman, J. y Struhl, K.** (1987) *Current protocols in molecular biology*. John Wiley & Sons, New York.
- Aviv, H. y Leder, P.** (1972) Purification of biologically active globin messenger RNA by chromatography on oligothymidylic acid-cellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 69: 1408.
- Barker, D.C.** (1989) Molecular approaches to DNA diagnosis. *Parasitology.* 99: S125.
- Beaver, P.C., Jung, R.C. y Cupp, E.W.** (1984) *Clinical Parasitology*. 9th Ed. Philadelphia: Lea & Febiger. 512.
- Benton, W.D. y Davis, R.W.** (1977) Screening lambda gt11 recombinant clones by hybridization to single plaques in situ. *Science.* 196: 180.

- Bogh, H.O., Rickard, M.D. y Lightowers, M.W. (1988) Studies on stage-specific immunity against *Taenia taeniaeformis* metacestodes in mice. *Parasite Immunol.* 10: 255.
- Bowtell, D.D.L., Saint, R.B., Rickard, M.D. y Mitchell, G. (1984) Expression of *Taenia taeniaeformis* antigens in *Escherichia coli*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 13: 173.
- Brindley, P. y Sher, A. (1987) The chemotherapeutic effect of praziquantel against *Schistosoma mansoni* is dependent on host antibody response. *J. Immunol.* 139: 215.
- Busch, S. y Sassone-Corsi, P. (1990) Dimers, leucine zippers and DNA-binding domains. *TIG.* 6: 36.
- Campos, A., Bernard, P., Fauconnier, A., Landa, A., Gómez, E., Hernández, R., Willis, K. y Lacllette, J.F. (1990) Cloning and sequencing of two actin genes from *Taenia solium* (Cestoda). *Mol. Biochem. Parasitol.* 40: 87.
- Cármenes, R., Freije, J., Molina, M. y Martín J. (1989) Predict7, A Program for protein structure prediction. *Biochem and Biophysical Research Communications.* 159(2): 687.
- Chenoweth, D. (1986) Complement mediators of inflammation. En: *Immunobiology of the complement system*, Ross, G.D. (ed). Orlando: Academic Press. 63.
- Chirgwin, J.M., Praybyla, A.E., MacDonald, R.J. y Rutter, W.J. (1979) Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochem.* 18: 5294.
- Cohen, C. y Parry, D.A. (1986) Alfa helical coiled coils a widespread motif in proteins. *Trends Biochem. Sci.* 11:245.
- Contreras, C. L. (1989) Aspectos más sobresalientes de la inspección sanitaria de suínos en los rastros del D.F y en otros del país en busca del cisticerco de *Taenia solium*. En *Cisticercosis humana y porcina. Su conocimiento e investigación en México*. Linusa-Noriega, México. 257.
- Cougle, W.G., Lightowers, M.W., Henrik, B.O. Rickard, M.D. y Johnson, K.S. (1991) Molecular cloning of *Taenia taeniaeformis* oncosphere antigen genes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 45: 137.
- Corona, T., Pascoe, D., Gonzalez-Barranco, D., Abad, P., Landa, C. y Estanol, B. (1986) Anticysticercosis antibodies in serum and cerebrospinal fluid in patients with cerebral cysticercosis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 49: 1044.
- Correa, D., Sandoval, M.A., Harrison, L.J.S., Parkhouse, R.M.E. Plancarte, A., Mesa-Lucas, A. y Flisser, A. (1989) Human neuro cysticercosis: comparison of enzyme immunoassay capture techniques based on monoclonal and polyclonal antibodies for the detection of parasite products in cerebrospinal fluid. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 83: 814
- Días, S. (1983) Síntesis de anticuerpos en la reacción inflamatoria al cisticerco de la *Taenia solium* en el músculo porcino. Tesis de Maestría. Facultad de Medicina, UNAM, México.

- Díaz-Camacho, S., Candil-Ruiz, A., Uribe-Beltrán, M. y Willms, K. (1989) Epidemiología de teniasis/cisticercosis en una comunidad de Sinaloa. En: Cisticercosis humana y porcina. Su conocimiento e investigación en México. Flisser, A., Malagón, F. (eds). Limusa, México. 243.
- Divan, A.R., Coker-Van, M., Brown, M., Sibianto, D.B., Yolken, R. Desovits, R., Escobar, A., Gibbs, C. y Gadjusek, C. (1982) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibody to cysticerci of *Taenia solium*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 31: 364.
- Earnest, M.F., Keller, L.B., Filley, C.M. y Grek, A (1987) Neurocysticercosis in the United States: 35 cases and review. *Rev. Infect. Dis.* 9: 961.
- Emini, E., Hughes, J., Verlow, D. y Boger, J. (1985) Induction of hepatitis A virus-neutralizing antibodies by a virus-specific synthetic peptide. *J. Virol.* 55: 836.
- Escobedo, F. (1989) Tratamiento de cisticercosis teniasis humana. En Cisticercosis humana y porcina. Su conocimiento e investigación en México. Flisser, A., Malagón, F. (eds). Limusa-Noriega, México. 205.
- Estanol, B., Corona, T. y Abad, F. J. (1986) A prognostic classification of cerebral cysticercosis: therapeutic implications. *Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 49, 1131.
- Espinosa, B., Ruiz-Palacios, G., Tevar, A. Sandoval, M.A. Plancarte, A. y Flisser, A. (1986) Response in patients with neurocysticercosis and its application in immunodiagnosis. *J. Clin. Microbiol.* 24: 536.
- Flisser, A. (1980) The immunology of human cysticercosis. In *Molecules, cells and parasites in immunology*. Larralde, C., Willms, New York, Academic Press. 125.
- Flisser, A., Woodhouse, E. y Larralde, C. (1980) Human cysticercosis: antigens, antibodies and non-responders. *Clin. Exp. Immunol.* 39: 27.
- Flisser, A., Plancarte, A., Espinosa, B., Woodhouse, E., Rivera, L., Trueta, T., Yakoleff-Greenhouse, V., Sierra, A., Lacroette, J.P., Cañedo, L. y Larralde, C. (1983) The immune status of patients with cysticercosis. *Afr. Clin. Exp. Immunol.* 3: 183.
- Flisser, A. (1985) Cysticercosis: a major threat to human health and livestock production. *Food Technology.* 39: 61.
- Flisser, A. (1988) Neurocysticercosis in México. *Parasitology Today.* 4(5): 131.
- Flisser, A., Reid, A., García-Sepeda, E. y McManus, D.P. (1988) Specific detection of *Taenia saginata* eggs by DNA hybridisation. *Lancet*, II: 1429.
- Flisser, A., González, D., Rodríguez-Carbajal, J., Shkurovich, M., Cohen, S., Collado, M., Madrano, I., Plancarte, A., Tevar, A., Ostrosky, P., Montero, R., Correa, D. Rodríguez-Del Rosal, E. y Aluja, A. (1989) Tratamiento de la cisticercosis porcina con Praziquantel. En Cisticercosis humana y porcina. Su conocimiento e investigación en México. Flisser, A., Malagón, F. (eds). Limusa-Noriega, México. 227.

- Flisser, A., Delgado, V. y McLaren, J.M. (1989) *Schistosoma mansoni*: enhanced efficacy of Praziquantel treatment in immune mice. 11: 319.
- Flisser, A. y McLaren, D. (1989) Effect of praziquantel treatment of lung-stage larvae of *Schistosoma mansoni* in vivo. 98: 203.
- Flores-Barroeta, L. y Bifano, A. (1965) Cisticercosis en los perros *Canis familiaris* de la Cd. de México. Acta Médica de México. 1: 27.
- Frankel, A. y Kim, P. (1991) Modular structure of transcription factors: Implications for gene regulation. Cell 65: 717.
- Gallie, G.J. y Sewell, M.M.E. (1972) The survival of *Cysticercus bovis* in resistant calves. Vet. Rec. 91: 481.
- Gallie, G.J. y Sewell, M.M.E. (1974) The serological response of three months old calves to infection with *Taenia saginata* (*Cysticercus bovis*) and their resistance to reinfection. Trop. Anim. Hlth and Prod. 6: 163.
- Gallie, G.J. y Sewell, M.M.E. (1976) Experimental immunization of six month old calves against infection with the *Cysticercus* stage of *Taenia saginata*. Trop. Animal Hlth and Prod. 8: 233.
- Gallie, G.J. y Sewell, M.M.E. (1981) Inoculation of calves and cattle with oncospheres of *Taenia saginata* and their resistance to reinfection. Trop. Anim. Hlth and Prod. 13: 147.
- Garnier, J., Osguthorpe, D. and Robson, D. (1978) Analysis of the accuracy and implications of simple methods for predicting the secondary structure of globular proteins. J. Mol. Biol. 120: 97-120.
- Gemell, M., Matyas, E., Pawlowsky, S. Soulsby, E.J Larralde, C., Nelson, G.S y Rosicky, B. (1985) Guidelines for surveillance prevention and control of taeniasis-cysticercosis. WHO, Geneva, 46.
- Gibbens, J.C., Harrison, L.J.S. y Parkhouse, R.M.E. (1986) Immunoglobulin class response to *Taenia taeniaeformis* in susceptible and resistant mice. Parasite Immunol. 8:491.
- Gubler, U. y Hoffman, B.J.. (1983) A simple and very efficient method for generating cDNA libraries. Gene. 25:263.
- Gottstein, B., Tsang, V.C.W., Schantz, P.M. (1986) Demonstration of species-specific and cross-reactive components of *Taenia solium* metacestode antigens. Amer. J. Trop. Med. Hyg. 35: 308.
- Gottstein, B., Sini, D. y Schantz, P.M. (1987) Species-specific immunodiagnosis of *Taenia solium* cysticercosis by ELISA and immunoblotting. Trop. Med. Parasitol. 38: 299.
- Granda, A.G., Tuyen, L.K., Asikia, M., Davis, T.B., Philipp, M., Cohen, C. y McKeayolds, L.A. (1989) A Lambda gt11 cDNA recombinant that encodes *Dirofilaria immitis* paramyosin. Mol. Biochem. Parasitol. 35: 31.
- Grogl, M., Estrada, J.J., Mac Donald, G. Kuhn, R.E. (1985) Antigen-antibody analysis in neurocysticercosis. J. Parasitol. 71: 433.

- Groll, E. (1980) Praziquantel for cestode infections in man. *Acta Trop.* 37: 293.
- Groll, E. W. (1982) Chemotherapy of human cysticercosis with Praziquantel. In *Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives*. Flisser, A., Willms, K., Laclette, J.P., Larralde, C., Ridaura, C. y Beltrán, F. (eds). Academic Press, New York. 207.
- Grossman, S., Ram, D., Markovics, A., Tarrab-Hasdai, E., Lantner, F., Siv, E. and Schechter, I. (1990) Schistosoma mansoni: Stage-specific expression of muscle-specific genes. *Exp. Parasitol.* 70, 62-71.
- Guan, C., Li, P., Riggs, P.D. y Inouye, H. (1987) Vectors that facilitate the expression and purification of foreign peptides in *Escherichia coli* by fusion to maltose-binding protein. *Gene* 67: 21.
- Guerra, G., Flisser, A., Cañedo, L. y Laclette, J.P. (1982) Biochemical and immunological characterization of antigen B purified from cysticerci of *Taenia solium*. In *Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives*. Flisser, A., Willms, K., Laclette, J.P., Larralde, C., Ridaura, C. and Beltrán, F. (eds). New York, Academic Press. 437.
- Han, J.H., Stratova, C. y Rutter, W.J. (1987) Isolation of full-length putative rat lysophospholipase cDNA using improved methods for mRNA isolation and cDNA cloning. *Biochemistry.* 26: 1617.
- Harrison, L.J.S., Delgado, J. y Parkhouse, R.M.E. (1987) Differentiation of *Taenia saginata* and *Taenia solium* by the use of cloned DNA fragments. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. and Hyg.* 82: 174.
- Harrison, L.J.S., Delgado, J. y Parkhouse, R.M.E. (1988) DNA probes in the differentiation of human *Taenia saginata* and *Taenia solium* infection. *Roy. Soc. Trop. Med. and Hyg.* 82: 939.
- Harrison, L.J.S. y Parkhouse, R.M.E. (1989) *Taenia saginata* and *Taenia solium*: Reciprocal Models. *Acta Leidensia.* 57(2): 143.
- Harrison, L.J.S. y Parkhouse, R.M.E. (1985) Antigens of taeniid cestodes in protection, diagnosis and escape. *Curr. Top. Immunol.* 120: 159.
- Harrison, L.J.S. y Parkhouse, R.M.E. (1986) Passive protection against *T. saginata* infection in cattle by mouse monoclonal antibody reactive with the surface of the invasive oncosphere. *Parasite Immunol.* 8: 319.
- Hartree, E.F. (1972) Determination of protein: A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal. Biochem.* 48: 422.
- Hird, W. y Pullen, M. (1979) Tapeworms, meat and man: A brief review and update of cysticercosis caused by *Taenia saginata* and *Taenia solium*. *J. Food Protection.* 42: 58.

- Hemmings L. and McMannus D.F. (1991) The diagnostic molecular characterization of an *Echinococcus multilocularis* antigen clone. *Mol. Biochem. Parasitol.* 44: 53.
- Howell, M.J. y Hargreaves, J.J. (1988) Cloning and expression of *Taenia ovis* antigens in *Escherichia coli*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 28: 21.
- Howell, M.J. and Hargreaves, J.J. (1989) Characterization of cloned antigens of *taenia ovis*. *Int. J. of Parasitol.* 19(6): 631.
- Huyah, T.V., Young, R.A. y Davis, R.W. (1985) Constructing and screening cDNA libraries in Lambda gt10 y Lambda gt11. En: *DNA Cloning*. Glover, D. (ed). IRL Press, Oxford. Vol. I, 49.
- Inclan, M.C. (1980) Comparación de las técnicas de inspección sanitaria e inmunoelectroforesis en el diagnóstico de la cisticercosis porcina. Tesis. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM.
- Ito, A, Begg, H.O., Lightowlers, M.W., Mitchell, G.F., Takami, T., Kamiya, M., Onitake, K. y Rickard, M.D. (1991) Vaccination against *Taenia taeniaeformis* infection in rats using a recombinant protein and preliminary analysis of the induced antibody response. *Mol. Biochem. Parasitol.* 44: 43.
- Jacobson, A. (1987) Purification and fractionation of poli(A)⁺ RNA. In: *Preparation and characterization of RNA. Methods Enzymol.* Berger, S. y Kimmel, A. (eds). Academic Press, Orlando, Florida. 152: 254.
- Janin, J., Wodak, S., Levit, M. y Maigret, M. (1978) Conformation of amino acid side-chains in proteins. *J. Mol. Biol.* 125: 357.
- Johnson, K.S., Harrison, G.B.L., Lightowlers, M.W., O'Hey, K.L., Coughle, W.G., Dempster, R.P., Lawrence, S.B., Vinton, J.G., Heath, D.D. y Rickard, M.D. (1989) Vaccination against ovine cysticercosis using a defined recombinant antigen. *Nature.* 338: 585.
- Jones, M. (1990) Transcriptional regulation by dimerization: Two sides to an incestuous relationship. *cell* 61: 9.
- Joshua, G.W.F., Harrison, L.J.S. y Sewell, M.M.H. (1988) Excreted/secreted proteins of *Taenia saginata* metacestodes. *Parasitology in Press.* Buscar).
- Kagawa, H., Gengyo, K. McLachlan, A.D., Brenner, S. y Kara, J. (1989) The paramyosin gene (unc-15) of *Caenorhabditis elegans*: molecular cloning, nucleotide sequence and models for thick filament assembly. *J. Mol. Biol.* 207: 311.
- Kedes, L.H. *Ann. Rev. Biochem.* Smell, E., Boyer, F., Meister, A. y Richardson, C. (1979) Histones genes and histone messengers *Ann. Rev. Biochem.* 48: 837.
- Kellerman, O. y Ferenci, T. (1982) Maltose-binding protein from *Escherichia coli*. En: *Methods Enzymol.* 90: 459.

- Krets, P.L., Reid, C.H., Greener, y Short, J.M. (1989) Effect of lambda packing extract mcr restriction activity on DNA cloning. *Nucleic Acid Researc.* 17: 5409.
- Kyte, J. and Doolittle, R.F. (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 157: 105.
- Laclette, J.P., Ornelas, Y., Merchant, M.T. y Willms, K. (1982) Ultrastructure of the surrounding envelopes of *Taenia solium* eggs. En *Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives.* Flisser, A., Willms, K., Laclette, J.P., Larralde, C., Ridaura, C. y Beltrán, F. (eds). Academic Press, New York. 375.
- Laclette, J.P., Merchant, M.T., y Willms, K. (1987) Histological and ultrastructural localization of antigen B in the metacestode of *Taenia solium*. *J. Parasitol.* 73: 121.
- Laclette, J.P., Rodrigues, M., Landa, A., Arcos, L., De Alba, P., Mancilla, R. y Willms, K. (1989) The coexistence of *Taenia solium* cysticerci and the pig: Role of antigen B. *Acta Leidensia.* 57(2): 115.
- Laclette, J.P., Alagón, A., Willms, K. y Torre-Blanco, A. (1990) Purification of antigen B from *Taenia solium* Cysticerci by affinity to Mammalian collagen. *J. Parasitol.* 76: 273.
- Laclette, J.P., Landa, A., Arcos, L., Willms, K., Davis, A.E. y Shoemaker, Ch. (1991) Paramyosin is the *Schistosoma mansoni* (Trematoda) homologue of antigen B from *Taenia solium* (Cestoda). *Mol. Biochem. Parasitol.* 44: 287.
- Laclette, J.P., Shoemaker, C.B., Richter, D., Arcos, L., Pante, N., Cohen, C., Bing, D. and Weller, M. (1992) Paramyosin inhibits complement C1. *J. Immunol.* 148: 124.
- Laemmli, U.K. (1979) Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680.
- Landa, A. (1988) Estudio de las glicoproteínas de superficie de cisticerco de la *Taenia solium*. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias, UNAM, México.
- Lanar, D.B., Pearce, E.J., James, S.L. y Sher, A. (1986) Identification of paramyosin as Schistosome antigen recognized by intradermally vaccinated mice. *Science* 234: 593.
- Larralde, C., Laclette, J.P., Owen, C.S., Madraso, I., Sandoval, M., Bejail, R., Sciutto, E., Contreras, L., Arate, J., Diza, M.L., Govenensky, T., Montoya, R.M., Goodsaid, F. (1986) Reliable serology of *Taenia solium* cysticercosis with antigens from cyst vesicular fluid: Elisa and hemagglutination tests. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 35: 965.
- Larralde, C., Flisser, A. y Pérez-Montfort, R. (1982) Vaccination against cysticercosis. Perspectives on the immunological prevention. En *Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives.* Flisser, A., Willms, K., Laclette, J.P., Larralde, C., Ridaura, C., Beltran, F. (eds). Academic Press, New York. 675.

- Laskey, R. y Mills, A. (1975) Quantitative film detection of ^3H and ^{14}C in polyacrylamide gels by fluorography. Eur. J. Biochem. 56: 335.
- Lehrach, K., Diamond, D., Wosney, J.M. y Boedtker, H.W. (1977) RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination. Biochemistry 16: 4743.
- LeGrendre, N. y Matsudaira, P. (1988) Direct protein microsequencing from immobilized-P transfer membrane. Biotechniques. 6: 154.
- Letonja, T. y Hammerberg, C. (1978) Taenia taeniaeformis: early inflammatory response around developing metacystodes in the liver of resistant and susceptible mice. II. Histochemistry and cytochemistry. J. Parasitol. 73: 971.
- Letonja, T. y Hammerberg, C. (1987) Taenia taeniaeformis: early inflammatory response around developing metacystode in the liver of resistant and susceptible mice. Identification of leucocyte response with the monoclonal antibodies. J. Parasit. 73: 962.
- Limberger, R.J. y McReynolds, L.A. (1990) Filarial paramyosin: cDNA sequences from *Dirofilaria immitis* and *Onchocerca volvulus*. Mol. Biochem. Parasitol. 38: 271.
- Lipman, D.J. y Pearson, W.R. (1985) Rapid and sensitive protein similarity searches. Science 227: 1435.
- Lombardo, L., Mateos, J.E. y Estañol, B. (1982) La cisticercosis cerebral en México. Gac. Med. Méx. 118: 1.
- Lloyd, S. y Soulsby, E.J.L. (1976) Passive transfer of immunity to neonatal calves against metacystodes of Taenia saginata. Vet. Parasit. 2: 355.
- Lumsden, R.D. (1966) Cytological studies on the absorptive surface of cestode. II. The synthesis and intracellular transport of protein in the strobilar integument. Zeitschr. Parasitenk. 28: 1.
- MacDonald, R.J., Swift, G.H., Praybyla, A.E., Chirgwin, J.M. (1987) Methods Enzymol. Berger, S. y Kimmel, A. (eds). Academic Press, Orlando Florida. 152: 219.
- McLachlan, A.D., y Karn, J. (1982) Periodic charge distributions in the myosin rod amino acid sequence match cross-bridge spacing in muscle. Nature 299: 226.
- Maina, C., Riggs, P., Grandea III, A., Slatko, B., Moran, L., Tagliamonte, J., McReynolds, L. y Guan, C. (1988) An Echerichia coli vector to express and purify foreign proteins by fusion to and separation from maltose-binding protein. Gene 74, 365.
- Margulis, L. y Schwartz, K.V. (1976) Five kingdoms. W.H. Freeman, San Francisco; 338.
- Matsudaira, P. (1987) Sequences from picomole quantities of proteins electrophoretically transferred onto polyvinylidene difluoride membranes. J. Biol. Chem. 262: 10035.
- Matsumoto, Y., Perry, G., Levine, R., Blanton, R., Mahmoud, A. y Aikawa, M. (1988) Paramyosin and actin in schistosomal teguments. Nature 333: 76.

- Mahajan, B. (1982) Geographical distribution of human cysticercosis. En: Cysticercosis. Present state of knowledge and perspectives. Flisser, A., Willms, K., Lachette, J.P., Larralde, C., Ridaura, C., Beltrán, F. (eds). New York, Academic Press. 39.
- Massotti, L. (1944) Presencia de huevecillos de Tenia en la región perianal. Rev. Inst. Salubridad y enfermedades Tropicales México. 5: 153.
- Massotti, L., Dávalos, A. y Martínez, M.R. (1965) Infecciones naturales y experimentales por *Cysticercus cellulosae* en diferentes especies de mamíferos. Revista del Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales (México). 25: 151.
- Miller, B., Goldberg, M.A. Meiner, D.G., Myers, A. y Goldberg, A. (1984) A new immunologic test for CNS cysticercosis. Neurology. 34: 695.
- Mohammad, I.M., Meiner, D.C. Miller, B.L. Goldberg, M.A. y Kagan, I.G. (1984) Enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of cerebral cysticercosis. J. Clin. Microbiol. 20: 775.
- Molinari, J.L., Mesa, R., Suarez, B., Palacios, S., Tato, P. y Retana, A. (1983) *Taenia solium*: Immunity in hogs to the cysticercus. Exp. Parasitol. 55: 340.
- Molinari, J.L., Mesa, R. y Tato, P. (1983) *T. solium*: Cellular reactions in the larvae (*Cysticercus cellulosae*) in naturally parasitized, immunized hogs. Exp. Parasitol. 56: 327.
- Moos, M., Nguyen, N. y Liu T.Y. (1988) Reproducible high yield sequencing of proteins electrophoretically separated and transferred to an inert support. J. Biol. Chem. 263: 6005.
- Müller, M., Gottstein, B., Monique, Vogel, M., Flury, K. y Seebeck, T. (1989) Application of a recombinant *Echinococcus multilocularis* antigen in an Enzyme-linked immunosorbent assay for immunodiagnosis of human alveolar echinococcosis. Mol. Biochem. Parasitol. 36: 151.
- Murrell, J.C. y Roberts, L.M. (1989) Understanding genetic engineering. Ellis Horwood Limited, Chichester; West Sussex; England.
- Nagai, K. y Thøgersen, E. C. (1987) Synthesis and sequence-specific proteolysis of hybrid proteins produced in *Escherichia coli*. En: Methods Enzymol. 153: 461.
- Nascimento, E., Tavares, C.A., Lopes, J.D. (1987) Immunodiagnosis of human cysticercosis (*Taenia solium*) with antigens purified by monoclonal antibodies. J. Clin. Micro. 25: 1181.
- Nascimento, E., Moqueira, F.M.F., Tavares, C.A.F. (1987) Improved immunodiagnosis of human cysticercosis with scolex protein antigens. Parasitol. Res. 73: 446.
- Nieto, D. (1956) Cysticercosis of the nervous system. Diagnosis by means of the spinal fluid complement fixation test. Neurology. 6: 725.

- Oaks, J. y Lumsden, R.D. (1971) Cytological studies on the absorptive surface of cestodes. V. Incorporation of carbohydrate containing macromolecules into tegument membranes. *J. Parasitol.* 1256.
- Okayama, H. y Berg, P. (1982) High efficiency cloning of full-length cDNA. *Mol. Cell. Biol.* 2: 161.
- Olive, A., Flancarte, A. y Flisser, A. (1988) Presence of antigen B from *Taenia solium* cysticercus in other Platyhelminthes. *Int. J. Parasitol.* 18: 543.
- Palmier, R.D. (1973) Ovalbumin messenger ribonucleic acid translation. Comparable rates of polypeptide initiation and elongation on ovalbumin and globulin messenger ribonucleic acid in a rabbit reticulocyte lysate. *J. Biol. Chem.* 248:2095.
- Panenter, H.D., Rossow, E.J. Epstein, S.R. (1987) Diagnosis of neurocysticercosis by enzyme-linked immunosorbent assay. *S. Afr. Med. J.* 71: 512.
- Parkhouse, R.M.E. y Harrison, L.J.S. (1987) Cyst fluid and surface associated glycoprotein antigens of *Taenia* sp. metacestodes. *Parasite Immunol.* 9:263.
- Pawlowski, S., Sosakiewicz, B. y Wroblewski, M. (1978) The efficacy of mebendazol and praziquantel against *Taenia saginata* cysticercosis in cattle. *Vet. Sci. Communic.* 2: 137.
- Perry, D.A. (1975) Analysis of the primary structure of alfa-tropomyosin. *J. Mol. Biol.* 98: 519.
- Pawlowsky, S. (1982) Epidemiology and prevention of *Taenia saginata* infection. En *Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives*. Flisser, A., Willms, K., Lacleste, C., Ridaura, C., Beltrán, F. (eds). Academic Press, New York. 69.
- Pearce, E.J., James, S.L., Dalton, J., Barrall, A., Ramos, C., Strand, M. y Sher, A. (1986) Immunochemical characterization and purification of Sm-97, a *Schistosoma mansoni* antigen nonspecifically recognized by antibodies from mice protectively immunized with a non-living vaccine. *J. Immunol.* 137:3593.
- Pearce, E.J., James, S.L., Lanar, D.E., y Sher, A. (1988) Induction of protective immunity against *Schistosoma mansoni* by vaccination with schistosoma paramyosin (Sm97), a nonsurface parasitic antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 5678.
- Felham, H. y Jackson, R. (1976) An efficient mRNA-dependent translation system from reticulocyte lysates. *Eur. J. Biochem.* 67: 247.
- Phillips, G., Fillers, J., Cohen, C. (1986) Tropomyosin crystal structure and muscle regulation. *J. Mol. Biol.* 192: 111.

- Plancarte, A., Flisser, A. y Larralde, C. (1982) Fibronectin-like properties of antigen B from cysticerci of *Taenia solium*. En *Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives*. Flisser, A., Willms, K., Laclette, J.P., Larralde, C., Ridaura, C. and Beltrán, F. (eds). New York. Academic Press. 453.
- Plancarte, A., Flisser, A. y Larralde, C. (1983) Fibronectin-like properties of antigen B from the cysticercosis of *Taenia solium*. *Cytobios*. 36: 83.
- Podack, E.R. (1980) Assembly and function of the terminal components. In *immunobiology of the complement system*. Ross, G.D. (ed). Orlando: Academic Press. 115-37.
- Ramirez-Bon, E., Merchant, M.F., González-Del Pliego, M., Cañedo, L. (1982) Ultrastructure of the bladder wall worm of the metacestode of *Taenia solium*. En *Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives*. Flisser, A. Willms, K. Laclette, J.P., Larralde, C., Ridaura, C. y Beltrán, F. (eds). New York, Academic Press. 261.
- Rickard, M.D. y Bell, K.J. (1971) Induction of immunity of lambs to a larval cestode by diffusible antigens. *Nature*. 232: 120.
- Rickard, M.D. y Bell, K.J. (1971) Successful vaccination of lambs against infection with *Taenia ovis* using antigens produced during in vitro culturation of their larval stages. *Res. Vet. Sci*. 12: 401.
- Rickard, M.D. y Adelf, A.J. (1977) Vaccination of lambs against infection with *Taenia ovis* using antigens collected during short-term in vitro incubation of activated *T. ovis* oncosphere. *Parasitol*. 75: 183.
- Rickard, M.D., Boddington, E.B. y McQuade, M. (1977) Vaccination of lambs against *Taenia ovis* infection using antigens collected during in vitro culturation of larvae: passive protection via colostrum from vaccinated ewes and the duration of immunity from a single vaccination. *Res. Vet. Sci*. 23: 368.
- Rickard, M.D. y Brumley, J.L. (1981) Immunization of calves against *Taenia saginata* infection using antigens collected by in vitro incubation of *Taenia saginata* oncospheres or ultrasonic disintegration of *Taenia saginata* and *T. hydatigena* oncospheres. *Res. Vet. Sci*. 30: 99.
- Rijpstra, A.C., Smit, A. M., Swellengrebel, N.H. (1981) How and where to search for the ova of *Taenia saginata*. *Trop. Geogr. Med*. 13: 160.
- Rishi, A.K. y McManus, D.P. (1987) DNA probes which unambiguously distinguish *Taenia solium* from *Taenia saginata*. *The Lancet*. 28: 1275.
- Rishi, A.K. y McManus, D.P. (1988) Molecular cloning of *Taenia solium* genomic characterization of taeniid cestodes by DNA analysis. *Parasitology*. 97: 161.

- Romero, C.F. (1980) Frecuencia de anticuerpos séricos anti-cisticercos cellulosa por inmunoelectroforesis en cerdos sacrificados en el Rastro Municipal de Ecatepec. Tesis. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM.
- Rosas, M., Sotelo, J., Nieto, D. (1986) ELISA in the diagnosis of neurocysticercosis. Arch. Neurol. 43: 53.
- Rydzewski, A. K., Chisholm, E.S. y Kagan, I.G. (1975) Comparison of serologic tests for human cysticercosis by indirect hemagglutination, indirect immunofluorescent antibody and agar precipitin test. J. Parasit. 61: 154.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. (1989) Molecular cloning. A laboratory Manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, New York.
- Sandoval, M. (1989) Tratamiento de la cisticercosis con Praziquantel. En Cisticercosis humana y porcina. Su conocimiento e investigación en México. Flisser, A., Malagón, F. (eds). Limusa-Noriega, México. 215.
- Sanger, F., Nicklen, S., y Coulson, A. (1977) DNA sequencing with chain terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 74: 5463.
- Schantz, P.M., Shanks, D., Wilson, M. (1980) Serologic cross-reactions with sera from patients with echinococcosis and cysticercosis. Am. J. Trop. Med. Hyg. 21: 609.
- Schantz, P.M. y Sarti-Gutierrez, E. (1989) Diagnostic methods and epidemiologic surveillance of Taenia solium infection. Acta Leidensia. 57(2): 153.
- Secretaría de Salud. Diario oficial. (1984) México. 24: 11.
- Silverman, P. (1954) Studies on the biology on some tapeworms of the genus Taenia. II. The morphology and development of the taeniid hexacanth embryo and its enclosing membranes, with some notes on the state of development and propagation of gravid segments. Ann. Trop. Med. and Parasitol. 48: 536.
- Smyth, D.G. (1967) Techniques in enzymic hidrolisis. Section V. Cleavage of peptide chains. En Methods in Enzymology Vol. XI (Enzyme structure). Ed. Hirs, C. Academic Press, New York; 214.
- Sotelo, J., Guerrero, V. y Rubio-Donnadieu, F. (1985) Neurocysticercosis: a new clasification based on active and inactive forms. Study of 753 cases. Arch. Intern. Med. 145: 442.
- Soulsby, E.J.L. (1982) Helminths, Arthropods and Protozoa of Domesticated animals, 7th Edn. London: Bailliere and Tynal.
- Soulsby, E.J.L. y Lloyd, S. (1982) Passive immunization in cysticercosis: characterization of the antibodies concerned. Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives. Flisser, A. et al. (eds). New York: Academic Press. 539.
- Southern, E.M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98: 503.

- Sutton, R.J. (1979) The passive transfer of immunity to *Taenia ovis* in lambs via colostrum. *Res. Vet. Sci.* 27: 197.
- Tay, J., Salazar, P., de Haro, I. (1976) Frecuencia de las helmintiasis en México. *Inv. Salud Públ. Méx.* 36: 241.
- Taylor, J.M. (1979) *Ann. Rev. Biochem. Snell, E., Boyer, P., Meister, A. y Richardson, C. (eds).* 48: 681.
- Telles-Girón, E., Ramos, M.C., Dufour, L., Alvarez, P. y Montante, M. (1987) Detection of cysticercus cellulosa antigens in cerebrospinal fluid by dot enzyme linked immunosorbent assay (Dot-ELISA) and standar ELISA. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 37: 169.
- Telles-Girón, E. (1989) Tratamiento de cisticercosis con fluobendazol. En *Cisticercosis humana y porcina. Su conocimiento e investigación en México.* Flisser, A., Malagón, F. (eds). Limusa-Noriega, México. 205.
- Trimble, J. y Lumsden, R.D. (1975) Cytochemical characterization of tegument membrane associated carbohydrates in *Taenia crassiceps* larvae. *J. Parasitol.* 61: 665.
- Tsang, V.C.W., Brand, J.A., Boyer, A.E. (1989) An enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay and glycoprotein antigen for diagnosing human cysticercosis (*Taenia solium*). *J. Infect. Dis.* 59: 50.
- Towbin, H., Staehelin, T. y Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sciences. USA.* 70: 4350.
- Van Keulen, H., Loverde, P., Bobek, L. y Bekosh, D. (1985) Organization of the ribosomal RNA genes in schistosoma mansoni. *Mol. Biochem Parasitol.* 15: 215.
- Velasco-Suarez, M., Bravo, M.A. y Quirasco, F. (1982) Human cysticercosis: Medical implication and economic impact. In *Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives.* Flisser, A., Willms, K., Lacleste, J.P., Larralde, C., Ridaura, C. and Beltrán, F. (eds). Academic Press, New York. 63.
- Verster, A. (1969) A taxonomic revision of the genus *Taenia*. *J. Vet. Res.* 36: 3.
- Vinos, J., Maroto, M., Garesse, R., Marco, R. and Cervera, M. (1992) *Drosophila melanogaster* paraxoyosin: developmental pattern, mapping and properties deduced from its complete coding sequence. *Mol. gen. genet.* 231: 385.
- Vogel, M., Gottstein, B., Müller, W. y Seebach, T. (1988) Production of a recombinant antigen of *Echinococcus multilocularis* with high immunodiagnostic sensitivity and specificity. *Mol. Biochem. Parasitol.* 31: 117.
- Vogelstein, B. y Gillespie, D. (1979) Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76: 615.
- William, M., Johnson, P., McKnight, S. (1988) The leucine Zipper: A hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Research Articles* 240: 1759.

- Willms, K., Dias, S., Merchant, M. y Arcos, L. (1982) Host-parasite interface in the metacestode of *Taenia solium*. In *Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives*. Flisser, A., Willms, K., Lacleste, J.P., Larralde, C., Ridaura, C. and Beltran, F. (eds). New York. Academic Press. 397.
- Willms, K. (1992) Cestodes (Tapeworms). En: *Infectious Diseases*. (Eds. Gorbach, S., Bartlett, J. y Blacklow, N.) W.B. Saunders, Phil; 2115.
- Woodhouse, E., Flisser, A., Larralde, C. (1982) Seroepidemiology of human cysticercosis in México. In *Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives*. Flisser, A., Willms, K., Lacleste, J.P., Larralde, C., Ridaura, C., Beltrán, F. (eds). New York: Academic Press. 11.
- Yoshino, K. (1933) Studies on the post-embryonal development of *Taenia solium*. I. On the hatching of the eggs of *Taenia solium*. *J. Med. Ass. Formosa* 32: 139, 1933.
- Yoshino, K. (1933) Studies on the post-embryonal development of *Taenia solium*. II. On the youngest form of *Cysticercus cellulosae* and the migratory course of the oncosphera of *Taenia solium* within the intermediate host. *J. Med. Ass. Formosa* 32: 155, 1933.
- Yoshino, K. (1933) Studies on the post-embryonal development of *Taenia solium*. III. On the development of *Cysticercus cellulosae* within the definite intermediate host. *J. Med. Ass. Formosa* 32: 166, 1933.
- Young, R.A. y Davis, R.W. (1983) Efficient isolation of genes by using antibodies probes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80: 1194.