

83  
23  
7  
24

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

Instituto de Investigaciones Biomédicas

**VACUNACIÓN EN CONTRA DE LA CISTICERCOSIS MURINA  
CON PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE PARAMIOSINA DE  
*Taenia solium***

262415

**TESIS**  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
**LICENCIADO EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA**

PRESENTA  
**Carlos F. Solís Aguirre**

México, D.F., 1998



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

El trabajo presentado en esta tesis se desarrolló en el  
**Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM**  
bajo la dirección del **Dr. Juan Pedro Laclette San Román**

# INDICE

<b>I. RESUMEN</b> .....	1
<b>II. INTRODUCCION</b> .....	2
<i>a) Ciclo biológico del parásito Taenia solium</i> .....	2
<i>b) La taeniasis-cisticercosis humana y porcina</i> .....	3
<i>c) Aspectos socioeconómicos de la enfermedad</i> .....	4
<i>d) Estrategias para el control de la cisticercosis</i> .....	6
<i>e) El AgB de T. solium como candidato a vacuna</i> .....	8
<i>f) Modelo murino de cisticercosis</i> .....	11
<b>III. HIPOTESIS Y OBJETIVOS</b> .....	13
<b>A. La TPmy como candidato a vacuna en contra de la cisticercosis murina y porcina</b> .....	13
<b>B. Primer objetivo: obtención de antígenos</b> .....	13
<b>C. Segundo objetivo: ensayos de protección</b> .....	13
<b>D. Tercer objetivo: caracterización de la respuesta humoral</b> .....	13
<b>IV. MATERIALES Y METODOS</b> .....	14
<b>A. El modelo murino de cisticercosis</b> .....	14
<i>a) Cisticercos de Taenia crassiceps</i> .....	14
<i>b) Ratones</i> .....	14
<i>c) Ensayos de protección en ratones</i> .....	14
<i>d) Sangrado de los ratones</i> .....	15
<b>B. Producción de los proteínas recombinantes de TPmy</b> .....	15
<i>a) Expresión de las proteínas</i> .....	15
<i>b) Purificación de los cuerpos de inclusión</i> .....	15
<i>c) Purificación de las proteínas recombinantes por cromatografía de afinidad</i> .....	16
<b>C. Ensayos de ELISA</b> .....	17
<i>a) Ensayo estándar</i> .....	17
<i>b) Ensayos de reconocimiento cruzado entre las proteínas recombinantes</i> .....	17
<i>c) Patrones de inmunoglobulinas</i> .....	17
<b>D. Métodos misceláneos</b> .....	18
<i>a) Extracto crudo de cisticercos</i> .....	18
<i>b) Purificación de la TPmy natural</i> .....	18
<i>c) Cuantificación de proteínas</i> .....	18
<i>d) Electroforesis de proteínas</i> .....	18

e) <i>Western-blot</i> .....	18
f) <i>Preparación del adyuvante</i> .....	19
g) <i>Preparación de las muestras para inmunizar</i> .....	19
h) <i>Acoplamiento de un péptido sintético de TPmy a ovoalbúmina</i> .....	19
<b>IV. RESULTADOS</b> .....	20
<b>A. Producción y purificación de las proteínas recombinantes</b> .....	21
<b>B. Ensayos de protección con las proteínas recombinantes de TPmy</b> .....	22
a) <i>Ensayo de protección 1</i> .....	22
b) <i>Ensayo de protección 2</i> .....	22
c) <i>Ensayo de protección 3</i> .....	23
<b>C. Respuesta humoral</b> .....	23
a) <i>Respuesta humoral en contra de las proteínas recombinantes de TPmy</i> .....	23
b) <i>Reconocimiento cruzado entre las proteínas de TPmy</i> .....	23
c) <i>Patrones de inmunoglobulinas</i> .....	25
<b>V. DISCUSION</b> .....	27
a) <i>Ensayos de protección</i> .....	27
b) <i>Respuesta inmune en contra de las proteínas recombinantes</i> .....	30
c) <i>Perfil de la respuesta protectora</i> .....	31
d) <i>La TPmy como candidato a vacuna en contra de la cisticercosis y otras helmintiasis</i> .....	31
<b>VI. AGRADECIMIENTOS</b> .....	33
<b>VII. BIBLIOGRAFIA</b> .....	34

*A mis padres y hermano*

*A mis maestros*

Alejandro García Carranca  
Auster Valderama  
Bertha Ezpinoza  
Carlos Larralde  
Carmen Clapp  
Carmen Gómez  
David Romero  
Edda Sciutto  
Edmundo Lamoyi  
Enrique Ortega  
Ernesto Guerrero  
Esperanza Martinez

Francisco Cavieres  
Georgina Hernández  
Gladis Fragoso  
Guillermina Yankelevich  
Imelda López  
Irma Villalpando  
Ismael Hernández  
Jesús Caballero  
Juan Pedro Laclette  
Julieta Rubio  
Julio Collado  
León Cázares

León Cintra  
Leonor Huerta  
Librado Ortiz  
Lino Díaz de León  
Luz María López  
Manuel Ramos  
Rafael Saavedra  
Raúl Mancilla  
Roberto Hernández  
Saúl Cano  
Susana Brom  
Veronica Guarner Lans

*A mis compañeros de generación*

Daniel, Eileen, Emilio, Josune, Lilia

*A mis compañeros de laboratorio*

Dayana, José, Laura M, Laura V, Martin, Pedro, Yoshiaki

## I. RESUMEN

La paramiosina de *Taenia solium* (TPmy) es una proteína de 100 kDa que posee una estructura secundaria filamentosa de  $\alpha$ -hélice, con pequeños dominios globulares de 15 y 25 aminoácidos en el extremo amino y carboxilo. La TPmy es un antígeno inmunodominante de la cisticercosis humana y porcina, con la interesante propiedad de unirse a C1q e inhibir la cascada del complemento, lo que ha llevado a proponer que juega un papel modulador de la respuesta inmune del huésped cisticercoso. Estudios previos muestran que el sitio de unión a C1q se encuentra en el extremo amino terminal de TPmy, lo que sugiere que la inducción de una respuesta inmune dirigida hacia esa región podría resultar en niveles altos de protección en contra de la cisticercosis. Hemos purificado 5 proteínas recombinantes expresadas en *Escherichia coli*, correspondientes a diferentes regiones de la TPmy. Cuatro de estas proteínas corresponden a tercios de la TPmy. También se obtuvo comercialmente un péptido sintético de 20 aminoácidos correspondientes a la secuencia amino terminal de la TPmy. Cada proteína ha sido probada en ensayos de protección en el modelo murino de cisticercosis por *Taenia crassiceps* con el fin de identificar el mejor candidato a vacuna. Grupos de seis ratones BALB/c hembra, que son altamente susceptibles a la infección intraperitoneal por *T. crassiceps*, fueron inmunizados dos veces con 50  $\mu$ g de proteína adsorbida a hidróxido de aluminio y retados por vía intraperitoneal con 10 cisticercos de *T. crassiceps*. El tercio amino terminal (VW2-1; 35 kDa) que incluye el sitio de unión a C1q es el que genera un mayor nivel de protección (> 60%) en contra de un reto intraperitoneal con cisticercos de *T. crassiceps*. Ensayos de *western blot* y de ELISA muestran que todas las proteínas de la TPmy inducen respuestas altas de anticuerpos, con un perfil de clases y subclases de inmunoglobulinas similar, y bajos niveles de reacción cruzada. Ensayos previos muestran que linfocitos obtenidos del bazo de ratones inmunizados con TPmy proliferan altamente *in vitro* al ser estimulados por el extremo amino terminal y débilmente por el carboxilo. Todo ello sugiere que los epítopes protectores se localizan en el extremo amino terminal de la TPmy y que la protección obtenida con VW 2-1 es mediada por una respuesta de tipo celular. Además, hemos subclonado la secuencia que codifica para VW 2-1 en un vector de expresión que posee un promotor eucarionte, con lo cual iniciaremos ensayos de vacunación con DNA.

## II. INTRODUCCION

### a) Ciclo biológico del parásito *Taenia solium*

Entre los céstodos de la familia *Taenidae* se encuentran algunas especies de helmintos que parasitan al hombre y a sus animales domésticos. Estos parásitos presentan ciclos de vida en los que interviene un huésped definitivo y uno o más huéspedes intermediarios que pueden ser artrópodos o vertebrados (Fig 1). El huésped definitivo es generalmente el depredador del intermediario.

La *Taenia solium* adulta es un gusano de dos a cinco metros de largo de color blanquecino que posee una estructura denominada scolex, provista de ganchos y ventosas que le permiten fijarse a la pared intestinal del huésped definitivo que es el hombre, ocasionando la llamada taeniasis (Fig 2). En la parte inferior del scolex se forma un cuello que es una región germinal en la que se originan los llamados proglótidos o segmentos. Los proglótidos unidos entre sí forman el estróbilio. A medida que se alejan del scolex, los proglótidos se diferencian y alcanzan su madurez sexual en la parte media del estróbilio. Cada proglótido maduro posee genitales masculinos y femeninos que constituyen una unidad de reproducción. Los proglótidos más distales al scolex muestran un útero ramificado lleno de huevecillos (~ 50,000 en cada uno) por lo que se les llama grávidos. Los proglótidos grávidos son liberados espontáneamente por la *Taenia*, siendo desechados en las heces del huésped. Los proglótidos se descomponen en las heces, y liberan los huevecillos que contienen a los embriones u oncosferas hexacanto, que alcanzan al huésped intermediario (cerdo) por ingestión directa de heces

de taeniásicos, o por consumo de agua o alimentos contaminadas (Fig 3). Las enzimas digestivas y sales biliares del huésped intermediario activan a la oncosfera contenida en el huevecillo que penetra la pared intestinal y alcanza los capilares linfáticos y sanguíneos que la conducen a una gran variedad de órganos y tejidos (tejido subcutáneo, músculo esquelético, cerebro, ojos, etc...), en donde se desarrolla hasta convertirse en la forma larval o cisticerco. El hombre, al igual que el cerdo puede actuar como huésped del cisticerco por ingestión de agua o de alimentos contaminados.

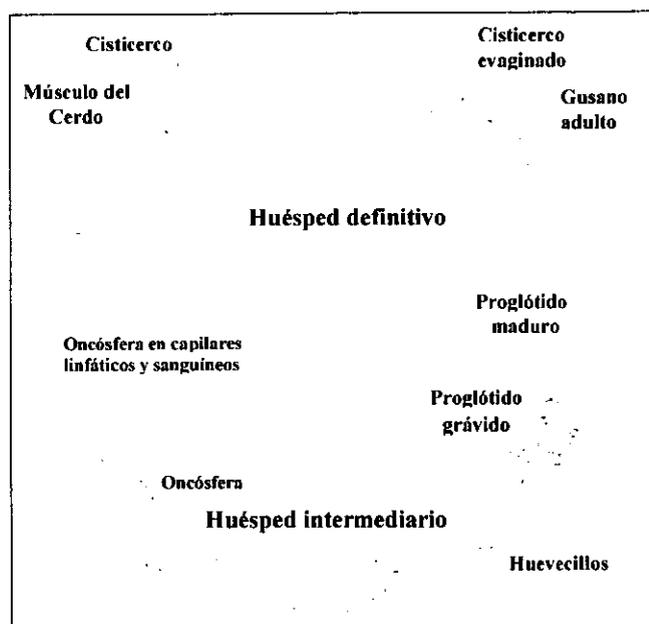


Fig 1. Ciclo biológico de la *Taenia solium*.

### Abreviaturas utilizadas en esta tesis:

a.a., aminoácido;  $\alpha$ -Igs, anticuerpo anti-inmunoglobulinas; AgB, antígeno B; BSA, albúmina de suero bovino; D.O. densidad óptica; DMSO, dimetil sulfóxido; EDTA, ácido etilén diamino tetracético; ELISA, análisis inmunoenzimático cuantitativo; IET, inmunoelectrotransferencia (idem. *Western-blot*); Igs, inmunoglobulinas; IPTG, isopropiltio- $\beta$ -D-galactosidasa; kDa, kilodaltones; nTPmy, paramiosina natural de *T. solium*; OPD, dihidrocloruro de o-fenilendiamina; pep-ova, péptido de 20 a.a. en el extremo amino terminal de la TPmy acoplado a ovoalbúmina; P.M., peso molecular; PMSF, floruro de fenilmetilsulfonilo; PBS, solución salina amortiguadora de fosfatos; rpm, revoluciones por minuto; rTPmy, paramiosina recombinante de *T. solium*; SDS, lauril sulfato de sodio; TLCK, nalfa-p-tosil-l-lisin clorometil cetona; TPmy, paramiosina de *T. solium*; ufp, unidades formadoras de placas.

El ciclo de vida se cierra cuando el hombre ingiere larvas viables al consumir carne de cerdo cisticercoso. Nuevamente, los componentes de la bilis (enzimas proteolíticas y sales biliares) inducen al cisticercos a evaginar y anclarse al epitelio de la primera parte del intestino delgado para desarrollarse en el gusano adulto comunmente conocido como "solitaria".



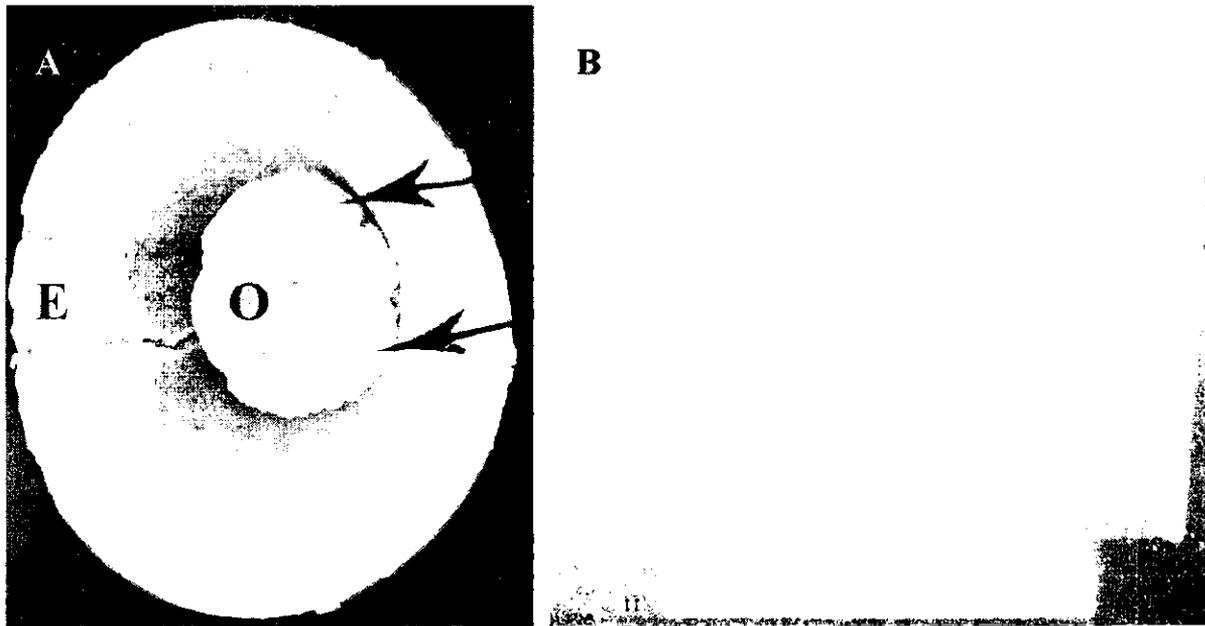
**Fig 2.** A) El escolex o cabeza de la *Taenia solium* es estructura corporal que posee ganchos y ventosas que le permiten al parásito en su fase adulta fijarse a la pared intestinal del huésped definitivo que es el hombre. B) La *Taenia* adulta es un gusano largo y aplanado de color blanquecino que puede alcanzar una longitud de hasta cinco metros.

#### b) *La taeniasis-cisticercosis humana y porcina*

La taeniasis se caracteriza por el alojamiento de la fase adulta de *T. solium* en el intestino del hombre. Esta relación puede mantenerse estable por largos periodos de tiempo (varios meses ó años). Una vez alojada, la *Taenia* absorbe nutrientes del contenido intestinal del huésped a través del sincicio celular del tegumento, el cual absorbe por difusión o transporte activo moléculas orgánicas de bajo peso molecular y probablemente absorbe también por endocitosis (Cox *et al.*, 1982). La taeniasis se considera un padecimiento de curso clínico benigno que llega a presentar síntomas como hambre dolorosa, anorexia, indigestión crónica, periodos alternos de diarrea y

constipación, síntomas nerviosos de origen tóxico y eosinofilia (Watson *et al.*, 1960). Generalmente, el diagnóstico se lleva a cabo detectando la presencia de proglótidos en tamizados de heces o bien por la observación de huevecillos en exámenes coproparasitológicos. El parásito puede ser desalojado del intestino del huésped con el uso de medicamentos altamente efectivos como la Niclosamida o el Paraziquantel (Flisser *et al.*, 1988; Harnet *et al.*, 1988). En algunos casos la *Taenia* es liberada de forma espontánea y en otros se emplean remedios caseros (Teofrasto describió el uso de extractos de raíz de helecho macho hace más de 2000 años ) que purgan el sistema digestivo del paciente liberando al parásito que desafortunadamente en ambos casos no siempre es desechado de forma adecuada con el fin de evitar un foco de infección por los huevecillos contenidos en los segmentos que forman el llamado estróbilo de la *Taenia*. La taeniasis es un padecimiento de moderadas consecuencias para el paciente que constituye un foco de infección severo pues se ha visto que la incidencia de cisticercosis alrededor de un taeniásico aumenta considerablemente (hasta 50 veces).

La cisticercosis humana y porcina se caracteriza por el establecimiento de la fase larval de *T. solium* en órganos y tejidos del huésped. Desde el punto de vista clínico, existen dos categorías de pacientes cisticercosos: los asintomáticos y los sintomáticos. Estos a su vez se clasifican en cuatro grupos de acuerdo a la localización del parásito (cisticercosis diseminada, oftalmocisticercosis, neurocisticercosis y cisticercosis mixta). El huésped puede reaccionar en forma variable al entrar en contacto con el parásito que además se aloja en diversas zonas del cuerpo lo cual dificulta el reconocimiento de una sintomatología definida. La demostración directa del parásito para diagnóstico en cisticercosis sólo es posible cuando su localización es subcutánea o muscular, por medio de biopsia. Cuando es cerebral se requiere de métodos indirectos como puede ser el estudio radiográfico que resulta útil cuando los cisticercos están calcificados, o bien la tomografía axial computada con o sin medio de contraste que descubre tanto parásitos vivos (hipodensos) como calcificados (hiperdensos), y la serología buscando



**Fig 3.** A) Micrografía electrónica de barrido de un huevecillo de *Taenia solium*. Se observan los ganchos oncósferales (flechas negras), el embrióforo (E) y la oncósfera hexacanto contenida en el huevecillo (O). B) Huevecillos de *Taenia solium* vistos al microscopio.

anticuerpos en el suero o líquido cefalorraquídeo en contra del cisticerco, por medio de hemaglutinación o ELISA (Larralde *et al.*, 1986; Espinoza *et al.*, 1986; Baily y Masson, 1988).

Las manifestaciones y síntomas de la cisticercosis humana varían considerablemente, aunque por lo general se agudizan en casos de neurocisticercosis y van desde cuadros epilépticos a cefalalgia, desordenes mentales, hipertensión endocraneal, cisticercosis ocular, cisticercosis subcutánea, fiebre, mialgia, etc. (Trujillo-Valdez *et al.*, 1982). Existen casos en los que la respuesta inflamatoria se torna aguda a pesar de un cuadro inicial asintomático, pero también existen casos en los que esta respuesta por parte del huésped se revierte de tal forma que los síntomas desaparecen por largos periodos de tiempo e incluso de manera permanente. Aquellos cisticercos alojados en el cerebro pueden llegar a producir hasta la muerte por hipertensión endocraneal, mientras que en otras zonas del cuerpo el cisticerco puede pasar desapercibido durante largos periodos de tiempo. Algunos estudios realizados en el Perú sugieren que la cisticercosis humana es la causa del 12% de los desordenes neurológicos y del 20% de los casos de epilepsia en hospitales (García *et al.*, 1991).

La cisticercosis porcina se diagnostica por inspección *ante-mortem* de la lengua o por inspección *post-mortem* de la carne del cerdo (Fig 4). La cisticercosis porcina se caracteriza casi siempre por una infestación generalizada que llega a alcanzar una parte considerable del peso corporal del animal (~ del 5%). En la mayoría de los rastros de nuestro país, los inspectores determinan que cuando el grado de infestación del cerdo es muy alto, sólo se podrá comerciar con la grasa y el cuero del animal; en cambio, cuando la infestación es mínima (uno o dos cisticercos en la parte del animal inspeccionada), la carne del cerdo se vende para hacer "carnitas" que es un platillo típico mexicano que consiste en freír la carne del cerdo, lo cual disminuye considerablemente la viabilidad de los cisticercos. A pesar de ello, un gran número de cerdos cisticercosos son distribuidos clandestinamente para consumo humano (Acevedo-Hernández *et al.*, 1982).

#### c) Aspectos socioeconómicos de la enfermedad

Aunque es difícil determinar con exactitud la prevalencia de la cisticercosis humana en el mundo, algunos estudios seroepidemiológicos muestran que esta enfermedad parasitaria está presente en un gran

número de países en vías de desarrollo de latinoamérica, Asia y Africa, e incluso en países desarrollados como Estados Unidos en donde el gran flujo de inmigrantes principalmente latinoamericanos ha provocado un aumento en la incidencia de esta enfermedad parasitaria (tabla I). En México, dos estudios seroepidemiológicos hechos con una diferencia de diez años muestran que alrededor del 0.8 % de los sueros de la población abierta en México contienen anticuerpos en contra del cisticerco. Sin embargo, la presencia de anticuerpos en el suero es un indicador de contacto con el parásito pero no necesariamente de infección. En otros países de latinoamérica como el Perú, el porcentaje oscila entre 1.2 y 18%, mientras que en Bolivia puede alcanzar hasta el 23% en comunidades rurales. También los países asiáticos muestran altos índices de seropositividad, alcanzando el 9.3% en pacientes neurológicos en Beijing, China o el 21% en Bombay, India.

La cisticercosis es un problema de salud que además tiene consecuencias socioeconómicas graves pues no sólo afecta al ser humano sino que también merma considerablemente la porcicultura ya que al ser detectado un cerdo cisticercoso por inspección veterinaria en los rastros, la carne es decomizada.

En nuestro país se presentan condiciones socioeconómicas y hábitos fuertemente arraigados en amplios sectores de la población que contribuyen al mantenimiento de esta parasitosis. La cisticercosis se agudiza en zonas rurales en donde la falta de higiene y la crianza rústica de cerdos para consumo humano, favorecen el establecimiento y la continuidad del ciclo biológico de *T.solium*. En zonas urbanas la incidencia de la cisticercosis es menor, sin embargo las condiciones de insalubridad que persisten en algunos rastros, así como el alto índice de defecación al aire libre mantienen latente la posibilidad de infección en la mayoría de la población.

Aquellos individuos incapacitados por esta enfermedad parasitaria no sólo representan una baja en la fuerza laboral sino que también representan un gasto económico que se refleja a varios niveles (personal especializado, hospitalización,

tratamientos, etc.). Para la mayoría de los pacientes cisticercosos, la estabilidad del núcleo familiar también se ve afectada, ya que esta enfermedad parasitaria se da preferentemente en las capas sociales más desprotegidas.

Algunos datos del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (I.N.N.N) sugieren que el impacto económico anual de la neurocisticercosis en México, a finales de los setentas fue de 255 millones de dólares (U.S.), esto únicamente en base a pacientes vistos por el I.N.N.N.



**Fig 4.** Carne de cerdo con cisticercos. En esta fotografía se observa que el trozo de carne de cerdo examinado contiene un gran número de cisticercos de aprox. 4 mm de diámetro (flecha blanca).

El impacto de la cisticercosis es igualmente fuerte para la porcicultura, en un país como México en donde la carne de cerdo y sus derivados tienen una amplia aceptación. En 1980 el censo nacional de cerdos fue de 16,890,000 animales, mientras que en ese mismo año 17,058,300 fueron sacrificados, lo que representa una producción anual del 101 %. En 1980, las pérdidas económicas de la porcicultura mexicana por decomisos en los rastros se estima fueron de 43 millones de dólares (Acevedo-Hernandez *et al.*, 1982).

**Tabla I.** Seropositividad de la cisticercosis humana en países de América, Asia y África

**Presencia de anticuerpos en contra de cisticercos de *Taenia solium* en los sueros obtenidos a partir de un muestreo\***

<b>Bolivia</b>	23 % en comunidades rurales. <sup>g</sup>
<b>Brasil</b>	0.12 – 9 % de la población abierta. <sup>l</sup>
<b>Chile</b>	1.1 % en comunidades rurales. <sup>f</sup>
<b>China</b>	9.3 % en pacientes neurológicos en Beijing. <sup>g</sup>
<b>E.U.</b>	1.3 % en una comunidad judía (población urbana). <sup>i</sup> 10 % en trabajadores inmigrantes de Carolina del Norte. <sup>d</sup>
<b>Ecuador</b>	11 % en una región de los Andes. <sup>h</sup>
<b>Guatemala</b>	10 - 17 % en comunidades rurales. <sup>j</sup>
<b>India</b>	21 % en pacientes neurológicos en Bombay. <sup>g</sup>
<b>Korea</b>	1.8 % de la población abierta. <sup>c</sup> 3.1 % en pacientes epilépticos. <sup>e</sup>
<b>Madagascar</b>	17.6 % en pacientes neurológicos. <sup>k</sup>
<b>México</b>	0.5 - 1.2 % de la población abierta. <sup>a, c</sup> 10.8 % en comunidades rurales de Morelos. <sup>g</sup>
<b>Perú</b>	1.2 - 18 % de la población abierta. <sup>g</sup> 12 % en pacientes neurológicos. <sup>b</sup>
<b>Rwanda</b>	21 % en pacientes epilépticos. <sup>g</sup>

<sup>a</sup> (Woodhouse *et al.*, 1982); <sup>b</sup> (García *et al.*, 1991); <sup>c</sup> (Larralde *et al.*, 1992); <sup>d</sup> (Ciesielski *et al.*, 1993); <sup>e</sup> (Kong *et al.*, 1993); <sup>f</sup> (Aliaga *et al.*, 1994); <sup>g</sup> (Tsang *et al.*, 1995); <sup>h</sup> (Escalante *et al.*, 1995); <sup>i</sup> (Moore *et al.*, 1995); <sup>j</sup> (García-Noval *et al.*, 1996); <sup>k</sup> (Grill *et al.*, 1996); <sup>l</sup> (Agapejev *et al.*, 1996).

\* Los datos reportados se basan en estudios serológicos por IET y ELISA.

*d) Estrategias para el control de la cisticercosis*

Para erradicar la taeniasis-cisticercosis es necesario atacar e interrumpir el ciclo biológico de *T. solium*. El hombre padece de taeniasis por consumir carne de cerdo infectada, por lo cual es necesario intensificar y mejorar la inspección veterinaria en los rastros y fuera de ellos. Este tipo de estrategia resulta más factible en lugares con porcicultura desarrollada, en donde la población de cerdos se concentra en establos de producción a gran escala. En estos lugares, se controlan las condiciones sanitarias y se lleva a cabo una inspección veterinaria frecuente. Sin embargo, la cisticercosis no es un problema grave entre la población de cerdos estabulados que generalmente se mantienen con alimento industrial o granos de buena calidad. El propio confinamiento de los

animales aunado al control de los alimentos que ingieren disminuye el riesgo de infección. En cambio, la cisticercosis es un problema considerable en poblaciones rurales, en donde no es factible impedir que los cerdos ingieran excrementos humanos que frecuentemente constituyen su único alimento. En estas villas rurales, los cerdos generalmente deambulan sueltos y cumplen una labor de limpieza de varias fuentes de infección, por lo que tampoco se puede recomendar su confinamiento (Fig 5).

Se trata pues de un problema que incluye aspectos económicos y culturales además de los biológicos del propio parásito y sus huéspedes. La interrupción de la transmisión de la taeniasis-cisticercosis requiere de medidas combinadas incluyendo la educación acerca de la enfermedad

entre la población (Sarti *et al.*, 1997), inspección veterinaria en rastros y comunidades rurales, campañas de desparasitación de taeniásicos, manejo de los excrementos humanos, manejo y procesamiento de la carne de cerdos infectados, así como de algunas otras medidas como el desarrollo de vacunas o de huéspedes resistentes que ayuden a controlar la enfermedad. En zonas rurales, la disponibilidad de una vacuna en contra de la cisticercosis porcina, aunque de difícil aplicación podría convertirse en un factor importante para el control de la enfermedad.

La investigación científica sobre enfermedades infecciosas ha progresado en gran medida gracias al auge biotecnológico de los últimos 20 años. Por ejemplo, el uso de hibridomas para producir anticuerpos monoclonales antígeno-específicos (Köhler y Milstein, 1975) ha facilitado notablemente la identificación y el aislamiento de antígenos relevantes para el inmunodiagnóstico y desarrollo de vacunas. Nuevas técnicas de biología molecular han contribuido de manera decisiva en la clonación y secuenciación de antígenos inmunodominantes, característicos de algunas enfermedades infecciosas. El desarrollo de sistemas de expresión artificial de algunos de estos antígenos en cultivos celulares o de microorganismos permiten producirlos en cantidades considerables. Todo ello ha contribuido al desarrollo de trabajos experimentales orientados al conocimiento básico y al saneamiento de algunas de las enfermedades infecciosas con mayor incidencia en la población mundial, entre ellas la cisticercosis humana y porcina.

Actualmente están reportados en la literatura candidatos a vacuna en contra de la cisticercosis causada por *T. taeniaeformis* (Ito *et al.*, 1991) y *T. solium* (Manoutcharian *et al.*, 1996; Sciutto *et al.*, 1995). Además se ha propuesto un antígeno recombinante de oncósfera como una vacuna contra la cisticercosis por *T. ovis* (Johnson *et al.*, 1989; Rickard *et al.*, 1991). En el presente trabajo de tesis, se explora el potencial de otro antígeno candidato, el AgB o paramiosina.

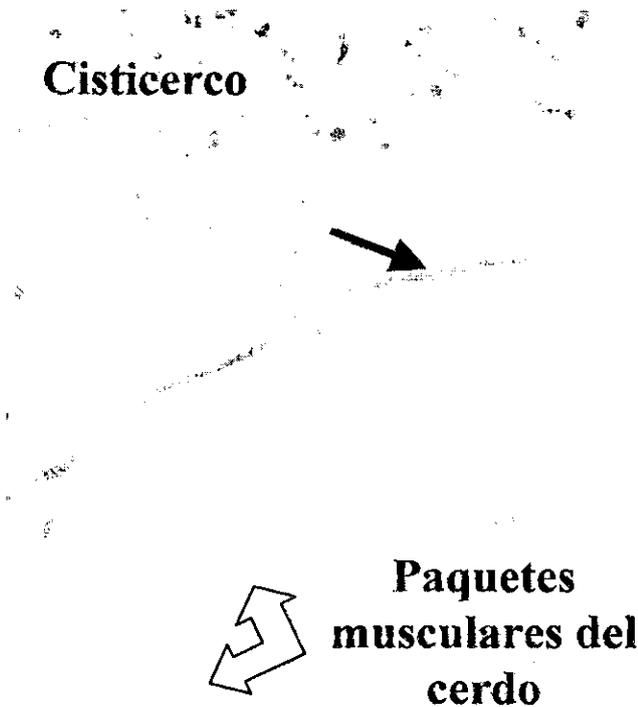
Las paramiosinas son también candidatos para el desarrollo de vacunas contra infecciones

helmínticas tales como esquistosomiasis (Lanar *et al.*, 1986; Pearce *et al.*, 1986; Pearce *et al.*, 1988; Flannigan *et al.*, 1989; Kantha *et al.*, 1990; Richter, *et al.*, 1993) y filariasis (Nanduri *et al.*, 1989; Li *et al.*, 1991; Li *et al.*, 1993). Ensayos preliminares de vacunación indican que la paramiosina induce entre el 24 y el 53% de protección contra la esquistosomiasis murina por *S. mansoni* (Pearce *et al.*, 1988; Flannigan *et al.*, 1989).



**Fig 5.** Cerdos deambulando en un basurero del Distrito Federal. Los cerdos andan sueltos y se alimentan de desechos y de excrementos humanos que se encuentran al alcance de estos animales, debido a los altos índices de defecación al aire libre. Esta es una situación cotidiana en nuestro país que contribuye al mantenimiento de la Taeniasis-cisticercosis.

Una serie de trabajos permitieron demostrar que anticuerpos monoclonales IgE anti-paramiosina protegen en contra de *Schistosoma japonicum* (Somei *et al.*, 1987; Nara, *et al.*, 1994, 1997). Además, se ha logrado producir anticuerpos anti-paramiosina en ratones, por inmunización con un plásmido que dirige la expresión de la paramiosina de *S. japonicum* (Yang, *et al.*, 1995).



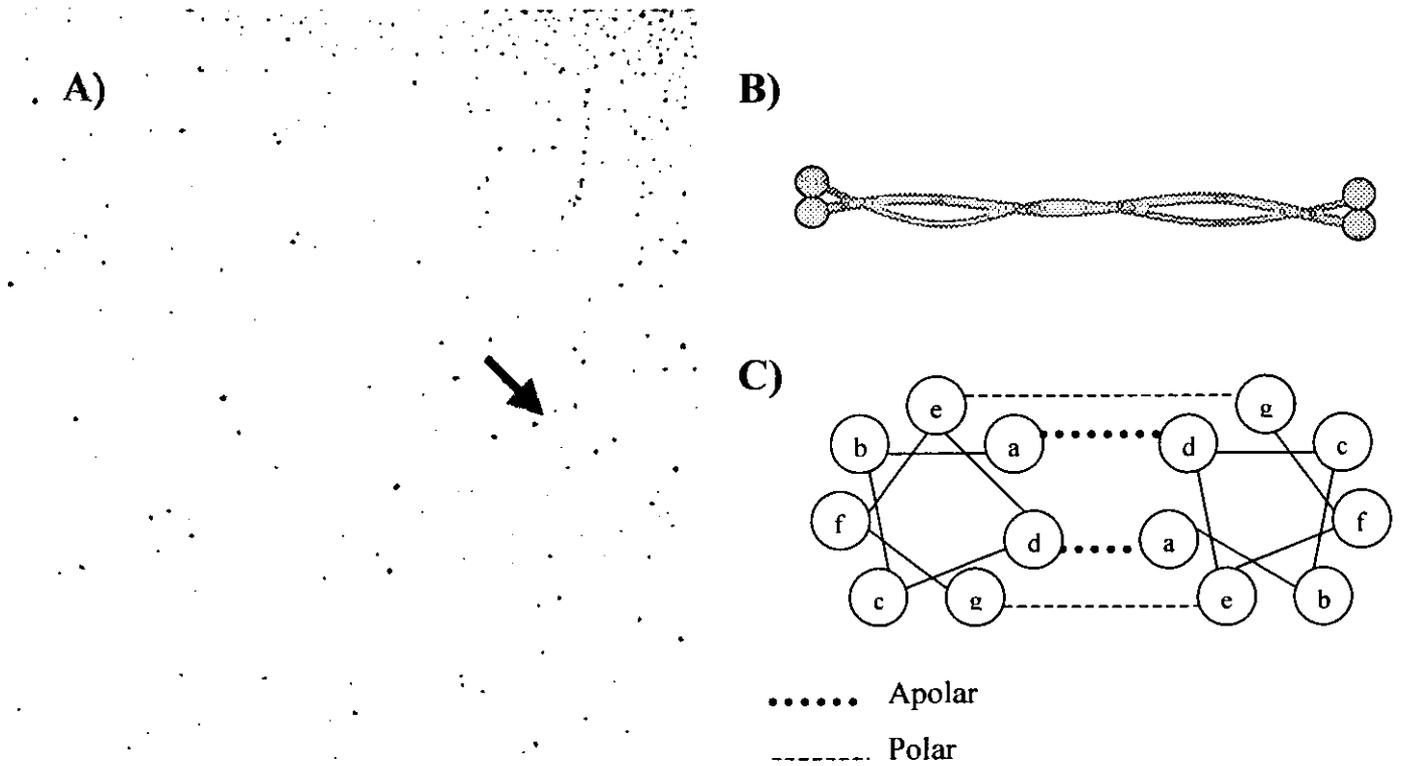
**Fig 6.** Corte histológico en el que se observa un cisticerco alojado en el tejido muscular del cerdo. La interfase huesped-cisticerco es la zona en la que el parásito entra en contacto con los tejidos del huésped (flecha negra). En la parte superior se observa al cisticerco que es un organismo pluricelular y en la parte inferior se observa el tejido muscular del huésped cisticercoso.

#### e) El AgB de *T. solium* como candidato a vacuna

En la mayoría de las enfermedades infecciosas causadas por helmintos, en donde la relación huésped-parásito puede mantenerse por años, se observa que la respuesta inmune del huésped parece modulada (Herrera *et al.*, 1994). La cisticercosis por *T. solium* no es la excepción puesto que los

cisticercos alojados en el músculo esquelético de cerdos muestran, como se observa en la figura 6, una muy pobre reacción inflamatoria a su alrededor (Willms *et al.*, 1980). Esto despertó la curiosidad por saber si el cisticerco inhibe de algún modo la reacción inflamatoria de su huésped porcino. El descubrimiento y la caracterización de algunas de las propiedades del antígeno B (AgB) de la *Taenia solium*, permitieron aproximarse a una posible explicación a esta pregunta.

El AgB es un antígeno inmunodominante de la cisticercosis humana y porcina (Flisser *et al.*, 1980). Estudios de inmunolocalización indican que se encuentra presente en el músculo y en el tegumento del cisticerco que es la parte más externa del parásito (Laclette *et al.*, 1987; 1995). La detección de AgB en el medio de cultivo de cisticercos mantenidos *in vitro* sugiere que se trata de una proteína que se libera hacia los tejidos del huésped (Laclette *et al.*, 1987). El AgB es una proteína de 100 kDa con alto contenido de aminoácidos polares y como se observa en la figura 7, posee una estructura filamentosa homodimérica, 95%  $\alpha$ -hélice (Guerra *et al.*, 1982). El AgB muestra una interesante propiedad de unirse a colágena, lo cual permite su purificación a partir de un extracto crudo de cisticercos, a través de un sencillo procedimiento de afinidad (Laclette *et al.*, 1990). La pobre respuesta inflamatoria que se observa alrededor de los cisticercos de cerdo, podría deberse a que el AgB inhibe la cascada del complemento, bloqueando la función de su primer componente, el C1 (Laclette *et al.*, 1992). Además, se ha demostrado que el AgB se une específicamente con el C1q que es uno de los tres subcomponentes del C1 (Laclette *et al.*, 1992). El C1 interviene en la formación de un complejo de ataque a membrana dentro de la cascada del complemento y su unión a superficies antigénicas opsonizadas por anticuerpos esta mediada por el subcomponente C1q. El C1q se compone de 18 cadenas polipeptídicas que forman seis cabezas globulares, unidas entre sí por brazos fibrilares que forman un tallo central. Los brazos fibrilares y el tallo central tienen una estructura colagénica y cada cabeza globular se une al dominio Fc de los anticuerpos (Reid K. *et al.*, 1983).



**Fig 7.** A) Micrografía por sombreado rotatorio de la TPmy en la que se observan moléculas individuales con una estructura filamentosa de 120 Å de longitud (flecha negra). B) Estructura homodimérica superenrollada de la TPmy. Cada una de las moléculas de TPmy posee dos dominios globulares de 15 y 20 a.a. en el extremo amino y carboxilo terminal respectivamente. C) La TPmy tiene una estructura 95%  $\alpha$ -hélice que se caracteriza por una disposición repetitiva de 7/28 a.a. de la forma (a,b,c,d,e,f,g)/n. Dentro de esta disposición periódica de 7 a.a., se presentan residuos generalmente apolares en las posiciones a y d, y polares en las posiciones e y g que estabilizan la interacción entre dos  $\alpha$ -hélices superenrolladas (Cohen *et al.*, 1990).

La propiedad del AgB de unirse a colágena sugiere que la interacción con el C1q se lleva a cabo a través de la región colagénica de este último.

A mediados de los ochentas, se reportó la presencia de anticuerpos en la superficie del cisticerco sin que hubiera evidencias de daño al parásito (Correa *et al.*, 1985). Esto sugería la presencia de receptores para Fc en la superficie del cisticerco que podrían estar capturando a los anticuerpos como una forma de bloqueo de la respuesta humoral. Algunos autores incluso sostienen la idea de que el cisticerco podría estar estimulando la producción de anticuerpos para utilizarlos como una fuente proteínica (White *et al.*, 1992). Hace algunos años se reportó la existencia de un receptor para Fc asociado a la superficie tegumental de la *T.*

*crassiceps*, que muestra homología completa con el AgB (Kalinna *et al.*, 1993). Este hallazgo, además de apoyar la idea de que el AgB está asociado a la superficie tegumental del cisticerco, sugiere otra función de evasión inmune para bloquear la respuesta humoral del huésped, probablemente a través de complejos AgB-C1q. El cisticerco también es capaz de evadir la destrucción mediada por el complemento a través de la teniaestatina que inhibe tanto la vía clásica como la alterna, y a través de polisacáridos sulfatados que son liberados hacia la interfase huésped-parásito y activan al complemento lejos del parásito (White *et al.*, 1997). Estos hallazgos sugieren que los cisticercos mantienen una compleja relación en equilibrio inmunológico con su huésped humano o porcino, que les permite sobrevivir por largos

-236 CTCTCCAGCTTTTGATCCCTCTGCAACGGTTTGTGTTCTTCCAATAGACTCGAACCGTGTATACTTTCGAATTTTCCCTGTGACTGCTTTGACTAGGAAAGGAATTTCTG  
 AGCGGTGCGATTCAATTGAGAATCCGGTCCGTTTTCTGACTTTCGAATCTACTTCACGCACACAACCAATCCATTGGCAGCTGCCGTGATTACCACAAAACGGGACCTA  
 TCAGAGACGAAGAC

1 ATGCTGTAATCACACGTCAAAATTTCTCGTACCATCATAACGGGGACTTCCCAAGTACTGTTGACTTGGAGTCCGCTACGAGAAGTGGAGGACCTGCTCGATCTTGA  
 111 GCGAGATGCTCCGCTCCGGGTGAACGCAATGCCAACGAGATGAGCATTGAGCTGGACACCATGGCTGAACGCTTGGACGAATGAGTGGTACTTCTCTCAGACTCAC  
 221 GATGCTATTCGCGTAAGGATATGGAGATCTCGAAGCTGCGCAAGGATCTGGAAAATGCCAACGCTGCTTTTCGAACTGCCGAGGCCACTCTGCGCCGCAAAACACAACA  
 331 CCAATGAICTCCGAGATCTCCAGCGAGGTTGAGAAATTTGCAGAAGCAGAAGGGCAGGGCAGAGAAGGACAAGAGCCAGCTCATGCTTGAATCGATAACGTTCTTGGTCA  
 441 ACTTGTATGGCGCTTTAAAGGCCAAGGCCCTCAGCGGAGAGCAAACTGGAGGGCTTGGACAGCCAGCTGACGCGCTTGAAGGGCGTGAACGACGATCTTCAACGCCAAAT  
 551 GGCCGAGCTAACTCTGCCAAGTCGCTTTGGCCGAGAGAACTCGAATTTGGTTCGCTAACTAGGATGAAGCACAAGTCGTACCTTCTTAAGACAAGGGCC  
 661 GCTCTTGAAGAGCCAGCTGGATGACCTTAAACGGGGCATGGATGAAGATGCACGCAATCGCCTAAGCCTTCAAACACAGTTGTCGAGCTGCAAAATGGACTACGACAACC  
 771 TGCAAGCACGTTACGAGGAGGAAGCCGAGGCGAGCCGAAATCTGCGCAACCAAGTTGCCAAATTCACGCCGATATGGCTGCCCTCAAGACCCGCTTGGAGAGAGAAC  
 881 TTATGGCCAAGACTGAAGAGTTTGAAGAAGTCAAACGCAAGCTGACTGTTCCGATTAACCGAGTTGGAGGATATGGCTGAACATGAGCGCACTCGTCCCAACAACCTGGA  
 991 GAAGACCAAAGTTAAGCTGACTCTTGAGATCAAGGATCTACAGGCTGAGAACGAGGCGTTGGCAGCAGAGAATGGAGAGTTAACGCATCGGGCGAACGAGGCAGAGA  
 1101 ATCTTGCAATGAGCTGCAGCGTGAATAGACGAGATGACAGTGGAAAATCAACACCCTCAACTCGGCCAACAGCGCTCTAGAGGGCGACAACATGCGCCTCAAGGGGC  
 1211 AGGTCCGTGACCTCACCGACCGCATCGCAATCTCGACCGCGAAAACCGCCAACTTGGCGATCAACTGAAGGAGACGAAATCAGCCCTGCGTGTATGCGAATCGTCCGACT  
 1321 GACCGATTTGGAGGCCCTGCCAGTCAGTTGGAGGCAGAGCGTGACAACCTCGCCTGCTCTCCATGATGCTGAGGAGGCACTGAAGGAGATGGAAGCGAAGTACGTT  
 1431 GCCTCGCAGAACGCTCTTAATCACCTCAAGTCCGAGATGGAACAACGCTGCGGTGAGAAGGACGAGGAACTGGAGAATCTGAGAAGAGCAGACTCGCAGCATTGAG  
 1541 GAGTTGACAACACCACCTCTCAGAGATGGAGGTTCCGTTCAAGTCGGATATGCTCTGCTGAAGAAGAAAGTACGAGGCGACAATCAGCGAGCTAGAGGTGCAACTAGAGCG  
 1651 TGGCGAACCAAGCGAAGCTCAACCTCAACCGCGAGAACAACACCTGGCTCAACGAGITCAAGAGCTGCAGGCTGCGTTGGAGGACGAGCGACGAGCTCGCGAAGCT  
 1761 GCAGAGAGCAACTGACGGTGAAGGAGCGCAACGCAATCGCCCTTGGCTCGGAGTGAAGAGATTCGACGCCAACTGGAAGTCAAGTACCGCGCTCGCAAGAACGCCG  
 1871 AGTCCGAACTCAACGATGCCAATGGAGTATCTCGGAGCTCACCTATCGGTCAACACTTACCAATGACAACCGTCCGACTTGAAGGGGATATTGGCGTATGACGGG  
 1981 CGATCTCGATGAGGCCGTCATGCGCGCAAGGCTGCTGAGGATGAGCTGACCTGACCTGTAACGCTGAGGTACTCCGCTGGCTGATGAGCTGCGGACGAAACAAGAAA  
 2091 TTACAAGCGTCTGAGACTCTGCGCAAGCAACTTGAGATCGAGATCCGTTGAGATCACGCGTCAAGTTGGAGGGGCTGAGGCTTTGCTACTCGTGAGGGTCCGCGTATG  
 2201 GTTCAAAAAGCTCCAGAATCGGAGGGAGCTTGAAGGGACGTTGAGCGGAGAAATCGTCCGCGCAAGGAGGCCCTTCCCAACCGCGCAAAATACGAGCGTCAATTTCAAG  
 2311 GAAGTGCAGACAGAGCGAGGATGATAAAGCAGATGATTTGGAGCTTCAAGACCTGTAGACAAGACTCAGATCAAGATGAAAGGCTACAACCGTCAAGTGTAGGAA  
 2421 CAGGAAGAGGTGCTCAGCTGACGATGAGCAAGTACCGTAAGGGCGAGCAACAGATTGAGGAGGCGGAACATCGTGTGATGCGGGAGAGGAGGATCACCATTAAAG  
 2531 AGGACAATTTGGTGGACCCGGTTCGCCGCGCTTTCCGTTGGTTCGGGAGATCAACAGTGTCTCCCGTGGTAACCGTGAACCCAGCATCATGTAGATGTCTCAAAGGGC  
 2641 AGAACTCGTACTTTTTTAGCCCTTATCC / APROX 0.85 kb

**Fig 8.** Secuencia nucleotídica de la región codificadora de la paramiosina de *Taenia solium*. Los codones de iniciación (ATG) y de terminación (TGA) están en negritas.

periodos de tiempo (varios años), en presencia de una respuesta inmune.

La figura 8 muestra la secuencia codificadora del AgB de *T. solium* que fue clonada a partir de una biblioteca de cDNA (Landa *et al.*, 1993). La secuencia de aminoácidos deducida a partir de la secuencia nucleotídica codifica una proteína de 863 residuos de aminoácidos con un peso molecular de 100 kDa. El análisis de la secuencia de aminoácidos muestra un 75% de identidad con la paramiosina del trematodo *Schistosoma mansoni* y un 35% con paramiosinas de nemátodos como *Caenorhabditis elegans* y *Diraphilaria immitis* o de artrópodos como *Drosophyla melanogaster* (Laclette *et al.*, 1992). También se demostró reacción cruzada por anticuerpos entre la paramiosina de *S. mansoni* y el AgB de *T. solium* (Laclette *et al.*, 1991). Estos resultados demuestran que el AgB es la paramiosina de la *T. solium* (TPmy), por lo que ambas denominaciones serán usadas indistintamente en la presente tesis.

A partir de la secuencia nucleotídica de la TPmy, se diseñaron una serie de construcciones plasmídicas para la expresión recombinante de la proteína completa o de diferentes fragmentos de la

TPmy en un vector de expresión bacteriano (Fig 9). De esta forma se obtuvieron cantidades de proteína recombinante en el orden de los miligramos, expresada en cultivos bacterianos. Con ello, se realizaron ensayos de correlación estructura-función, en los que se determinó que la región mínima de la TPmy que se une al C1q e inhibe la cascada del complemento incluye los primeros 50 aminoácidos de su extremo amino terminal (resultados no publicados).

Nuestro grupo ha propuesto que las paramiosinas inhiben la producción de mediadores complementarios de inflamación (anafilatoxinas) en la interfase huésped-cisticercos, es decir que desempeñan un papel inmunomodulador de la respuesta del huésped (Laclette *et al.*, 1989; 1992). El cisticercos puede evitar el reclutamiento de células hacia la interfase para disminuir la confrontación con su huésped humano o porcino. Por lo anterior, la TPmy es candidato para el desarrollo de una vacuna en contra de la cisticercosis. Nuestra hipótesis es que generando una respuesta inmune en contra del extremo amino de la TPmy podríamos obtener niveles importantes de protección en contra de la cisticercosis.

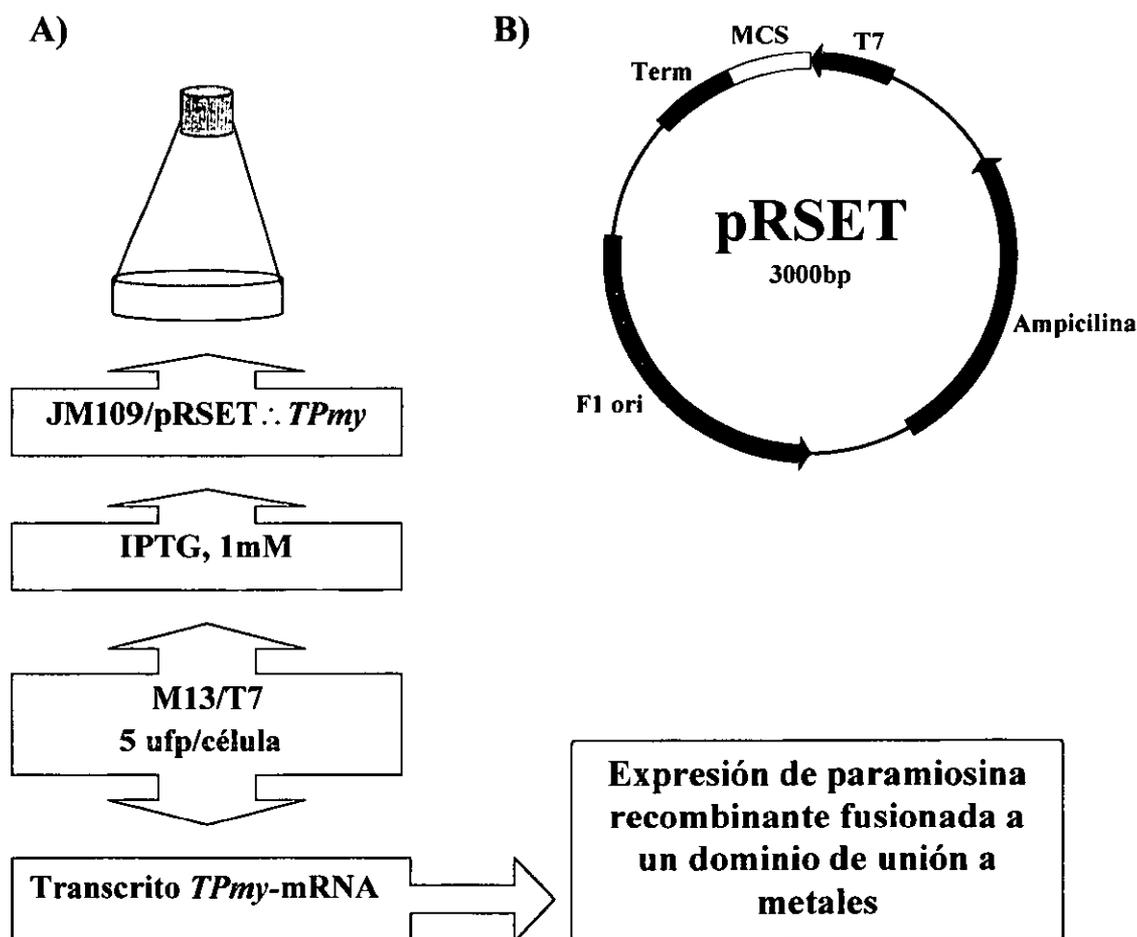
En los últimos años, se han adoptado una serie de modelos experimentales en animales de laboratorio para el estudio de la taeniasis-cisticercosis (Kamiya *et al.*, 1991). El modelo de taeniasis en hamsters susceptibles a la infección por vía oral con cisticercos de *T.solium* presenta una gran similitud con la taeniasis humana (Verster *et al.*, 1974; Monroy-Ostria *et al.*, 1993). Los modelos experimentales de cisticercosis murina por *T.taeniaeformis* en ratas (Rickard *et al.*, 1971; Ayuya *et al.*, 1979) o por *T.crassiceps* en ratones, (Hinz *et al.*, 1965) permiten el estudio de esta enfermedad parasitaria, así como de los efectos curativos y preventivos de fármacos o vacunas con relativa facilidad. A continuación se plantea el uso del modelo experimental de cisticercosis murina por *T.crassiceps* para los ensayos de protección que se reportan en el presente trabajo de tesis.

#### f) Modelo murino de cisticercosis

El modelo murino de cisticercosis por *T.crassiceps* resulta de utilidad para ensayos de protección ya que permite el estudio de un gran número de individuos homogéneos genéticamente, de bajo costo, con relativa facilidad. Además de ser un modelo práctico desde el punto de vista experimental, se observa un alto nivel de inmunidad cruzada entre *T.crassiceps* y *T.solium*. Por ejemplo, se han reportado antígenos de *T.solium* que inducen inmunidad protectora en contra de la cisticercosis murina por *T.crassiceps* (Sciutto *et al.*, 1990). También se ha reportado un alto nivel de reconocimiento cruzado por anticuerpos entre ambas especies (Larralde *et al.*, 1989), e incluso se ha propuesto aprovechar este hallazgo para el inmunodiagnóstico de la neurocisticercosis (Ramos-Kuri *et al.*, 1992).

La cisticercosis murina se induce por inyección intraperitoneal de cisticercos en ratones susceptibles. A diferencia de *T. solium*, los cisticercos de *T.crassiceps* se reproducen asexualmente por gemación. La posible función inmunomoduladora de la TPmy, sugiere que en caso de que provea protección, estaría dirigida en contra del desarrollo de los cisticercos, y no de su establecimiento en el huésped. En el caso de antígenos derivados de oncósferas, como el de la vacuna contra la cisticercosis por *T. ovis* (Johnson *et al.*, 1989), la protección se dirige principalmente en contra de las etapas tempranas en el establecimiento de los cisticercos en los órganos y tejidos del huésped (Rickard *et al.*, 1971; Ito *et al.*, 1991). La cisticercosis experimental en ratas es más similar a la cisticercosis humana y porcina, sin embargo, se ha utilizado menos debido a la dificultad para producir taenias adultas. En cambio, el modelo murino de cisticercosis por *T.crassiceps* sólo depende de la disponibilidad de ratones y de cisticercos que proliferan rápidamente en el peritoneo de ratones susceptibles (alrededor de 100 cisticercos/ratón/mes) y se mantienen fácilmente por pases sucesivos entre ratones.

Por lo anteriormente expuesto, el uso del modelo murino de cisticercosis resulta atractivo para los ensayos de protección ya que permite estimar el desarrollo y la proliferación de los cisticercos alojados artificialmente en el peritoneo de ratones inmunizados con la TPmy y sus proteínas recombinantes (Fig 10). Con ello, es posible explorar inicialmente el potencial de antígenos candidatos a vacuna en contra de la cisticercosis por *T.solium*. Posteriormente será necesario realizar ensayos de vacunación en cerdos para certificar las observaciones en el modelo murino.



**Fig 9.** A) Proceso de inducción de la expresión recombinante de paramiosina en un medio de cultivo bacteriano. Las bacterias utilizadas fueron transformadas con el plásmido pRSET que contiene la secuencia codificadora de la paramiosina o de sus fragmentos. B) Representación esquemática del plásmido pRSET. Este plásmido permite insertar la secuencia codificadora de proteínas en un sitio de clonación (MCS) para después inducir su expresión en cultivos bacterianos de *E. coli*. La secuencia codificadora de proteínas se inserta en fase y por debajo (*downstream*) de una secuencia que codifica para un péptido de fusión amino terminal de 43 aminoácidos que contiene un codón de inicio (ATG) y una secuencia de seis residuos de histidina que constituyen un dominio de unión a metales. La transcripción de la secuencia codificadora del péptido de fusión y de la proteína recombinante que esta bajo el control del promotor viral T7, es llevada a cabo por la RNA-polimerasa T7 ausente en las bacterias de *E. coli*. Esto permite controlar el proceso de inducción de la expresión de proteína recombinante al infectar el cultivo bacteriano en su fase exponencial de crecimiento con un fago ayudador M13/T7 que contiene la secuencia codificadora de la RNA-polimerasa T7 cuya transcripción esta bajo el control del promotor del gen de *lacZ*. Puesto que el cultivo bacteriano contiene IPTG que es un inductor de los genes *lac*, la RNA-polimerasa T7 se expresa y lleva a cabo el proceso de transcripción que resulta en grandes cantidades del transcrito (mRNA) para la proteína recombinante que se traduce fusionada a un péptido de fusión que contiene un dominio de unión a metales que permite su purificación por cromatografía de afinidad a metales.

### III. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

#### A. La TPmy como candidato a vacuna en contra de la cisticercosis murina y porcina

La TPmy es un antígeno inmunodominante de la cisticercosis humana y porcina, presente en la superficie del cisticerco, y con la interesante propiedad de unirse a C1q e inhibir la cascada del complemento, lo que ha llevado a proponer que juega un papel modulador de la respuesta inmune del huésped cisticercoso. Estudios previos muestran que el sitio de unión a C1q se encuentra en el extremo amino terminal de la TPmy, lo que sugiere que la inducción de una respuesta inmune dirigida hacia esa región podría resultar en niveles altos de protección en contra de la cisticercosis.

#### B. Primer objetivo: obtención de antígenos

En el laboratorio se dispone de una colección de cepas de E.coli transformadas con construcciones plasmídicas de expresión bacteriana, que poseen la secuencia nucleotídica que codifica para la TPmy así como fragmentos de la proteína completa.

El primer objetivo de este trabajo de tesis fue el purificar a partir de cultivos bacterianos de expresión, cinco proteínas recombinantes correspondientes a diferentes regiones de la TPmy. También se acopló un péptido sintético de 20 a.a. correspondientes a la secuencia amino terminal de

la TPmy a ovoalbúmina como proteína acarreadora y se obtuvo una fracción de TPmy natural purificada de cisticercos de *T. solium* (nTPmy).

#### C. Segundo objetivo: ensayos de protección

El segundo objetivo fue el probar las cinco proteínas recombinantes, el péptido acoplado a ovoalbúmina (pep-ova) y la nTPmy en ensayos de protección en el modelo murino de cisticercosis por *T. crassiceps* con el propósito de identificar aquellas regiones de la TPmy que pudieran contener epítopes protectores. Para estos experimentos se utilizaron ratones BALB/c hembra que son altamente susceptibles a un reto intraperitoneal con cisticercos de *T. crassiceps*.

#### D. Tercer objetivo: caracterización de la respuesta humoral

A lo largo de los experimentos de protección se colectaron muestras de sangre de los ratones con el propósito de caracterizar algunos aspectos de la respuesta humoral como son los perfiles de clases y subclases de inmunoglobulinas presentes en el suero de los ratones inmunizados con las proteínas recombinantes. Estos sueros también fueron utilizados en ensayos de reactividad cruzada entre las proteínas recombinantes por *western blot* y ELISA.

## IV. MATERIALES Y METODOS

### A. El modelo murino de cisticercosis

#### a) *Cisticercos de Taenia crassiceps*

Se utilizaron cisticercos de la cepa ORF que se caracterizan por carecer de escolex (Smith *et al.*, 1972). Estos parásitos tienen la capacidad de proliferar en el peritoneo de ratones susceptibles, por gemación (Sciutto *et al.*, 1991), y se mantienen por pases sucesivos entre ratones. Inicialmente, se utilizaron cisticercos de la cepa que se maneja en el Instituto de Investigaciones Biomédicas (I.B.B.), sin embargo, después de varias infecciones se encontró que algunas de las larvas colectadas de ratones poseían un escolex, lo que hizo pensar que se trataba de cisticercos de la cepa ORF mezclados con otros de la cepa HIG que poseen escolex. Esto indujo a clonar los cisticercos que carecían de escolex infectando varios ratones con un solo cisticercos con lo que se logró obtener poblaciones homogéneas de la cepa ORF clona I.I.B. sin escolex (ORF-IIB), que se usaron en todos los experimentos.

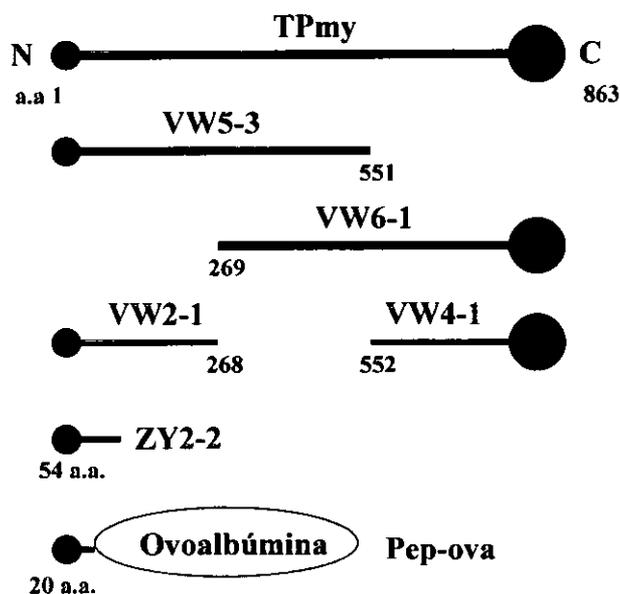
#### b) Ratones

Se utilizaron ratones hembra de 6-8 semanas de edad de la cepa BALB/c, susceptibles a la infección por *T. crassiceps* (Sciutto *et al.* 1991) mantenidos desde hace 20 generaciones en el bioterio del I.I.B. En algunos ensayos de protección se usaron ratones BALB/c del mismo sexo y edad obtenidos comercialmente (*The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine USA*).

#### c) Ensayos de protección en ratones

Se inmunizaron grupos de 6 ratones por inyección intraperitoneal de 50 µg de cada antígeno en hidróxido de aluminio (alúmina) esteril (ver *Preparación del adyuvante*), en un volumen total de 150-200 µl. Los ratones de los grupos control fueron inyectados con un volumen equivalente del adyuvante. En todos los casos se aplicaron dos

inmunizaciones por ratón, a intervalos de una semana. Una semana después de la segunda inmunización, los ratones fueron retados con 10 cisticercos de aproximadamente 1 mm de diámetro, por inyección intraperitoneal en PBS esteril. Seis semanas después del reto, los ratones fueron sacrificados por desnucamiento; los cisticercos se colectaron lavando de la cavidad peritoneal con PBS. Para evaluar la carga parasitaria, se contaron los cisticercos y se midió el volumen que estos desplazan en un tubo de ensayo graduado.



**Fig 10.** Proteínas de la TPmy correspondientes a tercios de la proteína completa: VW5-1, dos tercios amino; VW6-1, dos tercios carboxilo; VW2-1, un tercio amino; VW4-1, un tercio carboxilo. ZY2-2 es una proteína de 54 a.a. en el extremo amino terminal de la TPmy cuya secuencia fue modificada por mutagénesis dirigida para incrementar su afinidad por C1q. Pep-ova es un péptido sintético de 20 a.a. en el extremo amino terminal de la TPmy acoplado covalentemente a ovoalbúmina.

#### d) Sangrado de los ratones

Los ratones son irradiados con una lámpara de luz infraroja durante aproximadamente 10 min. Posteriormente, los animales son inmobilizados en una cámara y se hace un ligero corte superficial aplicando un bisturí transversalmente en el último tercio de la cola. Este procedimiento permite colectar alrededor de 0.5 ml de sangre cada vez. La sangre se deja coagular a 37°C/30 min. Se descarta el coágulo y se centrifuga a 10,000 g/10 min. El suero colectado se vuelve a centrifugar para eliminar restos celulares y se conserva a -20°C indefinidamente, hasta su uso (Harlow y Lane, 1988).

### B. Producción de las proteínas recombinantes de TPmy

#### a) Expresión de las proteínas

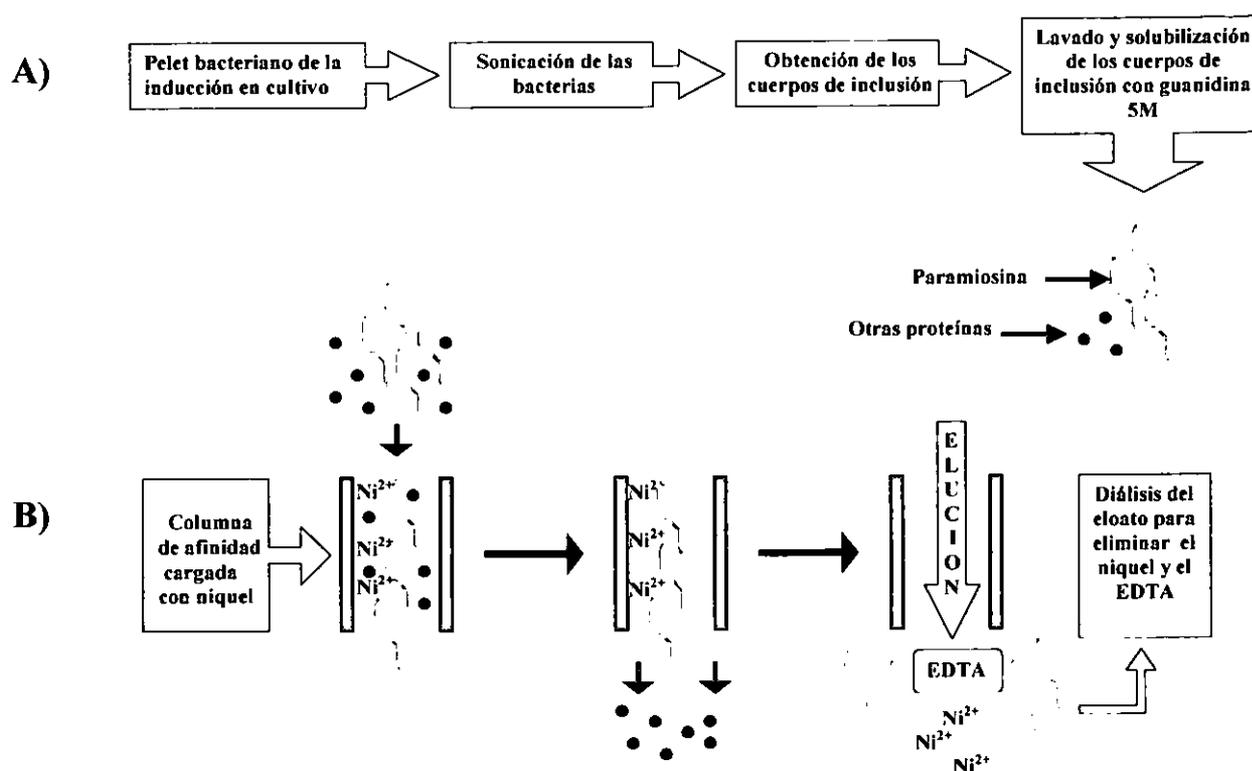
En el laboratorio se dispone de una colección de cepas *E.coli* transformadas con construcciones plasmídicas de expresión bacteriana, que poseen la secuencia nucleotídica que codifica para la TPmy y sus fragmentos (Fig 10). A continuación se describe la propagación de las bacterias transformadas con cada una de las construcciones, así como el procedimiento de inducción de la expresión recombinante de proteína. Cabe mencionar que las condiciones en las que son producidas las proteínas recombinantes de TPmy (expresión de las proteínas, purificación de los cuerpos de inclusión, y purificación de las proteínas recombinantes por cromatografía de afinidad) fueron anteriormente establecidas en el laboratorio del Dr. Charles B. Shoemaker de la universidad de Harvard en Boston Massachusetts, E.U.

Todas las construcciones plasmídicas fueron desarrolladas en el vector de expresión bacteriana pRSET (Fig 9). Las bacterias de *E.coli* (cepa JM109) transformadas con cada una de las construcciones se conservan a -70°C en medio de cultivo SOB (20 g/l de bactotripton; 5 g/l de extracto de levadura; 0.5 g/l de NaCl) con 15% de glicerol estéril. El pRSET posee un promotor viral T7 que es regulado por una RNA polimerasa T7 (ausente en las células bacterianas), cuya secuencia

esta presente en el fago M13/T7, ayudador de la expresión, cuya expresión es a su vez regulada por un promotor del gen de *lacZ* inducible por IPTG. Las bacterias transformadas se crecen en cultivos de 5 ml de medio SOB con ampicilina (100 µg/ml) y 10 mM de MgCl<sub>2</sub>, a 37°C/350 rpm/12 hrs. Se inoculan 100 ml de medio SOB con 1 ml del cultivo anterior y se incuba a 37°C/350 rpm, hasta alcanzar una densidad óptica de 0.3 a 600 nm de longitud de onda. En ese momento se adiciona IPTG a una concentración final de 1mM y se cultivan las bacterias. Una hora después, se mide la densidad óptica del cultivo y se infecta con el fago ayudador M13/T7, a una concentración de 5 unidades formadoras de colonias/célula, considerando el título del fago determinado previamente y tomando en cuenta que 1.0 de D.O.<sub>600nm</sub> equivale a 10<sup>9</sup> células/ml de cultivo. En la mayoría de los casos la máxima expresión de las proteínas recombinantes ocurre 4-6 hrs después de la infección con el fago.

#### b) Purificación de los cuerpos de inclusión

Se cosechan las bacterias de cada inducción por centrifugación a 3,000 g/20 min. Se resuspende el botón en 5 ml de *buffer* A (20 mM de Tris-HCl y sacarosa al 20 %, pH 7.3.); se incuba a 4°C/10 min. Se centrifugan las bacterias a 4,000 g/15 min; el botón se resuspende en 5 ml de agua bidestilada; se incuba a 4°C/10 min. Se centrifuga a 8,000 g/15 min; se resuspende el botón en 1 ml de *buffer* P (PBS con: 0.5 mM de PMSF; 1 µg/ml de leupeptina; 20 µg/ml de aproptina). Se sonicán las muestras con un sonicador de vástago, a 50 watts con 4 pulsos de 30 seg, a intervalos de 30 seg entre cada pulso. Se agregan 1,300 unidades de RNAsa T1 y 400 µg de DNAsa I; se incuba a temperatura ambiente 10 min. Se agregan 4 ml de *buffer* P; se centrifuga a 13,000 g/30 min. El botón se resuspende en 5 ml de *buffer* W (PBS con: sacarosa al 20%, p.v.; tritón X-100 al 1%, v.v.); se incuba a 4°C/10 min. Se centrifuga a 25,000 g/10 min y se repite 2 veces, empezando con el paso anterior con el *buffer* W. El botón se resuspende en 5 ml de *buffer* D (50mM de Tris-HCl, pH 7.3 y 5M de cloruro de guanidina); se sonica a 50 Watts/15



**Fig 11.** Proceso de purificación de las proteínas recombinantes de TPmy. A) Purificación de los cuerpos de inclusión a partir del botón bacteriano de la inducción en medio de cultivo. B) Purificación de la proteína recombinante por cromatografía de afinidad a metales.

seg; se incuba a  $4^{\circ}C/1hr$ . Se centrifuga a 12,000 g/30 min y se recupera el sobrenadante para realizar la última etapa de purificación de las proteínas recombinantes por cromatografía de afinidad (Fig 11).

### c) Purificación de las proteínas recombinantes por cromatografía de afinidad

La secuencia nucleotídica que codifica para la TPmy y sus proteínas fue clonada en el vector de expresión bacteriana pRSET, junto a la secuencia de un péptido de fusión de 43 aminoácidos que incluye un codón de inicio para traducción así como una región de 6 histidinas que forman un dominio de unión a metales. Esto permite expresar a las proteínas recombinantes fusionados a un péptido que contiene un dominio de unión a metales. A continuación se describe el proceso de purificación de las proteínas recombinantes mediante un proceso de afinidad a metales por cromatografía en columna (*HiTrap affinity columns, Pharmacia Biotech*).

Se lavan las columnas (de 1 o 5 ml de capacidad) con 5 volúmenes de agua destilada (el flujo máximo es de una gota por segundo).

Se cargan las columnas con 1 volumen de una solución acuosa de sulfato de níquel, 0.1 M y se incuba 10 min. Se lavan las columnas con 5 volúmenes de agua destilada y 5 de *buffer D* (ver inciso anterior). Se aplica a las columnas 1 volumen de las muestras obtenida en la purificación de los cuerpos de inclusión (último sobrenadante en *buffer D*) y se incuba a temperatura ambiente/10 min. Se lavan las columnas con 5 volúmenes de *buffer D*, 5 del *buffer* de inicio (PBS con 0.5 M de NaCl), y 3 de PBS-Imidazol (PBS con 0.1M de imidazol). Se aplica 1 volumen de *buffer E* (*buffer* de inicio con 50 mM de EDTA) y se incuba a temperatura ambiente/30 min. Posteriormente, se eluyen las proteínas recombinantes aplicando un flujo constante de *buffer E*, y colectando al mismo tiempo fracciones de proteína recombinante. Generalmente, la proteína recombinante se recupera

en los 3 primeros volúmenes de la elución, casi a homogeneidad.

Las muestras son dializadas 12 hrs contra un *buffer* R (0.6 M de KCl; 40 mM de Tris-HCl, pH 7.3; 10 mM de EDTA; 1 mM de PMSF; 50 µg/ml de TLCK; 25 µg/ml de leupeptina) en un tubo eppendorf con una perforación de 4 mm de diámetro en la tapa; entre la boca del tubo y la tapa se coloca una membrana diálisis con una porosidad para moléculas de 12-14 kDa. Este procedimiento permite mejorar el rendimiento de proteína recombinante dializada ya que la TPmy se pega considerablemente a la membrana de diálisis.

### C. Ensayos de ELISA

Los sueros colectados de ratones inmunizados con las diferentes proteínas recombinantes nos permiten analizar aspectos relevantes de la respuesta humoral. El método de ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) permite evaluar cuantitativamente el reconocimiento de proteínas adheridas a micropozos de plástico rígido (poliestireno por ejemplo), por anticuerpos (inmunoglobulinas). La reacción se revela utilizando un segundo anticuerpo α-Igs (en este caso de ratón) acoplado a una enzima (como la peroxidasa) que en presencia del sustrato adecuado da una reacción colorida que se estima por espectrofotometría. A continuación se describe detalladamente el ensayo estándar de ELISA, así como sus variaciones para determinar el reconocimiento cruzado entre las proteínas recombinantes y los patrones de inmunoglobulinas en el suero de ratones inmunizados.

#### a) Ensayo estándar

Se sensibilizan las placas de ELISA (*Immunolon-rigid polystyrene, Dynatech laboratories*) con 100 ng/100 µl/pozo de proteína diluida en *buffer* de carbonatos (15 mM de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; 28 mM de NaHCO<sub>3</sub>; pH 9.6), a 4°C/12 hrs. Se lavan 3 veces los pozos con PBS-Tw20 (PBS con Tween-20 al 0.3 %, v.v.), y se agregan 100 µl/pozo del suero por valorar, diluido 1:100 en PBS-Tw20-BSA (PBS-Tw20 con BSA, 1% p.v.). Se incuban las placas 1 hr con agitación ligera a temperatura ambiente, y se lavan los

pozos. Se agregan 100 µl/pozo del anticuerpo α-Igs de ratón conjugado a peroxidasa (*Zymed Laboratories Inc.*), diluido 1:1000 en PBS-Tw20. Se incuba 1 hr y se lavan los pozos. La reacción se revela con 100 µl/pozo de una solución que se prepara disolviendo 4 mg de OPD en 10 ml de un *buffer* de citratos-fosfatos (50 mM de citrato de sodio; 50 mM de fosfato de potasio dibásico; pH 5.0) más 4 µl de peróxido de hidrógeno. La reacción colorida de tono amarillo-anaranjado se detiene a los 10 min mediante la adición de 50 µl/pozo de una solución de ácido sulfúrico 2.5 N y se evalúa en el espectrofotómetro, a 490 nm.

#### b) Ensayos de reconocimiento cruzado entre las proteínas recombinantes

Se sensibilizan las placas de ELISA con 100 µl/pozo de una dilución 1:1000 (en *buffer* de carbonatos) de un anticuerpo policlonal, generado en contra del dominio de unión a metales presente en las proteínas recombinantes; se incuban a 4°C/12 hrs. Se lavan los pozos de igual forma que en el ensayo estándar. Se incuban las placas 1 hr con 1 µg/100 µl/pozo de proteína recombinante diluida en *buffer* de carbonatos, a temperatura ambiente con ligera agitación. Con este procedimiento, se fijan cantidades equimolares de cada proteína recombinante en los pozos. Se lavan 3 veces los pozos con PBS-Tw20 y se agregan 100 µl/pozo del suero por valorar diluido 1:100 en PBS-Tw20-BSA. El resto del procedimiento que prosigue con la incubación de las placas de ELISA con el suero α-Igs de ratón, es el mismo que el del protocolo estándar.

#### c) Patrones de inmunoglobulinas

Se sensibilizan las placas de ELISA con 100 ng/100 µl/pozo de un extracto crudo de cisticercos (ver *Extracto crudo de cisticercos*) diluido en *buffer* de carbonatos; se incuban a 4°C/12 hrs. Se lavan los pozos como en el ensayo estándar; se incuban 1 hr con 100 µl/pozo de PBS/leche (PBS con: leche descremada en polvo marca *Svelty, Nestlé Co.*, al 5% p.v.) y se lavan los pozos. Se agregan 100 µl/pozo del suero por valorar, diluido 1:100 en PBS-Tw20-BSA; se incuban las placas 1 hr con

agitación ligera a temperatura ambiente, y se lavan los pozos. Se incuba con 100  $\mu$ l/pozo de una dilución 1:1000 en *buffer* PBS-Tw20 de sueros monoespecíficos  $\alpha$ -IgG1,  $\alpha$ -IgG2a,  $\alpha$ -IgG2b,  $\alpha$ -IgG3,  $\alpha$ -IgM,  $\alpha$ -IgA (todos ellos para ratón y conjugados a peroxidasa). El procedimiento para revelar la reacción colorida es el mismo que en el método estandar. Las lecturas se realizan a 450 nm de longitud de onda.

#### D. Métodos miscelaneos

##### a) Extracto crudo de *cisticercos*

Los *cisticercos* de *T. solium* (extraídos de carne de cerdo *cisticercoso*) son homogeneizados con un polytrón, en *buffer* H (0.1M de KCl; 40mM de Tris-HCl, pH7.3; 10mM de EDTA; 1mM de PMSF; 50 $\mu$ g/ml de TLCK; 25 $\mu$ g/ml de leupeptina). El homogenado se centrifuga a 10,000 rpm/10 min, a 4°C. El sobrenadante obtenido se utiliza como extracto crudo en diversos ensayos y el botón sirve de materia prima para la purificación de paramiosina natural.

##### b) Purificación de la TPmy natural

El botón obtenido de un homogenado de *cisticercos* como el del protocolo anterior, se resuspende en *buffer* R (ver *Purificación de las proteínas recombinantes por cromatografía de afinidad*). Se agita lentamente a 4°C/30 min; se centrifuga a 10,000 rpm/10 min. Se recupera el sobrenadante y se agregan gradualmente 3 volúmenes de etanol al 96% con  $\beta$ -mercaptoetanol, 0.5 M. Tanto la actomiosina desnaturalizada como la TPmy precipitada se colectan por centrifugación a 10,000 rpm/30 min. El botón se resuspende en 4 ml de *buffer* R y se dializa contra el mismo *buffer*, a 4°C/12 hrs. La muestra dializada se centrifuga a 10,000 rpm/30 min; se recupera el sobrenadante libre de actomiosina. Mientras se agita a 4°C, se agrega gradualmente ácido clorhídrico, 0.1 N hasta alcanzar un pH de 5.8. La TPmy precipitada se colecta por centrifugación a 10,000 rpm/20 min. El botón de TPmy se resuspende en un volumen adecuado de *buffer* R.

##### c) Cuantificación de proteínas

Todas las fracciones protéicas utilizadas en los experimentos reportados en esta tesis fueron cuantificadas por el microensayo de Bradford. De acuerdo a las instrucciones del fabricante, se mezclan 40  $\mu$ l del reactivo de Bradford concentrado (*Bio-Rad Laboratories*) con 160  $\mu$ l de una dilución adecuada de proteína (< 80  $\mu$ g/ml). Se mide la absorbancia de las muestras en el espectrofotómetro a 595nm. Se determina la concentración de las muestras problema con relación a una curva patrón de BSA.

##### d) Electroforesis de proteínas

Se utilizó el método de electroforesis en minigeles de Poliacrilamida-SDS al 10 y 12%, en un sistema de gel discontinuo (Laemmli *et al.*, 1970). Las muestras protéicas se mezclan con un *buffer* desnaturalizante 10 X (glicerol al 10% v.v.; SDS al 23% p.v.; 62 mM de Tris-HCl, pH 6.8; 2-mercaptoetanol al 5% v.v.; azul de bromofenol al 0.001% p.v.) y se hierven 5 min antes de ser cargadas en los pozos del gel superior. La *electroforesis* se realiza en un *buffer* de Tris-glicina (25mM de Tris base; 250mM de glicina; SDS al 0.1% v.v.; pH 8.3), aplicando un voltaje constante de 100 V. Cuando el frente de corrida con azul de bromofenol alcanza la parte inferior del gel separador, se interrumpe la electroforesis; se tiñen las proteínas resueltas en el gel con agitación/30 min, en una solución de azul de coomassie (metanol al 45% v.v.; ácido acético al 10% v.v.; azul de coomassie R-250 o G-250 (*Bio Rad Laboratories Inc.*) al 0.1% p.v.); se aclara el fondo del gel en una solución desteñidora (ácido acético al 10% v.v. y metanol al 5% v.v.), hasta obtener el mejor contraste. Para conservar el gel indefinidamente, se coloca entre dos hojas de celofán (*Pharmacia Biotech Inc.*) previamente humedecidas en agua; se sujeta el emparedado del gel con celofán en un marco de acrílico; se deshidrata el gel a temperatura ambiente/12 hrs.

##### e) Western-blot

Este método es ampliamente utilizado para determinar cualitativa o semi-cuantitativamente el

reconocimiento de proteínas transferidas a una membrana de nitrocelulosa por anticuerpos (Towbin *et al.*, 1979). Las proteínas de interés se resuelven por electroforesis en gel; se transfieren a un papel de nitrocelulosa usando un *buffer* de Tris-base, 25 mM; glicina, 193 mM; metanol, 20% v.v., aplicando una corriente de 24 volts/30 min. Se verifica la transferencia con una solución de *Ponceau* que tiñe debilmente las proteínas; se corta el papel de nitrocelulosa en tiras correspondientes a los carriles de la electroforesis en gel; Se incuban las tiras con agitación lenta, a temperatura ambiente/1 hr, en PBS/BSA (PBS con BSA al 3% p.v.). Se incuban con el suero que se va a evaluar diluido generalmente 1:100 en PBS/BSA. Se lavan las tiras de nitrocelulosa 3 veces en PBS/Tw20 (PBS con Tween-20 al 0.05% v.v.); se incuban las tiras con un suero  $\alpha$ -Igs de ratón conjugado a peroxidasa, diluido 1:1000 en el mismo *buffer* de PBS/BSA. Se vuelven a lavar las tiras de nitrocelulosa y se revela la reacción con PBS adicionado con 0.5 mg/ml de diaminobenzidina y 0.001 % v.v de peróxido de hidrógeno. La reacción colorida se detiene con agua a un tiempo fijo para todas las tiras en un ensayo.

#### f) Preparación del adyuvante

La alúmina se prepara mezclando  $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$  al 10% en solución acuosa (Harlow y Lane, 1988): se agregan de forma gradual 22.8 ml de una solución acuosa de NaOH, 0.25 N, a 10 ml de la solución de  $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$ ; se incuba a temperatura ambiente 10 min, se centrifuga a 1000 g/10 min y se descarta el sobrenadante. Se resuspende el botón en 50 ml de agua destilada; se centrifuga a 1000 g/10 min; se descarta el sobrenadante y se resuspende el botón otra vez en 10 ml de agua destilada. Determinaciones realizadas indican que un mg de  $\text{Al}_2(\text{OH})_3$  permite atrapar 50-100  $\mu\text{g}$  de proteína recombinante.

#### g) Preparación de las muestras para inmunizar

Las muestras para inmunizar se prepararon mezclando 50 $\mu\text{g}$  de la(s) proteína(s) en solución con el adyuvante (hidróxido de aluminio) en una

proporción 1:1. Para todas las proteínas recombinantes y la paramiosina natural purificada de cisticercos de *T.solium* (nTPmy), la formula por dosis/ratón contuvo 50 $\mu\text{g}$  de la proteína, 50-125  $\mu\text{l}$  de hidróxido de aluminio, 0.3 M de KCl, 20mM de Tris-HCl (pH 7.3), 5mM de EDTA, en un volumen final de 100-250  $\mu\text{l}$ . La formula por dosis/ratón de las muestras preparadas con ovoalbúmina y con el péptido sintético acoplado a ovoalbúmina, contuvo 50  $\mu\text{g}$  de proteína, 50-100  $\mu\text{l}$  de hidróxido de aluminio y PBS, pH 8.0 diluido 1:2 en un volumen final de 100-200  $\mu\text{l}$ . Las muestras se dejaron 20 min. a temperatura ambiente antes de ser inyectadas. En todos los experimentos se guardó una muestra equivalente a la inyectada a los ratones para verificar la efectividad de la adsorción de la muestra protéica al hidróxido de aluminio. Para ello, se centrifugó la preparación proteína-adyuvante a 10,500 rpm y se analizó el sobrenadante por electroforesis en gel de poliacrilamida. En ningún caso se detectó la presencia de proteína en el sobrenadante de las muestras inyectadas a los ratones.

#### h) Acoplamiento de un péptido sintético de TPmy a ovoalbúmina

Se acopló a ovoalbúmina un péptido sintético de 20 aminoácidos correspondiente al extremo amino terminal de TPmy ( $\text{NH}_2$ --MSESHVKISRTHIRGTSPSC--COOH) siguiendo el método del alditriol (Alagón *et al.*, 1980). Se disuelven 0.25 mg/ml del péptido sintético en PBS, pH 6.6, mezclando con un sonicador de vástago a una potencia de 60 watts/15 seg y se agrega  $\beta$ -mercaptoetanol a una concentración final de 100 mM. Se prepara una solución de ovoalbúmina en PBS, pH 8.0 y se le agrega 500mM de alditriol disuelto en DMSO. Se determina por titulación espectrofotométrica en presencia de 4,4'ditiodipiridina el contenido de grupos sulfhidrilo en la ovoalbúmina activada con alditriol (aprox. 10 tioles libres/molécula de ovoalbúmina, lo que significa que una molécula de ovoalbúmina puede unirse a 10 moléculas del péptido sintético reducido). Se mezcla el péptido sintético reducido como la ovoalbúmina activada en una proporción

molecular  $\geq 10$  y se incubó a 4°C/12hrs. Para certificar que el péptido se acopló a la ovoalbúmina, se realizó un ensayo de ELISA usando un antisuero producido en ratón en contra del péptido solo. El

antisuero fue producido por triple inyección intraperitoneal de 25  $\mu$ g del péptido sintético adsorbido sobre alúmina a intervalos de una semana.

## V. RESULTADOS

### A. Producción y purificación de las proteínas recombinantes de TPmy

En los ensayos de protección reportados en esta tesis de licenciatura, se evaluaron cinco proteínas recombinantes correspondientes a tercios de la TPmy (Fig 10). Estas cinco proteínas recombinantes (VW 6-1, VW 5-3, VW 4-1, VW 2-1 y ZY 2-2) se obtuvieron a partir de cultivos de bacterias transformadas con construcciones plasmídicas de expresión que contienen la secuencia codificadora de cada una de estas proteínas de la TPmy. En estos plásmidos, la transcripción de la secuencia codificadora de las proteínas recombinantes de TPmy esta bajo control de un promotor del fago M13/T7. La transcripción se lleva a cabo por medio de la RNA polimerasa del fago T7, ausente en las bacterias de *E. coli*. Las bacterias transformadas con cada una de las construcciones plasmídicas, se crecen en presencia de IPTG y se infectan con un fago ayudador M13/T7 que contiene la secuencia codificadora de la RNA polimerasa del fago T7 cuya expresión es regulada por el promotor del gen de *lacZ* inducible por IPTG.

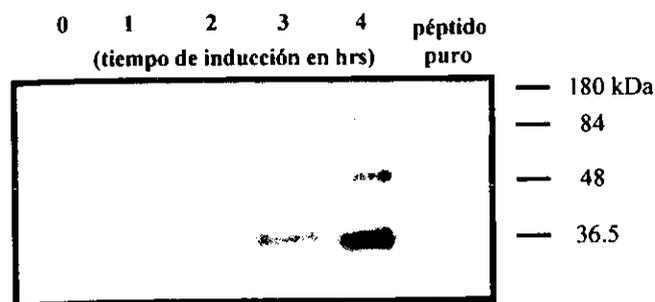


Fig 12. Electroforesis en gel de poliacrilamida de varias muestras tomadas de un cultivo bacteriano para la expresión recombinante de una proteína de TPmy (VW4-1). Las muestras se tomaron a intervalos de 1hr durante el proceso de inducción de la expresión recombinante de la proteína VW4-1.

La máxima expresión de cada una de las proteínas recombinantes se observó entre las cuatro y seis horas de iniciada la inducción que comienza al momento de infectar los cultivos con el fago ayudador M13/T7. En la electroforesis en gel de figura 12 se observa una banda que migra a la misma altura que la proteína recombinante purificada y que se hace más intensa conforme transcurre el tiempo de inducción. También se observa una banda intensa con un peso molecular mayor de aproximadamente 60 kDa que probablemente corresponde a la forma dimérica de la proteína recombinante. Aunque la electroforesis en gel se realizó en condiciones desnaturizantes, las muestras tomadas de la inducción resultaron tan densas que la desnaturización de las proteínas pudo ser parcial.

Anteriormente nuestro grupo encontró que las proteínas recombinantes de TPmy son acumuladas por las bacterias en los llamados cuerpos de inclusión tal y como ocurre con otras proteínas recombinantes descritas por otros autores (Wong *et al.*, 1987). Por ello, la obtención y purificación de las proteínas recombinantes de TPmy se lleva a cabo aislando inicialmente estas inclusiones citoplásmicas. Una vez que se obtienen los cuerpos de inclusión, se desnaturizan en presencia de altas concentraciones de cloruro de guanidina y se recupera la fracción soluble por centrifugación para continuar con el proceso de purificación de las proteínas recombinantes por cromatografía de afinidad. Las proteínas recombinantes se coexpresan con un péptido de fusión de 43 aminoácidos en el extremo amino terminal que contiene un dominio de unión a metales formado por seis histidinas que permite capturar las proteínas recombinantes en columnas de afinidad cargadas con níquel. Posteriormente, las columnas se lavan y se eluyen las proteínas recombinantes con un agente quelante como es el EDTA. De esta forma se obtienen fracciones de proteínas recombinantes de TPmy con un alto

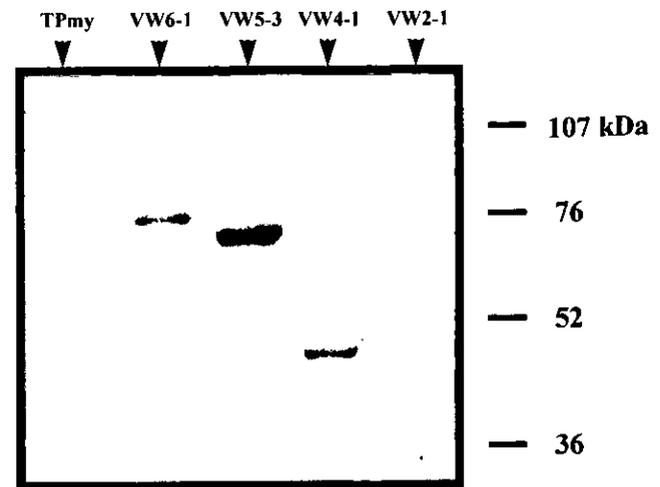
grado de pureza, en cantidades del orden de los miligramos (Fig 13).

### B. Ensayos de protección con las proteínas recombinantes de TPmy

Se realizaron ensayos de protección en contra de la cisticercosis por *T. crassiceps* en ratones inmunizados con cada una de las cinco proteínas recombinantes de TPmy (Fig 10), así como con un péptido sintético de 20 a.a. en el extremo amino terminal. Las proteínas son (Fig 10): VW 2-1, correspondiente a un tercio de la TPmy en el extremo amino terminal; VW 5-3, correspondiente a dos tercios de la TPmy en el extremo amino terminal; VW 6-1, correspondiente a dos tercios de la TPmy en el extremo carboxilo terminal; VW 4-1, correspondiente a un tercio del TPmy en el extremo carboxilo terminal; ZY 2-2, correspondiente a 54 a.a de la TPmy en el extremo amino terminal, cuya secuencia fue modificada por mutagénesis dirigida para estabilizar la estructura homodimérica de la proteína (Fig 7); y pep-ova, correspondiente a un péptido sintético de 20 a.a. de la TPmy en el extremo amino terminal, acoplado a ovoalbúmina. La protección se evaluó en base a la carga parasitaria que presentaron los ratones inmunizados en comparación con los ratones controles inyectados únicamente con el adyuvante. El nivel de infestación se evaluó tanto por el número de cisticercos como por su volumen, seis semanas después de un reto intraperitoneal con cisticercos y la protección obtenida se expresó como el promedio de ambas factores. A continuación se describen los resultados obtenidos en tres ensayos de protección realizados en condiciones equivalentes.

#### a) Ensayo de protección 1

Se examinaron grupos de ratones inmunizados con: VW 2-1, VW 4-1, VW 6-1, y ZY 2-2. El grupo control que fue inyectado con alúmina, presentó una carga parasitaria promedio de  $70 \pm 46$  cisticercos (Tabla II). En contraste, el grupo VW 2-1 presentó una carga parasitaria promedio de  $9 \pm 18$  cisticercos, con un volumen de  $9 \pm 17$ , lo que indica que fue protegido en un 88% con relación al grupo control.



**Fig 13.** Electroforesis en gel de poliacrilamida con tinción con azul de *coomassie* de fragmentos recombinantes de la paramiosina de *T. Solium* (TPmy) purificados.

En el grupo VW 6-1 la protección resultó de apenas 31%. En los demás grupos (VW 4-1, VW 6-1, y ZY 2-2) no se observó una disminución significativa de la carga parasitaria con respecto a los controles. Este ensayo sugirió que la mayor parte de la actividad protectora de la TPmy residía en el extremo amino terminal, sin embargo, en los experimentos subsecuentes la protección inducida por VW2-1 no fue tan contundente.

#### b) Ensayo de protección 2

En este ensayo se incluyeron grupos inmunizados con: VW 2-1, VW 4-1, VW5-3, y VW 6-1. El grupo control inyectado con alúmina presentó una carga parasitaria de  $64 \pm 29$  cisticercos (Tabla III). En este ensayo, el grupo VW 2-1 presentó una carga parasitaria de  $34 \pm 30$  cisticercos, con un volumen de  $53 \pm 52$   $\mu$ l, lo que significa una protección del 45%. Sin embargo, en este ensayo los grupos de ratones inmunizados con las proteínas VW4-1, VW5-3 y VW6-1 si presentaron una disminución significativa de la carga parasitaria, similar a la encontrada en el grupo de ratones inmunizados con el VW2-1, aunque en el caso del grupo VW 4-1, sólo disminuyó el número de larvas. Este ensayo sugirió la existencia de epítopes protectores en toda la TPmy, pero los resultados de

protección de tres ensayos reportados en el presente trabajo de tesis mostraron que estos epítopes protegen de forma irregular.

### c) Ensayo de protección 3

Se examinaron grupos de ratones inmunizados con: VW 2-1, VW 4-1, VW 5-3, TPmy purificada de cisticercos, y pep-ova. El grupo control de ratones inyectados con alúmina presentó una carga parasitaria promedio de  $60 \pm 47$  cisticercos (Tabla IV). En contraste, el grupo inmunizado con la TPmy purificada de cisticercos presentó una carga parasitaria de  $2 \pm 3$  cisticercos, lo que significó una protección casi total, superior al 97%. Por otro lado, los grupos inmunizados con el pep-ova y el VW 2-1 presentaron un nivel de protección similar, del 56 y 63% respectivamente, lo cual llama la atención ya que ambos antígenos tienen en común 20 aminoácidos del extremo amino terminal de la TPmy. El grupo inmunizado con el VW 4-1 presentó una protección de apenas el 12%. Estos resultados, junto con los de los dos ensayos anteriores, sugieren que aunque al parecer hay epítopes protectores en todas las proteínas de TPmy, los que se encuentran en el extremo amino terminal son los que protegen con mayor regularidad.

## C. Respuesta humoral

### a) Respuesta humoral en contra de las proteínas recombinantes de TPmy

Durante los ensayos de protección se colectaron los sueros de los ratones cada semana y hasta el sacrificio. Los sueros de los ratones inmunizados con las proteínas de TPmy, antes del reto con cisticercos, contenían anticuerpos que reaccionan con la paramiosina natural de *T. solium* (nTPmy), ya sea purificada de cisticercos o en un extracto crudo, por ensayos de western-blot (Fig 14). Como control se utilizó un suero hiperinmune anti-nTPmy. Estos resultados sugieren que las proteínas recombinantes de TPmy poseen una conformación al menos parcialmente equivalente a la de nTPmy.

### b) Reconocimiento cruzado entre las proteínas de TPmy

Puesto que la TPmy es una molécula con una estructura bastante homogénea de superhélice (Fig 7), se realizaron experimentos para determinar si los anticuerpos inducidos por inmunización de los ratones con cada una de las proteínas recombinantes, reconocían solamente a su fragmento o si se presentaban reacciones cruzadas entre ellos. Para ello se realizaron ensayos de ELISA con una mezcla de los sueros de los ratones inmunizados con cada proteína, colectados antes del reto con cisticercos. Asimismo, se cuidó que en el ensayo hubiera cantidades equimolares de cada proteína. Estos ensayos de reactividad cruzada sugieren que los anticuerpos generados por ratones

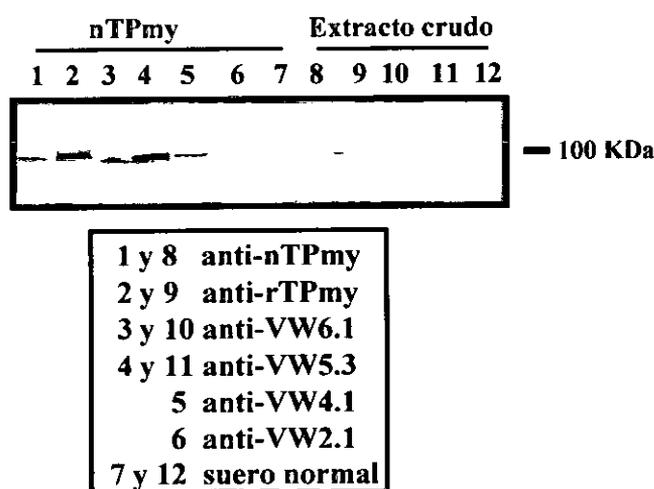


Fig 14. Western blot en el que se probaron los sueros de ratones inmunizados 2 veces a intervalos de una semana con  $50 \mu\text{g}$  de cada uno de las proteínas recombinantes de TPmy y de la proteína completa natural (nTPmy) o recombinante (rTPmy), en contra de un extracto crudo de cisticercos de *T. solium* (carriles 1-7), y de una fracción de TPmy natural purificada de cisticercos de *T. solium* (carriles 8-12). En todos los casos se utilizó una dilución 1:100 de los sueros evaluados. La reacción se reveló con una dilución 1:1000 de un suero  $\alpha$ -Igs de ratón conjugado a peroxidasa. Como control negativo, se utilizó el suero normal de un ratón no inmunizado (carriles 7 y 12).

Tabla II. Ensayo de protección 1

Carga parasitaria						
Grupo	N° ratones	N° cisticercos	$\bar{x} \pm \text{d.e.}$	Vol. Desplazado ( $\mu\text{l}$ )	$\bar{y} \pm \text{d.e.}$	p%
Alúmina	5	20,31,73,92,134	$70 \pm 46$	10,53,60,75,200	$80 \pm 71$	-
VW2-1	5	0,0,1,2,41	$9 \pm 18$	0,0,1,4,40	$9 \pm 17$	88
VW4-1	6	40,73,78,82,110,147	$88 \pm 36$	20,60,75,100,150,250	$109 \pm 82$	-
VW6-1	6	2,41,43,43,57,100	$48 \pm 32$	2,50,50,70,75,150	$66 \pm 50$	16
ZY2-2	6	16,32,56,69,94,114	$64 \pm 37$	10,25,50,80,125,125	$69 \pm 50$	-

Tabla III. Ensayos de protección 2

Carga parasitaria						
Grupo	N° ratones	N° cisticercos	$\bar{x} \pm \text{d.e.}$	Vol. Desplazado ( $\mu\text{l}$ )	$\bar{y} \pm \text{d.e.}$	p%
Alúmina	5	38,44,54,76,110	$64 \pm 29$	60,60,100,120,120	$92 \pm 30$	-
VW 2-1	6	7,9,18,38,43,86	$34 \pm 30$	15,15,25,50,60,150	$53 \pm 51$	45
VW 4-1	6	0,0,10,20,66,150	$33 \pm 42$	0,0,35,50,100,200	$96 \pm 75$	24
VW 6-1	5	0,3,29,36,99	$33 \pm 40$	10,30,50,150	$60 \pm 62$	42
VW 5-3	5	12,14,32,36,102	$39 \pm 37$	25,25,35,50,150	$57 \pm 53$	48

Tabla IV. Ensayo de protección 3

Carga parasitaria						
Grupo	N° ratones	N° cisticercos	$\bar{x} \pm \text{d.e.}$	Vol. Desplazado ( $\mu\text{l}$ )	$\bar{y} \pm \text{d.e.}$	p%
Alúmina	6	2,13,60,66,89,127	$67 \pm 47$	2,50,200,250,350,400	$209 \pm 159$	-
VW 2-1	6	0,0,1,51,55,67	$29 \pm 32$	0,0,1,150,160,200	$85 \pm 94$	56
VW 4-1	6	0,0,8,65,96,109	$46 \pm 50$	0,0,30,350,400,550	$222 \pm 241$	12
VW 5-3	6	38,87,88,100,100,103	$86 \pm 25$	150,300,350,400,450,600	$375 \pm 151$	-
nTPmy	5	0,0,0,2,7	$2 \pm 3$	0,0,0,5,10	$3 \pm 4$	98
ova.	6	9,77,77,87,120,170	$90 \pm 53$	15,80,90,120,170,240	$119 \pm 57$	-
pep-ova	6	0,5,12,21,29,78	$24 \pm 28$	0,20,20,70,260	$73 \pm 96$	63

$\bar{x}$ , promedio de la carga parasitaria por el número de cisticercos  $\pm$  desviación estándar

$\bar{y}$ , promedio de la carga parasitaria por el volumen desplazado  $\pm$  desviación estándar

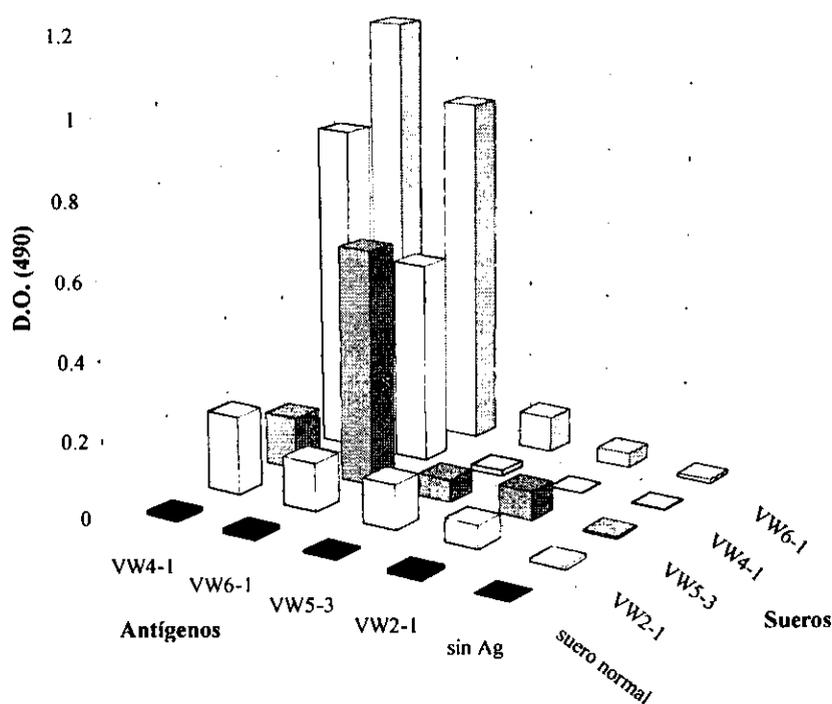
nTPmy, paramiosina natural purificada de cisticercos, con una pureza superior al 85% por densitometría.

pep-ova, péptido sintético de 20 a.a. en el extremo amino terminal de la TPmy acoplado a ovoalbúmina (ova.)

p%, protección igual al promedio entre la disminución de la carga parasitaria por el número y por el volumen de las larvas con relación al grupo control.

inmunizados con las proteínas recombinantes de TPmy reaccionan preferentemente con epítopes ubicados en el extremo carboxilo terminal de la TPmy (Fig 15). Por ejemplo, el suero inducido con la proteína carboxilo terminal (VW4-1) mostró una alta reactividad hacia VW 4-1 y hacia VW 6-1, que también incluye el tercio carboxilo terminal. En cambio, el suero inducido por la

proteína VW 2-1 contiene anticuerpos que reaccionaron en forma similar con los tercios amino y carboxilo (VW 4-1 y VW2-1). El suero anti-VW2-1 reaccionó débilmente con todas las proteínas, incluso la VW2-1, con un nivel de reconocimiento de una magnitud 3-5 veces menor que la encontrada con el resto de los sueros anti-TPmy.



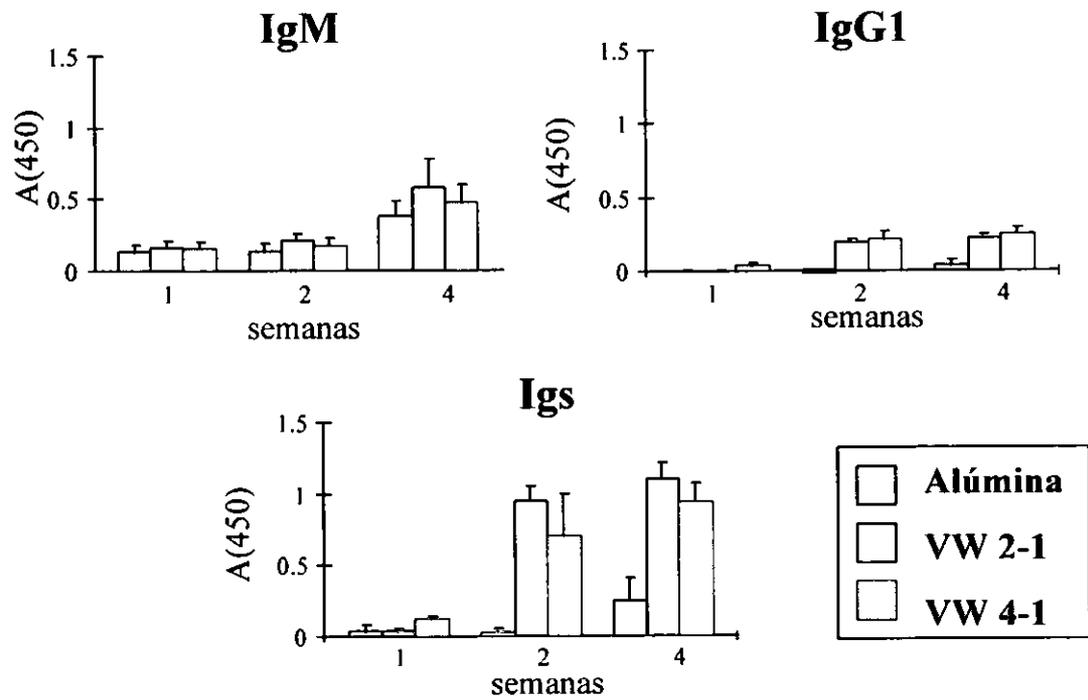
**Fig 15.** Ensayo de reactividad cruzada entre las proteínas recombinantes de la TPmy. Se determinó la reactividad de los anticuerpos generados por ratones inmunizados con las proteínas recombinantes de TPmy en contra de cantidades equimolares de esas mismas proteínas adsorbidas a placas de ELISA. Para cada combinación antígeno-suero se llevo a cabo el ensayo de ELISA por duplicado, utilizando una mezcla homogénea de los sueros de 6 ratones inmunizados con una de cuatro proteínas recombinantes de TPmy. La reacción se reveló con anticuerpos  $\alpha$ -Igs de ratón acoplados a peroxidasa.

Estos resultados son consistentes con la observación de que la respuesta humoral de pacientes cisticercosos y de ratones infectados con *T. crassiceps* es mucho más intensa en contra del extremo carboxilo terminal de la TPmy que en contra del amino terminal. Estos resultados además apoyan la idea de que los anticuerpos principalmente dirigidos hacia el extremo carboxilo terminal de la TPmy no bloquearían la actividad inhibitoria del complemento que como se sabe reside en el extremo amino terminal de la TPmy (datos no publicados).

### c) Patrones de inmunoglobulinas

Para iniciar la caracterización de la respuesta humoral inducida por las proteínas recombinantes de TPmy, se realizaron ensayos en los que se adsorbió un extracto crudo de cisticercos a

microplacas de ELISA. Posteriormente, se incubaron con una mezcla de los sueros de ratones inmunizados con el VW 2-1 y el VW 4-1 que se colectaron durante los ensayos de protección cada semana y hasta el sacrificio. La reacción se reveló utilizando anticuerpos monoespecíficos  $\alpha$ -IgG1,  $\alpha$ -IgG2a,  $\alpha$ -IgG2b,  $\alpha$ -IgG3,  $\alpha$ -IgM, y  $\alpha$ -IgA de ratón acoplados a fosfatasa alcalina. Como lo muestra la figura 16, las respuestas de IgM e IgG1 crecieron gradualmente a partir de la primera inmunización con las proteínas. Ninguna de las otras subclases IgG2a, IgG2b, IgG3 e IgA fue detectada en los ensayos. Además, no se detectaron diferencias significativas en los niveles de IgM o IgG1 entre los grupos inmunizados con las distintas proteínas en los plazos en los que se realizaron los experimentos.



**Fig 16.** Patrones de inmunoglobulinas en ratones inmunizados con los tercios amino y carboxilo terminales de la TPmy (VW 2-1 y VW 4-1). Se determinó por ELISA la presencia de clases y subclases de Igs en una mezcla homogénea del suero de seis ratones, una, dos y cuatro semanas después de la primera inmunización.

## VI. DISCUSION

En el presente trabajo de tesis se reportan resultados preliminares de protección en contra de la cisticercosis murina por *T. crassiceps* con proteínas recombinantes de TPmy, así como algunos aspectos relevantes sobre la respuesta humoral que se desarrolla en el ratón. Puesto que se trata de una proteína filamentosa, el diseño de los fragmentos de TPmy que se probaron se basó en una sencilla subdivisión de la proteína en tercios a lo largo de su longitud (Fig 10). Las proteínas de TPmy, correspondientes a los tercios de la proteína, se expresaron como proteínas de fusión en cultivos de *E. coli* de 250-500 ml en cantidades del orden de los miligramos y se purificaron por cromatografía en columnas de afinidad (Fig 13).

### a) Ensayos de protección

Los ensayos de protección se realizaron en condiciones experimentales controladas ya que se utilizaron ratones BALB/c hembra, homogéneos genéticamente; cisticercos de la cepa ORF-IIB, clonados de un cisticercos; así como proteínas recombinantes con un alto grado de pureza, que fueron mezcladas con un adyuvante estéril e inerte.

En los tres ensayos, los ratones control que habían sido inyectados con alúmina e infectados, presentaron una carga parasitaria promedio de  $60 \pm 36$  cisticercos (Tabla V), mientras que los resultados por ensayo fueron de  $70 \pm 46$  cisticercos (Tabla II),  $64 \pm 29$  cisticercos (Tabla III), y  $60 \pm 47$  cisticercos (Tabla IV). A pesar de los múltiples factores biológicos que participan en la relación huésped-cisticercos, las condiciones en las que se desarrollaron los experimentos, permitieron una razonable reproducibilidad en los tres experimentos que se reportan en esta tesis. Para valorar el significado estadístico de los resultados de protección, se realizó un análisis de varianza y pruebas *post-oc*.

La proteína VW 2-1 correspondiente al tercio en el extremo amino terminal de la TPmy, indujo entre un 45 y un 88% de protección (promedio de 60%),

mientras que un péptido sintético acoplado a ovoalbúmina (pep-ova), correspondiente a los primeros 20 aminoácidos en el extremo amino terminal de la TPmy, indujo un 52% de protección en el único ensayo que se probó. Aunque es necesario confirmar este resultado, es alentador ya que sugiere que el extremo amino terminal de la TPmy contiene el o los epítopes suficientes para inducir una inmunidad protectora. La protección obtenida con la paramiosina natural purificada de cisticercos fue superior al 90%; sin embargo, es necesario confirmar este resultado correspondiente a un solo experimento con cinco ratones inmunizados con nTPmy. La producción de la TPmy recombinante, a diferencia de sus fragmentos, tiene un rendimiento muy bajo (~ 10 veces menos que VW 2-1) lo cual dificultó su uso en los ensayos de protección reportados en el presente trabajo de tesis. Ensayos anteriores en condiciones similares indican que la TPmy recombinante induce niveles de protección semejantes a los que se obtienen con el VW2-1 (datos no mostrados).

La disminución de la carga parasitaria inducida por VW2-1 puede certificarse tanto por un decremento en el número de cisticercos como en su volumen (ensayo 1: 87 y 89%; ensayo 2: 47 y 42%; ensayo 3: 52 y 59%) En este caso hay una buena correlación entre ambos parámetros. Curiosamente, los grupos de ratones inmunizados con las demás proteínas de TPmy muestran mayores discrepancias entre los porcentajes de disminución evaluados contando el número ó midiendo el volumen que desplazan las larvas (VW 6-1, ensayo 3: 48 y 35%; VW 5-3, ensayo 3: 58 y 38%), por lo que la protección obtenida parece menor. Algunos grupos de ratones inmunizados con el VW 4-1 y el VW 5-3 alcanzaron una carga parasitaria significativamente mayor a la de los animales controles, lo cual sugiere que en algunos casos estas proteínas facilitaron la infección (VW 4-1, ensayo 1; VW 5-1, ensayo 3). Cabe mencionar que el fragmento VW 5-3 que incluye la secuencia de aminoácidos del VW 2-1,

Tabla V. Resumen de los tres ensayos de protección

Carga parasitaria				
Grupo	Nº ratones	Nº de Cisticercos $\pm$ d.e.	Volumen $\pm$ d.e. ( $\mu$ l)	% de protección*
Alúmina	16	60 $\pm$ 36	132 $\pm$ 118	-
VW 2-1	17	25 $\pm$ 28	51 $\pm$ 68	60 <sup>†</sup>
VW 4-1	17	56 $\pm$ 47	132 $\pm$ 159	-
VW 6-1	11	41 $\pm$ 35	61 $\pm$ 52	44
VW 5-3	11	65 $\pm$ 38	230 $\pm$ 200	-
ZY 2-2	6	64 $\pm$ 37	69 $\pm$ 49	-
nTPmy	5	2 $\pm$ 3	3 $\pm$ 4	98
ova.	6	90 $\pm$ 20	120 $\pm$ 57	-
pep-ova	6	24 $\pm$ 28	73 $\pm$ 96	52

**nTPmy**, paramiosina natural purificada de cisticercos (> 85% pura): los contaminantes son principalmente proteínas musculares.

**pep-ova**, péptido sintético de 20 a.a. en el extremo amino terminal de la TPmy acoplado a ovoalbúmina (ova.)

\* el porcentaje de protección es igual al promedio de la disminución del número y el volumen de las larvas con respecto al grupo control.

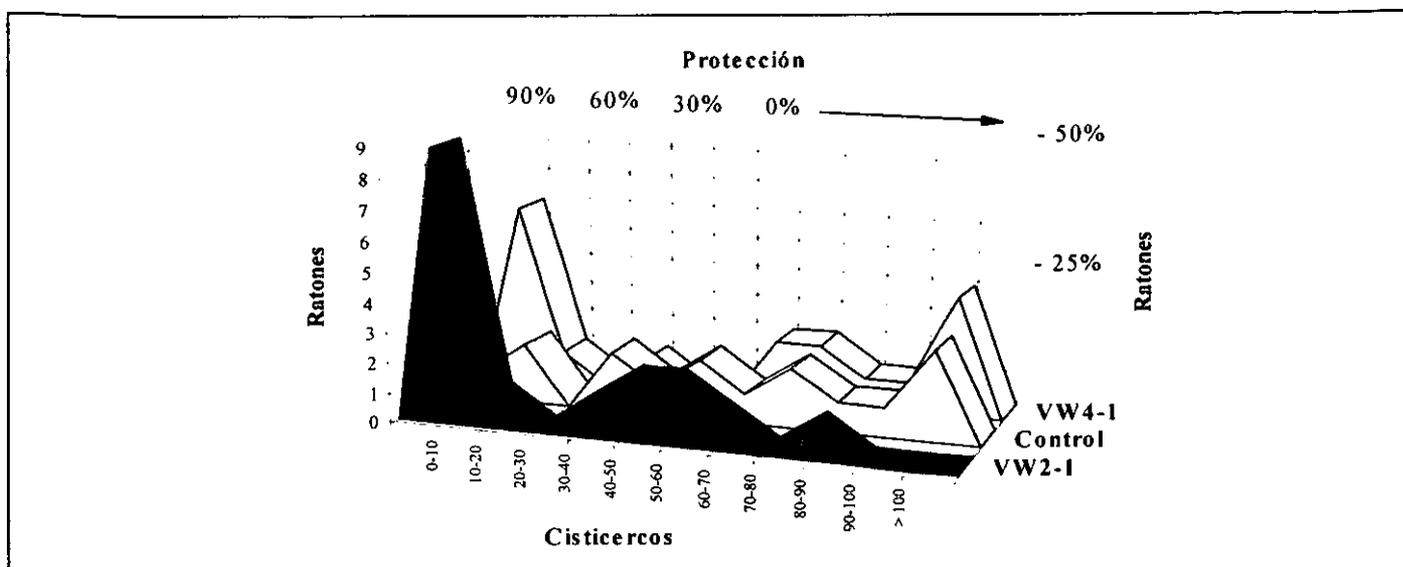
<sup>†</sup> 95% de confiabilidad por pruebas *post-oc*.

indujo en un experimento el 48% de protección mientras que en otro experimento facilitó la infección, lo cual sugiere que el efecto conjunto del tercio amino (VW 2-1) y el central de la TPmy, presentes en el VW 5-3, incrementan la fluctuación entre un tipo de inmunidad protectora y otra facilitadora. Llama la atención la gran similitud en cuanto a la disminución de la carga parasitaria entre los grupos de ratones inmunizados con el VW 2-1 y el pep-ova (VW 2-1: 25 $\pm$ 28 cisticercos; pep-ova: 24 $\pm$ 28 cisticercos) ya que ambos antígenos comparten un fragmento de 20 aminoácidos en el extremo amino terminal y además protegen en forma similar (60 y 52% respectivamente).

En todos los ensayos de protección se observó una gran variabilidad en la carga parasitaria que presentaron los ratones inmunizados con un mismo antígeno. Sin embargo, el análisis estadístico confirma con un 95% de confiabilidad, que los niveles de protección obtenidos en ratones inmunizados con el tercio amino terminal de la TPmy (VW 2-1) son reales. En contraste, la carga parasitaria que presentan los ratones inmunizados con el tercio carboxilo terminal (VW4-1) no

presentan diferencias estadísticamente significativas con relación al grupo control de ratones inyectados con el hidróxido de aluminio solo. El resto de las proteínas de TPmy requieren de un mayor número de pruebas en ensayos de protección, realizados en condiciones equivalentes, antes de afirmar que se trata de un efecto estadísticamente significativo.

Los factores que influyen sobre la fluctuación de la carga parasitaria entre los ratones de un mismo grupo merece un análisis aparte. En el caso de los ratones inmunizados con VW2-1, se observan claramente dos poblaciones de ratones; la mitad presenta una protección superior al 90% (50% de los ratones en los tres experimentos con menos de 10 cisticercos), mientras que la otra mitad de los ratones presenta menos del 25% de protección (Fig 17). Esto indica que al parecer hay dos poblaciones con respuestas distintas. En todos los ensayos de protección se utilizaron ratones singénicos que son 99.5% homogéneos genéticamente así como cisticercos obtenidos de una clona. Además, los ratones en el grupo control (sin inmunizar) presentaron cisticercos (en comparación con un



**Fig 17.** Fluctuaciones entre una inmunidad protectora y otra no protectora adquirida por los ratones inmunizados con las proteínas recombinantes VW2-1 (tercio amino terminal de la TPmy) y VW4-1 (tercio carboxilo terminal de la TPmy). Los rangos de protección se estimaron con relación a la carga parasitaria promedio de los ratones controles inyectados sólo con el adyuvante.

24% de los ratones en el grupo VW2-1 que se encontró sin cisticercos), por lo que la posibilidad de algún error durante el reto de los ratones puede excluirse.

Las fluctuaciones en la carga parasitaria de los ratones inmunizados con el fragmento VW2-1 parecen reales y pueden tener un significado biológico importante, que permite pensar en la posibilidad de modular activamente la respuesta inmune de los ratones hasta dirigirla hacia la alternativa protectora. En los grupos de ratones inmunizados con el VW4-1 también se identificaron dos poblaciones de ratones; la tercera parte presentó una protección superior al 90% (30% de los ratones en los experimentos con menos de 10 cisticercos), mientras que en el resto de los ratones la protección fue nula.

Cabe también mencionar que en un trabajo en colaboración con el grupo de la Dra. A. Flisser, se realizó un primer ensayo de protección en cerdos. Desafortunadamente el número de animales usado en el ensayo dificulta la obtención de alguna conclusión. Se inmunizaron sólo tres cerdos con la

proteína recombinante VW 2-1 y se evaluó la protección en contra de un reto con huevecillos de *T. solium*; dos de los cerdos inmunizados con el VW 2-1 mostraron una disminución de la carga parasitaria del 45 y 65% respectivamente, con relación a la media de los cerdos sin vacunar que fue de  $150 \pm 75$  cisticercos; el tercer animal inmunizado presentó una carga parasitaria superior a la media de los controles. Estos resultados preliminares de protección en cerdos inmunizados con el VW 2-1 son consistentes con los obtenidos en el modelo murino de cisticercosis, ya que en ambos casos hubo animales que presentaron una disminución de la carga parasitaria, y otros en el que la protección fue menor o nula, lo cual sugiere que la respuesta inducida por el VW 2-1 puede fluctuar entre un desenlace protector y otro no protector. Al mismo tiempo, estos resultados indican que las posibilidades de desarrollar una vacuna eficiente contra la cisticercosis dependen en parte importante de un adecuado entendimiento de la respuesta inmune que las proteínas recombinantes inducen en los ratones y cerdos.

b) *Respuesta inmune en contra de las proteínas recombinantes de TPmy.*

Con respecto a la respuesta humoral evaluada en los ensayos de *western blot*, los anticuerpos generados en contra de cada una de las proteínas recombinantes de TPmy también reaccionan con la paramiosina natural, tanto en un extracto crudo de cisticercos como en una fracción de TPmy purificada de cisticercos. Esto indica que la conformación de las proteínas recombinantes es al menos parcialmente equivalente a la de la proteína natural.

La conformación que adquieren las proteínas recombinantes y el péptido sintético es determinante para la conservación de los epítopes relevantes para la inducción de una posible inmunidad protectora. En este sentido, la total ausencia de componentes protectores en la respuesta inducida por el fragmento ZY2-2 es especialmente clara. Este fragmento de 54 aminoácidos en el extremo amino terminal de la TPmy es el resultado de una serie de modificaciones de la secuencia codificadora por métodos de mutagénesis dirigida. El objetivo de las mutaciones fue el de aumentar su afinidad por C1q a través de estabilizar la formación de homodímeros, mejorando la conformación de las  $\alpha$ -hélices de las cadenas individuales. Se introdujeron ocho cambios, substituyendo aquellos residuos que se consideraron inadecuados en la secuencia de unidades repetitivas de 7/28 residuos (Fig 7). La introducción de los cambios resultó en un aumento de tres veces en la afinidad hacia C1q, aunque también resultaron en una pérdida de los epítopes protectores que sabemos están presentes en esa región de la proteína, puesto que el pép-ova, que sólo contiene 20 aminoácidos en el extremo amino terminal si induce protección. Sin embargo, la comparación entre el ZY 2-2 y el péptido sintético no es del todo concluyente ya que no se puede descartar un efecto ayudador de la ovoalbúmina que actúa como proteína acarreadora. Cabe mencionar que ZY 2-2, al igual que las demás proteínas recombinantes de TPmy, se produjo como una proteína de fusión que no indujo protección alguna. Este resultado sugiere que el péptido de fusión presente en las proteínas recombinantes de TPmy

no tiene influencia sobre la inmunogenicidad de las mismas.

Los resultados de las pruebas de ELISA muestran un reconocimiento preferencial del extremo carboxilo terminal a pesar de que en los ratones inmunizados con los tercios amino y carboxilo terminales presentaron niveles similares de inmunoglobulinas totales que en los plazos en que se realizaron los ensayos de protección, se constituyeron primordialmente de IgM e IgG1.

Ensayos de *western-blot* posteriores a la extirpación del parásito en pacientes con cisticercosis ocular, muestran que los anticuerpos circulantes reconocen tres antígenos incluyendo a la TPmy; y ocho meses después de la cirugía sólo se detectan anticuerpos en contra de la TPmy (Correa *et al.*, 1989). Otros estudios sobre la respuesta inmune sistémica de pacientes cisticercosos muestran que los anticuerpos circulantes de mayor frecuencia son de tipo IgG e IgM, (presentes en el 85 y 50% de los sueros analizados respectivamente; Correa *et al.*, 1989), lo cual es consistente con el patrón de inmunoglobulinas de los ratones inmunizados con las proteínas recombinantes de TPmy y/o retados con *T. crassiceps*, reportados en el presente trabajo de tesis.

El reconocimiento preferencial del extremo carboxilo terminal por los anticuerpos de ratones inmunizados con las proteínas recombinantes de TPmy es consistente con la observación de que la respuesta humoral de pacientes cisticercosos y de ratones infectados con *T. crassiceps* es mucho más intensa en contra del extremo carboxilo terminal de la TPmy que en contra del extremo amino terminal (J. Vazquez, comunicación personal). En cambio, pruebas de proliferación linfocitaria, realizadas también en nuestro grupo, sugieren que la protección inducida por el fragmento VW2-1 en contra de la cisticercosis murina pudiera ser mediada principalmente por células, sin descartar una contribución de la respuesta humoral.

La TPmy que está presente en el tegumento del cisticercos (Laclette *et al.*, 1987; 1995), al parecer es liberada hacia la periferia (Laclette *et al.*, 1989), por lo que una respuesta humoral en contra de la TPmy podría ser desviada lejos de la superficie parasitaria. Por otro lado, sabemos que la TPmy se une al C1q e

inhibe la cascada del complemento (Laclette *et al.*, 1992), y se ha postulado que los anticuerpos principalmente dirigidos hacia el extremo carboxilo terminal no bloquearían la actividad inhibitoria del complemento que reside en el extremo opuesto de la molécula. Al respecto, se ha reportado lo que inicialmente se supuso como un receptor de Fc presente en la superficie de cisticercos de *T. crassiceps*, que al ser purificado y secuenciado demostró corresponder con la paramiosina. La supuesta función de receptor de Fc podría deberse a la captura de anticuerpos mediada por complejos TPmy-C1q (Kalinna *et al.*, 1992).

### c) El perfil de la respuesta protectora

Estudios realizados en los últimos 20 años han contribuido a entender que las células del sistema inmunitario se comunican entre ellas a través de factores solubles, conocidos como citocinas, que son producidas por una gran variedad de células, entre ellas los linfocitos T y B. Actualmente, se conocen alrededor de 20 citocinas y en la mayoría de ellas se ha descrito el papel que desempeñan en la regulación de la respuesta inmune (Tabla VI).

Algunos autores proponen que la inducción de una respuesta inmune apropiada en contra de antígenos candidatos a vacuna es decisiva para una vacunación exitosa (Schweitzer *et al.*, 1992; Lin *et al.*, 1995; Lofthouse *et al.*, 1996). El papel central que juegan las citocinas en el establecimiento de una respuesta inmune en contra del parásito, sugiere que aquellas respuestas no protectoras o facilitadoras de la infección podrían ser el resultado de una producción preferencial o limitada de alguno(s) de estos mediadores. Técnicas de DNA recombinante permiten obtener algunas de estas citocinas en cantidades razonables, por lo que hemos considerado utilizarlas como factores coadyuvantes en futuros ensayos de vacunación con las proteínas de TPmy.

Estudios preliminares realizados en nuestro laboratorio indican que el patrón de interleucinas que presentan los ratones inmunizados con VW 2-1 y que además presentan un alto grado de protección (ver figura 17) es consistente con una respuesta de tipo Th1 mientras que en los no protegidos es

consistente con una respuesta de tipo Th2. En el ratón se sabe que la respuesta de tipo Th1 se caracteriza por la producción de IL-2 e IFN- $\gamma$  principalmente, mientras que la Th2 se caracteriza por la producción de IL-4.

En un trabajo publicado recientemente se reporta que en los estadios tempranos de la cisticercosis experimental por *T. crassiceps*, el ratón muestra una respuesta transitoria de tipo Th1 que además se asocia con un bajo nivel de proliferación de los cisticercos (Terrazas *et al.*, 1998). Conforme transcurre la infección se establece una respuesta permanente de tipo Th2 que a su vez se relaciona con un incremento en la proliferación del parásito. La protección parcial que presentan los ratones inmunizados con los fragmentos recombinantes de TPmy permite el desarrollo de algunos cisticercos que podrían favorecer el establecimiento de una inmunidad permisiva para el parásito.

El tratamiento con IL-2 e IFN- $\gamma$  (Th1) de ratones cisticercosos disminuye de forma importante el desarrollo de la carga parasitaria (~60%) con relación a aquellos ratones no tratados (Terrazas *et al.*, 1998). Estos resultados, junto con las evidencias que actualmente tenemos, indican que en el ratón la inmunidad protectora en contra de *T. crassiceps* está relacionada con una respuesta de tipo Th1.

Actualmente estamos por comenzar a estudiar el efecto de la IL-2 y el IFN- $\gamma$  inyectados simultáneamente con las proteínas recombinantes, para ver si la estimulación de una respuesta de tipo Th1 resulta en niveles de protección más elevados que los reportados en el presente trabajo de tesis.

### d) La TPmy como candidato a vacuna en contra de la cisticercosis y otras helmintiasis.

La TPmy es un antígeno inmunodominante en la relación huésped-cisticercos (Flisser *et al.*, 1980; Correa *et al.*, 1989) al igual que otras paramiosinas en sus respectivas asociaciones huésped-parásito. Ensayos *in vitro* de inhibición de la cascada del complemento muestran que la TPmy, inhibe la vía clásica del complemento al bloquear la función del C1, primer componente de la cascada del complemento; la inhibición del C1 probablemente se debe a la unión de TPmy con el C1q (Laclette *et*

**Tabla VI. Citocinas producidas por linfocitos T.**

<b>Interleucinas</b>	<b>Funciones</b>
Interleucina 2 (IL-2)	Regula el crecimiento de las células T.
Interleucina 4 (IL-4)	Coestimulación del crecimiento de células B. Regula el proceso de <i>switching</i> de clase de inmunoglobulinas. Regula el crecimiento de células T. Activación de macrófagos. Regula el crecimiento de células primordiales. Coestimulación de células hematopoyéticas precursoras.
Interleucina 5 (IL-5)	Estimulación del crecimiento de células B y síntesis de inmunoglobulinas. Estimulación del crecimiento y diferenciación de eosinófilos.
Interleucina 6 (IL-6)	Control de la síntesis de inmunoglobulinas. Estimulación del crecimiento de plasmocitomas e hibridomas.
Interferon $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )	Otras múltiples funciones Activación de macrófagos. Regula el proceso de <i>switching</i> de clase de inmunoglobulinas. Otras múltiples funciones.
Linfotoxina (LT)	Inhibición del crecimiento celular.
Interleucina 3 (IL-3)	Diferenciación de algunas líneas celulares. Estimulación de células hematopoyéticas precursoras de múltiples líneas celulares.
Factor estimulante de colonias granulocito-macrófago (GM-CSF)	Factor de crecimiento de células primordiales. Estimulación de células precursoras mieloide.

*al.*, 1992). Todo ello sugiere que la paramiosina de la *T. solium* juega un papel modulador de la respuesta inmune del huésped. Al respecto, un punto sin resolver se refiere al mecanismo por el cual una proteína supuestamente muscular como la TPmy, es secretada hacia la interfase huésped-parásito para bloquear la cascada del complemento como una posible estrategia de evasión inmune (Laclette *et al.*, 1991;1992). Distintos estudios de inmunolocalización en *S. mansoni* y *S. japonicum*, además de los realizados en *T. solium*, han mostrado su presencia en el tegumento (Laclette *et al.*, 1987; 1995).

Experimentos *in vitro* con cisticercos de *T. solium* y de *T. taeniaeformis* muestran que la vía alterna del complemento es capaz de dañar por sí sola al cisticerco (Conder *et al.*, 1983; Correa *et al.*, 1989), lo cual sugiere que la inmunidad protectora obtenida con la proteína VW 2-1, que contiene el sitio de unión al C1q, podría contrarrestar la inhibición del complemento mediada por la TPmy.

Algunos grupos han propuesto a las paramiosinas como antígenos candidatos a vacuna en contra de la esquistosomiasis por *S. mansoni* y *S.*

*japonicum* y varias filarías (Lanar *et al.*, 1986; Pearce *et al.*, 1986; Pearce *et al.*, 1988; Flanigan *et al.*, 1989; Kantha *et al.*, 1990; Richter, *et al.*, 1993; Nanduri *et al.*, 1989; Li *et al.*, 1991; Li *et al.*, 1993; Ramírez *et al.*, 1996). Por ejemplo, algunos reportes han podido mostrar que anticuerpos monoclonales IgE anti-paramiosina de *S. japonicum* inducen protección en contra de la esquistosomiasis murina, además de que reaccionan por *western-blot* con otras bandas supuestamente diferentes a paramiosina (Somei *et al.*, 1987). Sin embargo al analizar los patrones de bandeo de estos investigadores, queda claro que se trata de dímeros de paramiosina o de productos de degradación. En un reporte mucho más reciente los autores caracterizan un epítipo protector de esa paramiosina entre los aminoácidos Glu 301 y Ala 413; epítipo común a las paramiosinas de *S. mansoni* y de *T. solium* (Nara *et al.*, 1997). La candidatura de la paramiosina de *S. japonicum* para el desarrollo de una vacuna se ha robustecido con resultados recientes en los que se han reportado protecciones entre 66-82 % en el modelo murino de esquistosomiasis. (Ramírez *et al.*, 1996).

## VII. AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Alejandro Alagón por su ayuda en el acoplamiento de un péptido sintético de paramiosina a ovoalbúmina (pep-ova).

Agradezco al Dr. Pascal Herion y al Dr. Rafael Saavedra por facilitarnos un lote de ratones utilizado en los ensayos de protección

Agradezco a la Dra. Bertha Espinoza y al Dr. Julio Cesar Carrero por facilitarnos algunos de los antisueros utilizados para esta tesis.

Agradezco a la M. en C. Tzipe Govezensky por llevar a cabo el análisis estadístico de los datos de protección reportados en esta tesis.

También agradezco al jurado examinador que revisó este manuscrito y que esta integrado por las siguientes personas:

Dr. René Pascal Heri6n Scohy

Dra. Edda Lydia Sciutto Conde

Dr. Juan Pedro Laclette San Román

Dr. Vianney Francisco Ortiz Navarrete

Dr. Ricardo Rosales Ledezma

## VIII. BIBLIOGRAFIA

- Acevedo-Hernandez A. Economic impact of porcine cysticercosis. *Cysticercosis: Present State of Knowledge and Perspectives*. Academic Press, Inc. 1982; p 63.
- Agapejev S. Epidemiology of cysticercosis in Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*. 1996; 38 (3): 207-216.
- Algón A.C., Te Piao King. Activation of polysaccharides with 2-iminothiolane and its uses. American Chemical Society. 1980; 19 (18): 4342-4345.
- Aliaga F., Contreras M.C., Mercado Y., Slegmeier H., Ibacache J., Vargas R., Nova J., Nanco J., Neira J., Paredes E. Seroepidemiological investigation of various tissue helminthiasis by means of indirect hemagglutination test in lonquimay county, Chile. *Biol. Chil. Parasitol.* 1994; 49 (1-2): 43-45.
- Ayuya J.M., Williams J.F. The immunological response of the rat to infection with *Taenia taeniaeformis*. VII. Immunization by oral and parental administration of antigens. *Immunology*. 1979; 36: 825-834.
- Baily G.C., Masson P.R. Serological diagnosis of neurocysticercosis: evaluation of ELISA test using cyst fluid and other components of *Taenia solium* cysticerci as antigens. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1988; 82: 295.
- Ciesielski S., Seed J.R., Estrada J., Wrenn E. The seroprevalence of cysticercosis, malaria, and trypanosoma cruzi among North Carolina migrant farmworkers. *Public Health Rep.* 1993; 108 (6): 736-741.
- Cohen C, Parry D. Alfa-helical coiled coils and bundles: how to design an alfa-helical protein. *Proteins: Structure, Function and Genetics*. 1990; 7: 1-15.
- Conder G.A., Marchiondo A.A., Williams J.F., Andersen F.L. Ultrastructural characterization of serum induced changes in the tegument of *taenia taeniaeformis*. *J. Parasitol.* 1983; 69: 838.
- Correa D., Tovar A., Ezpinoza B., Plancarte A., Flisser A. Cisticercosis humana: relación inmunológica huésped-parásito. *Cisticercosis humana y porcina*. Editorial Limusa. 1989. p31.
- Cox F.E.G. *Modern Parasitology*, Blackwell Scientific Publications, Oxford. 1982.
- Davis B.J., Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1964; 121: 404-427.
- Eckert J. Workshop summary: food safety: meat- and fish-borne zoonoses. *Vet. Parasitol.* 1996; 64 (1-2): 143-147.
- Escalante L., Rowland E.C., Powell M.R. Prevalence of anti-*Taenia solium* antibodies in sera from outpatients in an Andean region of Ecuador. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 1995; 90 (6): 715-719.
- Espinoza B., Ruiz-Palacios G., Tovar A., Sandoval M.A., Plancarte A., Flisser A. Characterization by enzyme-linked immunosorbent assay of the humoral immune response in patients with neurocysticercosis and its implication in immunodiagnosis. *J. Clin. Microbiol.* 1986; 24: 536.
- Flanigan T.P., King C.H., Lett R.R., Nanduri J., Mahmoud A.A.F., Induction of resistance to *Schistosoma mansoni* in mice by purified parasite paramyosin, *J.Clin.Invest.* 1989; 83: 1010-1014.
- Flisser A. Neurocysticercosis in Mexico. *Parasitol. Today*. 1988; 4: 131.
- Flisser A., Woodhouse E., Larralde C. Human cysticercosis: antigens, antibodies and non-responders. *Clin. Exp. Immunol.* 1980; 39 (1): 27-37.
- Garcia H.H., Martinez M., Gilman R., Herrera G., Tsang V.C.W., Pilcher J.B., Díaz F., Verastegui M., Gallo C., Porras M., Alvarado M., Naranjo J., Miranda E., and the cysticercosis working group in Peru. Diagnosis of cysticercosis in endemic regions. *Lancet*. 1991; 338: 549-552.
- Garcia-Noval J., Allan J.C., Fletes C., Moreno E., DeMata F., Torres-Alvarez R., Soto de Alfaro

- H., Yurrita P., Higueros-Morales H., Mencos F., Craig P.S. Epidemiology of *Taenia solium* taeniasis and cysticercosis in two rural communities. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1996; 55 (3): 282-289.
- Glenny A.T., Pope C.G., Waddigton H., and Wallace U. Immunological notes. *J. Pathol.* 1926; 29: 31-40.
- Grill J., Rakolomalala W., Andrianismahavandy A., Boiser P., Guyon P., Roux J., Esterre P. High prevalence of serological markers of cysticercosis among epileptic malagasy children. *Ann. Trop. Paediatr.* 1996; 16 (3): 185-191.
- Guerra G., Flisser A., Cañedo L., Laclette J.P., Biochemical and immunological characterization of antigen B purified from cysticerci of *Taenia solium*, En: *Cysticercosis: Present State of Knowledge and Perspectives.* 1982 Academic Press, Inc. p 437-451.
- Harlow E., Lane D. Collecting sera from a mouse by tail bleed. *Antibodies: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory 1988; p 172.
- Harlow E., Lane D. Aluminum hydroxide as adjuvant. *Antibodies: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory 1988; p 99
- Harnett, W., The anthelmintic action of Paraziquantel. *Parasitol. Today*, 1988; 4: 144.
- Herrera L.A., Santiago P., Rojas G., Salazar P.M., Tato P., Molinari J.L., Schiffmann D., Ostrosky-Wegman P. Immune response impairment, genotoxicity and morphological transformation induced by *Taenia solium* metacestode. *Mutation Res.* 1994; 305: 223-228.
- Hinz E. Contribution to the standardization of experimental cysticercosis of the mouse as a model experiment for testing of agents affective against cysticercosis. 1965; 16 (3): 322-331.
- Ito A., Bogh H.O., Lightowlers M., Mitchell G., Takami T., Kamiya M., Onitake K., and Rickard M.D. Vaccination against *Taenia taeniaeformis* in rats using a recombinant protein and preliminary analysis of induced antibody response. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1991; 44: 43-52.
- Johnson K.S., Harrison G.B.L., Lightowlers M.W., O'Hoy K.L, Cogle W.G., Dempster R.P., Lawrence S.B., Vinton J.G., Heath D.D., Rickard D. Vaccination against ovine cysticercosis using a defined recombinant antigen. *Nature.* 1989; 338: 585-587.
- Kalinna B., McManus D.P. An IgG (Fc)-binding protein of *Taenia crassiceps* (Cestoda) exhibits sequence homology and antigenic similarity with *Schistosoma* paramyosin. *Parasitol.* 1993; 106: 289-296.
- Kamiya M., Sato H., Kitaoka M., Oku Y., Ito M., Gathura P. Laboratory rodent models for the tapeworm-stage of *Taenia saginata* and other related taeniid species. *Southeast Asian J. Trop. Med Public Health.* 1991; 22: 262-267.
- Kantha S.S. Paramyosin as helminth vaccine candidate. *Lancet.* 1990; 336: p 320.
- Köhler G., Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibodies of predefined specificities. *Nature.* 1975; 256: 495.
- Kong W., Cho S.Y., Cho M.S., Kwon O.S., Kang W.S., Seroepidemiological observation of *Taenia solium* cysticercosis in epileptic patients in Korea. *J. Korean Med. Sci.* 1993; 8 (2): 145-152.
- Laclette J.P., Landa A., Arcos L., Willms K., Davis A., Shoemaker C.B. Paramyosin is the *Schistosoma mansoni* (trematoda) homologue of antigen B from *Taenia solium* (Cestoda). *Mol. Biochem. Parasitol.* 1991; 44: 287-296.
- Laclette J.P., Merchant M.T., Willms K. Histological and ultrastructural localization of antigen B in the metacestode of *Taenia solium*. *J. Parasitol.* 1987; 73:121-129.
- Laclette J.P., Sanchez M., Landa A., Arcos L., de Alba P., Mancilla R., y Willms K., The coexistence of *Taenia solium* cysticerci and the pig: role of antigen B. *Acta Leidensia.* 1989; 57 (2): 115-122.
- Laclette J.P., Shoemaker C.B., Richter D., Arcos L., Pante N., Cohen C., Bing D., Nicholson-Weller A. Paramyosin inhibits complement C1. *J. Immunol.* 1992; 148:124-128.
- Laclette J.P., Skelly P.J., Merchant M.T., Shoemaker C.B. Aldehyde fixation dramatically alters the immunolocalization pattern of

- parmyosin in platyhelminth parasites. *Exp. Parasitol.* 1995; 81-140.
- Laemmli U.K. Most commonly used discontinuous *buffer* system for SDS electrophoresis. *Nature* 1970; 227: 680.
- Lanar D.E., Pearce E.J., James S.L., Sher A. Identification of paramyosin as a schistosome antigen recognized by intradermally vaccinated mice. *Science*. 1986; 234: 593-596.
- Landa A, Lacleste J.P., Nicholson-Weller A., Shoemaker C.B. cDNA cloning a expression of collagen-binding and complement inhibitory activity of *Taenia solium* paramyosin (AgB). *Mol. Biochem. Parasitol.* 1993; 60:343-348.
- Larralde C., Lacleste J.P., Owen C.S. Reliable serology of *Taenia solium* cysticercosis with antigen from cyst vesicular fluid: ELISA and hemglutination test. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 1986; 35: 965.
- Larralde C., Montoya R.M., Sciutto E., Díaz M.L., Govezensky T., Coltorti E. Deciphering Western Blots of tapeworm antigen (*Taenia solium*, *Echinococcus granulosus* and *Taenia crassiceps*) reacting with sera from neurocysticercosis and hydatid disease patients. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 1989; 40 (3): 282-290.
- Larralde C., Padilla A., Hernandez M., Govezensky T., Sciutto E., Gutierrez G., Tapia-Conyer R., Salvatierra B., Sepulveda J. Seroepidemiología de la cisticercosis en México. *Salud Pública de México*, marzo-abril de 1992, vol. 34 (2): 197-210.
- Li B.W. Identification of paramyosin as a potencial protective antigen against *Brugia malayi* infection in jirds. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1991; 49: 315-323.
- Li B.W. Vaccination with recombinant filarial paramyosin induces partial immunity to *Brugia malayi* infection in jirds. *J. Immunol.* 1993; 150: 1881-1885.
- Lighthowers M.W. Vaccination against cestode parasites. *Immunol. Cell. Biol.* 1993; 71: 443-451.
- Lin R., Tarr P.E., Jones T.C. Present satus of the use of cytokines as adyuvantes with vaccines to protect against infectious diseases. *Clin. Infect. Dis.* 1995; 21 (6): 1439-1449.
- Lofthouse S.A., Andrews A.E., Elhay M.J., Bowles B.M., Meeusen E.N., Nash A.D. Cytokines as adjuvants for ruminant vaccines. *Int. J. Parasitol.* 1996; 26 (8-9): 835-842.
- Manoutcharian K., Rosas G., Hernandez M., Fragoso G., Aluja A., Villalobos N., Rodarte L.F., and Sciutto E. Cysticercosis: Identification and cloning of protective recombinant antigens. *J. Parasitol* 1996; 82 (2): 250-254.
- Monroy-Ostria A., Monroy-Ostria T.J., Gomez G.J., Hernandez M.O. Some studies on the experimental infection of golden hamsters with *Taenia solium*. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 1993; 35 (1): 91-98.
- Moore A.C., Lutwick L.I., Schantz P.M., Pilcher J.B., Wilson M., Hightower A.W., Chapnick E.K., Abter E.I., Grossman J.R., Fried J.A. Seroprevalence of cysticercosis in an orthodox jewish community. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1995; 53 (5): 439-442.
- Nanduri J. Kazura J.W. Paramyosin enhanced clearance of *Brugia malayi* microfilaremia in mice. *J. Immunol.* 1989; 143: p 3359.
- Nara T., Matsumoto N., Janecharut T., Matsuda H., Yamamoto K., Irimura T., Kamamura K., Aikawa M., Oswald I., Sher A. Demonstration of the target molecule of a protective IgE antibody in secretory glands of *Schistosoma japonicum* larvae. *Int Immunol.* 1994; 6: 963-971.
- Nara T., Tanabe K., Mahakunkijcharoe Y., Osada Y., Matsumoto N., Kita K., Kojima S. The B cell epitope of paramyosin recognized by a protective monoclonal IgE antibody to *Schistosoma japonicum*. *Vaccine.* 1997; 15 (1): 78-84.
- Pearce E., James S., Hieny S., Lanar D., Sher A. Induction of protective immunity against *Schistosoma mansoni* by vaccinaton with schistosome paramyosin (Sm 97), a nonsurface parasite antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1988; 85: 5678-5682.
- Pearce E.J., James S.L., Dalton J., Barrall A., Ramos C., Strand M., Sher A. Immunochemiacal characterization and purification of Sm-97, a

- Schistosoma mansoni* antigen monoespecifically recognized by antibodies from mice protectively immunized with a non-living vaccine. *J. Immunol.* 1986; 137: 3593-3600.
- Ramirez B.L., Kuris J.D., Wiest P.M., Arias P., Aligui F., Peters P., Olds G.R. Paramyosin: a candidate vaccine antigen against *Schistosoma japonicum*. *Parasite Immunology.* 1996; 18: 49-52.
- Ramos-Kuri M., Montoya R.M., Padilla A., Govezensky T., Díaz M.L., Sciutto E., Sotelo J., Larralde C. Immunodiagnosis of neurocysticercosis. *Archives of Neurology.* 1992; 49: 633-636.
- Reid K. Proteins involved in the activation and control of the two pathways of the complement system. *Biochemical Society Transaction.* 1983; 11: 1-12.
- Rhea J.C. Levine, Myra J. Elfvin, and Vitaly Sawyna. Preparation and Assay of Paramyosin. *Methods in Enzymology.* 1982; vol 85: 149-160.
- Rickard M.D. Cestodes vaccines. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.* 1991; 22: 287-290.
- Rickard M.D., Bell K.J. Immunity produced against *Taenia ovis* and *T.taeniaeformis* infection in lambs and rats followig in vivo growth of their larvae in filtration menmbrane diffusion chambers. *J.Parasitol.* 1971; 57 (3): 571-575.
- Richter D., Reynolds S.R., Harn D.A. Candidate vaccine antigens that stimulate the cellular immune response of mice vaccinated with irradiated cercariae of *Schistosoma mansoni*. *J. Immunol.* 1993; 151: 256-265.
- Sarti E., Flisser A., Schantz P.M., Gleizer M., Loya M., Plancarte A., Avila G., Allan J., Graig P., Bronfman M., Wijeyaratne P. Development and evaluation of health education intervention against *Taenia solium* in rural community in Mexico. *Am. J. Trop. Hyg.* 1997; 52 (2): 127-132.
- Sciutto E, Fragoso G, Díaz ML, Valdez F, Montoya RM, Govezensky T, Lomeli C, Larralde C. Murine *Taenia crassiceps* cysticercosis; H-2 complex and sex influence on susceptibility. *Parasitol Res.* 1991; 77: 243-6. vol.85:149-160.
- Sciutto E., Aluja A., Fragoso G., Rodarte L.F., Hernandez M., Villalobos N., Padilla A., Keilbach N., Baca M., Govezensky T., Diaz S., and Larralde C. Immunization of pigs against *Taenia solium* cysticercosis: Factors related to effective protection. *Veterinary Parasitology.* 1995; 60: 57-67.
- Sciutto E., Fragoso G., Trueba L., Lemus D., Montoya R.M., Díaz M.L., Govezensky T., Lomeli C., Tapia G., Larralde C. Cysticercosis vaccine: cross protecting immunity with *Taenia solium* antigens against experimental murine *Taenia crassiceps* cysticercosis. *Parasite Immunology.* 1990; 12: 687-696.
- Schenone H, Villarroel F, Rojas A, Ramirez R. Epidemiology of human cysticercosis in Latin America. *Cysticercosis: Present Sate of Knowledge and Perspectives.* Academic Press, Inc. 1982; p 25-38.
- Schweitzer A.N., Anderson R.M. The regulation of immunological responses to parasitic infections and the development of tolerance. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 1992; 247 (1329):107-112.
- Sher A., Pearce E., Hieny S., y James S., Induction of protective immunity against *Schistosoma mansoni* by a nonliving vaccine, IV. Fractionation and antigenic properties of a soluble adult worm immunoprophylactic activity. *J. Immunol.* 1986; 136: 3878-3883.
- Siebert A.E., Good A.H. *Taenia crassiceps*: Immunity to metacestodes in BALB/c and BDF1 mice. *Experimental Parasitology.* 1980; 50: 437-446.
- Somei Kojima, Munetoshi Niimura, Tamotsu Kanazawa. Production and properties of a mouse IgE antibody to *Schistosoma japonicum*. *J. Immunol.* 1987; 139: 2044-2049.
- Terrazas L.I., Bojalil R., Govezensky T., Larralde C. Shift from an early protective Th1-type immune response to a late permissive Th2-type response in murine cysticercosis (*Taenia solium*). *J. Parasitol.* 1998; 84 (1): 74-81.
- Towbin H., et al. Electrophoretic transfer of proteins from SDS and acid/urea gels to nitrocellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1979; 76: 4350-4354.
- Tron F. Future vaccines. *Rev. Prat.* 1995; 45 (12): 1514-1519.

- Tsang V.C.W., Wilson M. *Taenia solium* cysticercosis: An under-recognized but serious public health problem. *Parasitology Today*. 1995; 11 (3): 124-126.
- Verster A. The golden hamster as a definitive host of *Taenia solium* and *Taenia saginata*. *Onderstepoort. J. Vet. Res.* 1974; 41 (1): 23-28.
- Watson J.M., *Medical helminthology*, Bailliere Tindal and Cox, London. 1960.
- White A.C. Jr., Tato P., Molinari J.L. Host-parasite interactions in *Taenia solium* cysticercosis. *Infect. Agents Dis.* 1992; 1 (4): 185-193.
- White A.C. Jr., Robinson P., Khun R. *Taenia solium*: host-parasite interactions and the immune response. *Chem. Immunol.* 1997; 66: 209-230.
- Willms K., Merchant M.T. The inflammatory reaction surrounding *Taenia solium* larvae in pig muscle: ultrastructural and light microscopic observation. *Parasite Immunology*. 1980; 2: 261-268.
- Wong P.T., Zahab D.M., Narang S.A., y Sung W.L., High-pressure infrared spectroscopic study of human proinsulin gene expression in live *Escherichia coli* cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1987; 146: 232-238.
- Woodhouse E., Flisser A., Larralde C. Seroepidemiology in human cysticercosis in Mexico. *Cysticercosis: Present Sate of Knowledge and Perspectives*. Academic Press, Inc. 1982; p 11-23.
- Yang W., Waine G.J., McManus D.P. Antibodies to *Schistosoma japonicum* (asian bloodfluke) paramyosin induced by nucleic acid vaccination. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1995; 212: 1029-1039.
- Yang W., Waine G.J., Sculley D.G., Liu X., McManus D.P. Cloning and partial nucleotide sequence of *Schistosoma japonicum* paramyosin: a potential vaccine candidate against Schistosomiasis. *Inter. J. Parasitol.* 1992; 22: 1187-1191.