

03081
5



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**Caracterización de la respuesta inmune hacia
paramiosina en la cisticercosis humana y murina.**

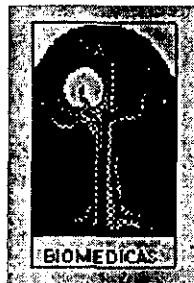
Tesis

**Que para obtener el grado de
Doctor en Investigación Biomédica Básica**

Presenta:

M. en I.B.B. José Vázquez Talavera.

Tutor: Dr. Juan Pedro Laclette San Román.



Instituto de Investigaciones Biomédicas

México, D.F.

octubre 2001.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Por:
Diana Cristina, Don Raúl y Dora María

AGRADECIMIENTOS:

Al Dr. Juan Pedro Laclette por mi formación, que fue mucho más allá de lo académico y por haberme apoyado a lo largo de mis tesis de Licenciatura, Maestría y Doctorado.

Al Dr. Rafael Saavedra por el asesoramiento académica a lo largo de mi proyecto.

A los Drs. Ana Flisser, Abraham Landa, Carlos Larralde, Dolores Correa, Edmundo Lamoyi, Juan Pedro Laclette y Patricia Tato, por sus recomendaciones sobre el manuscrito de tesis que mejoraron considerablemente su presentación.

A, en estricto orden alfabético, a Carlos Castellanos, Gerardo Arrelín, Patricia De la Torre, Pavel Petrosyan y Tzipe Govezensky, por la ayuda técnica.

A, mis compañeros de laboratorio, nuevamente en estricto orden alfabético, Ana Contreras, Carlos Solís, Celia Caballero, Dayana Rodríguez, Fela Mendlovic, Haydeé Lugo, Laura Vargas, Julio César Carrero, Martín García, Patricia de la Torre, Pedro Ostoa y Rimma Zurabian.

También a, en estricto orden alfabético, Amada Villalpando, Eva Reyes, Isabel Reyes, Juan Rivera, Moisés Paniagua, Prima Salazar y Violeta Aguilar, por la ayuda administrativa.

A José María Pascual y Jorge Limón-Lason y a los miembros del equipo de cómputo, que últimamente se han enfrentado al Nimda y al Sircam.

Finalmente, a mi familia, que siempre me ha apoyado.

ÍNDICE.

I. RESUMEN.....	1
II. ABSTRACT.....	2
III. PRÓLOGO.....	3
IV. INTRODUCCIÓN.....	5
Ciclo de vida.....	5
Importancia de la cisticercosis.....	9
Inmunología de la cisticercosis humana y porcina.....	11
Vacunación contra la cisticercosis.....	13
Mecanismo inmunológico humoral de protección.....	15
Mecanismo inmunológico celular de protección.....	16
Inmunología de la cisticercosis murina.....	17
Inmunidad contra el cisticerco de <i>Taenia crassiceps</i>	18
La paramiosina de la <i>Taenia solium</i>	19
La paramiosina como antígeno protector.....	26
V. OBJETIVO DEL PROYECTO.....	27
VI. HIPÓTESIS.....	28
VII. RESULTADOS.....	29
VIII. DISCUSIÓN GENERAL.....	32
IX. CONCLUSIÓN.....	38
X. BIBLIOGRAFÍA.....	39
APÉNDICE 1.	
Human T- and B-cell epitope mapping of <i>Taenia solium</i> Paramyosin. José Vázquez-Talavera, Carlos F. Solís, Edith Medina-Escutia, Zoila Morales-López, Jefferson Proaño, Dolores Correa, and Juan P. Laclette. Aceptado en <i>Parasite Immunology</i>	50
APÉNDICE 2.	
Characterization and Protective Potential of the Immune Response to <i>Taenia solium</i> Paramyosin in a Murine Model of Cysticercosis. 2001. José Vázquez-Talavera, Carlos F. Solís, Luis I. Terrazas, and Juan P. Laclette. <i>Infection and Immunity</i> . 69:5412-5416.....	57

APÉNDICE 3.

Cellular immune response and Th1/Th2 cytokines in human neurocysticercosis: lack of immune supresión. 2001. Edith Medina-Escutia, Zoila Morales-López, Jefferson V. Proaño, José Vázquez, Víctor Bermúdez, Vianney Ortiz-Navarrete, Vicente Madrid-Marina, Juan P. Laclette y Dolores Correa. *Journal of Parasitology*. 87:587-590.....**63**

I. RESUMEN

La paramiosina de la *Taenia solium* (TPmy) es un antígeno inmunodominante en la cisticercosis humana y porcina; además, las paramiosinas son candidatos a vacuna en contra de la esquistosomosis y la filariasis. Hay pocos estudios para identificar las regiones de importancia inmunológica de la paramiosina. En este estudio se encontraron diferencias en el reconocimiento de tres regiones de la molécula, a pesar de que la TPmy es una molécula fibrosa particularmente homogénea. Las células mononucleares de sangre periférica de individuos sanos de un área endémica para cisticercosis proliferaron con mayor proporción al ser estimuladas con el extremo amino y la porción central de la TPmy. En contraste, las células de individuos con neurocisticercosis proliferaron con la misma proporción contra cualquier región. En otros experimentos se empleó a la TPmy para inducir protección en el modelo murino. Los resultados indican que el extremo amino-terminal induce alrededor del 60% de protección contra la infección por el cisticerco de *Taenia crassiceps*. Esta protección se puede relacionar con una respuesta inmune tipo Th1 y la proliferación de linfocitos T. Finalmente, al localizar los epitopos de los linfocitos B los resultados mostraron que los anticuerpos de humanos infectados naturalmente y los de ratones inmunizados con la TPmy reconocieron, principalmente, el extremo carboxilo-terminal.



II. ABSTRACT

Taenia solium paramyosin (TPmy) is an immunodominant antigen in human and porcine cysticercosis, paramyosins shown promise as a vaccine candidate against schistosomiasis and some filariasis. There are few studies directed to identify the immunologically relevant regions of paramyosin. In this work, remarkable differences in the recognition of distinct regions of the molecule were found, in spite of that TPmy is a particularly homogenous fibrous molecule. Mononuclear cells of healthy individuals from an endemic area for cysticercosis were more responsive towards the amino terminal end and the central region of TPmy. In contrast, the responsiveness of cells from neurocysticercotic patients showed no preference to any region of TPmy. A second line of experiments involved protection studies using TPmy as vaccine in the murine model. Results showed that the amino end induced about 60% protection against a challenge with *Taenia crassiceps* cisticerci. Protection seems to be related to a Th1-like immune response and to specific T cell proliferation. Finally, characterization studies of B cell epitopes indicated that antibodies in the sera of patients and TPmy-immunized mice recognize predominantly epitopes located in the carboxyl-terminal fragment.



III. PRÓLOGO

La cisticercosis es un problema de salud pública que afecta la economía en algunos países de Latinoamérica, Asia y África. Esta enfermedad es causada por el establecimiento del cisticerco de *Taenia solium* en los tejidos del hombre y del cerdo. Actualmente, no se cuenta con alguna vacuna establecida que prevenga la enfermedad en humanos o cerdos. Se ha propuesto a las paramiosinas (proteínas del músculo de invertebrados) como antígenos candidatos para el desarrollo de una vacuna en contra de la esquistosomosis y la filariasis, que son también parasitosis provocadas por helmintos. En nuestro laboratorio se ha clonado y expresado el gen de la paramiosina de la *T. solium* (TPmy), así como de diferentes fragmentos de éste. En el modelo murino de cisticercosis hemos demostrado que la vacunación con fragmentos de la TPmy puede inducir niveles de protección que alcanzan un 70%, en promedio. En el presente proyecto, pretendemos comprender cuál es el tipo de respuesta inmune generada contra la TPmy, para establecer estrategias en un eventual empleo de la TPmy contra la cisticercosis porcina.

En la primera publicación (Apéndice 1) que incluye la presente tesis “Human T- and B-cell epitope mapping of *Taenia solium* Paramyosin” por los autores José Vázquez-Talavera, Carlos F. Solís, Edith Medina-Escutia, Zoila Morales-López, Jefferson Proaño, Dolores Correa, and Juan P. Laclette, se describe que los anticuerpos de los pacientes con neurocisticercosis reaccionan principalmente con la región carboxilo-terminal y reaccionan escasamente con la región amino-terminal. En contraste, la respuesta inmune celular no mostró preferencia por alguna región de la TPmy, si bien los individuos sanos respondedores lo hicieron preferentemente contra la región amino-terminal.

En la segunda publicación (Apéndice 2) “Characterization and Protective Potential of the Immune Response to *Taenia solium* Paramyosin in a Murine Model of Cysticercosis.” Por los autores José Vázquez-Talavera, Carlos F. Solís, Luis I. Terrazas, and Juan P. Laclette, se concluye que la inmunización con TPmy recombinante induce protección parcial contra un reto subsecuente con el cisticerco de *T. crassiceps* y que esta capacidad protectora reside básicamente en el tercio amino-terminal. Además, que la respuesta inmune contra este tercio tiene un fenotipo Th1.

Y en la tercera publicación (Apéndice 3) “Cellular immune response and Th1/Th2 cytokines in human neurocysticercosis: lack of immune supresión” por los autores Edith Medina-Escutia, Zoila Morales-López, Jefferson V. Proaño, José Vázquez, Victor Bermúdez, Vianney Ortiz-Navarrete, Vicente Madrid-Marina, Juan P. Laclette and Dolores Correa. Se describe que los pacientes con neurocisticercosis no muestran las evidencias de inmunosupresión que se observan en los modelos animales.

IV. INTRODUCCIÓN

1. Ciclo de vida

El ciclo de vida de *T. solium* se puede dividir en dos etapas; la primera ocurre en el hospedero intermediario y la segunda en el definitivo (Figura 1). El ser humano es el único hospedero definitivo del gusano adulto y es el responsable de la infección de los hospederos intermediarios humano y porcino.

Desarrollo en el hospedero intermediario. La primera etapa se inicia con la ingestión de los huevos de *T. solium* (Figura 2) por el hospedero intermediario. Las enzimas proteolíticas del estómago e intestino destruyen al embrióforo (una de las envolturas protectoras que protegen al embrión para sobrevivir en el medio ambiente) liberando al embrión (44, 102). Se cree que el embrión hexacanto activado (también conocido como

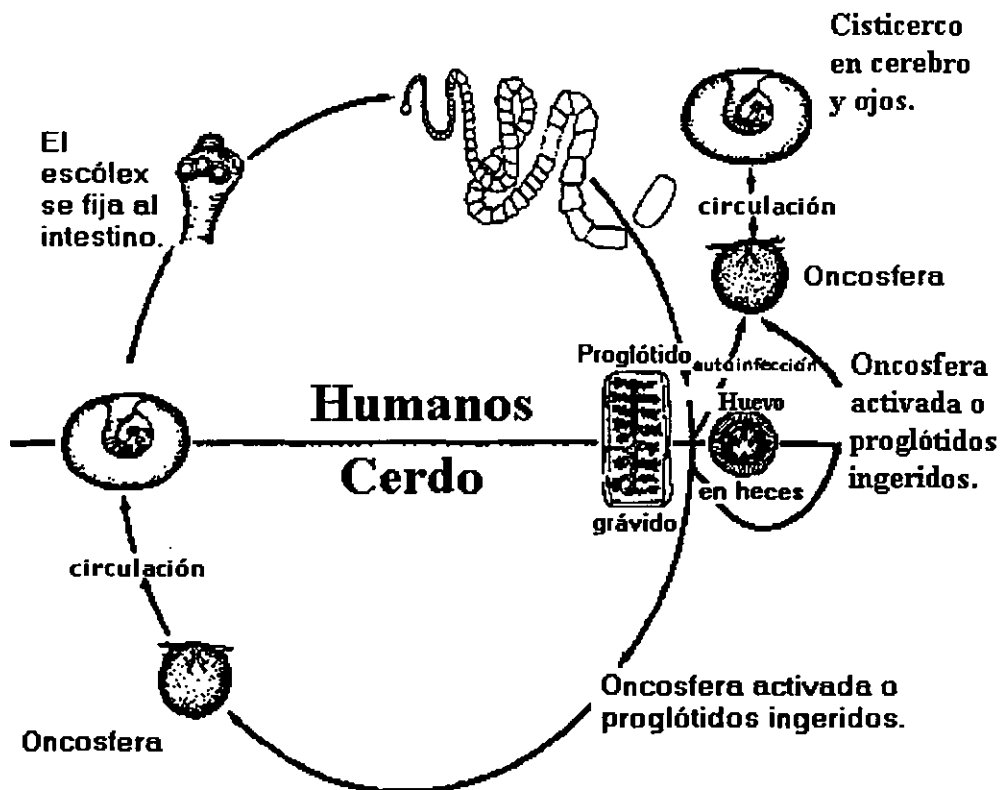


Figura 1. Ciclo de vida de la *Taenia solium*. (Tomado con modificaciones de: <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Taeniasis.htm>.)

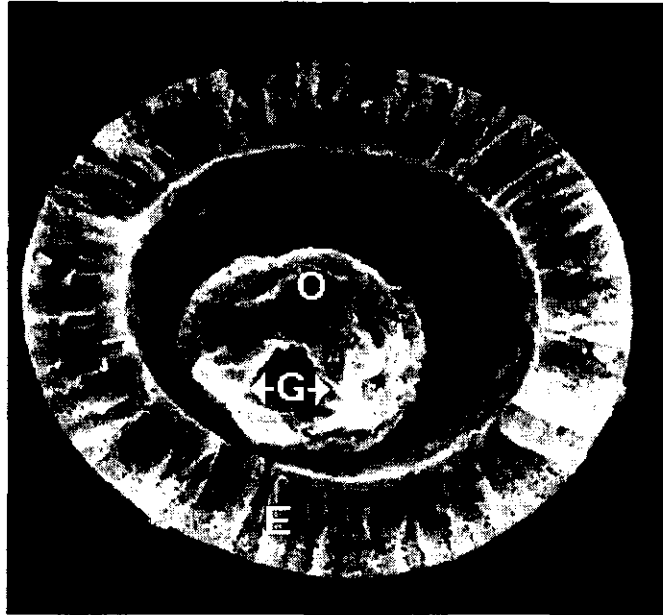


Figura 2. Micrografía electrónica de barrido de un huevo de *Taenia solium*. E: embrioforo, G: ganchos oncosferales, O: oncosfera (Tomada de 44).

oncosfera) atraviesa la mucosa intestinal por la acción combinada de sus ganchos (31) que desgarran el tejido y de secreciones líticas que digieren la mucosa. Posteriormente, el embrión alcanza los capilares sanguíneos y linfáticos que lo llevan a diferentes órganos, en donde se desarrolla hasta convertirse en un cisticerco.

El cisticerco (Figura 3) es una vesícula translúcida, ovoide o circular de 5 a 10 mm de diámetro con un pequeño gusano o escólex metido hacia dentro (invaginado), que puede permanecer en los tejidos del hospedero intermediario durante varios años (19, 20), rodeado por una cápsula de tejido conectivo. La vesícula está llena de un fluido transparente que contiene proteínas del parásito y del huésped (6). Cabe hacer notar que el tegumento y la pared vesicular (Figura 4) son el sitio de contacto del parásito con el hospedero y desempeña un papel central en el mantenimiento de la relación hospedero-parásito.

Desarrollo del cisticerco en el hospedero definitivo: El ciclo de vida continúa cuando el ser humano consume carne de cerdo infectada e ingiere uno o varios cisticercos viables. La masticación, las sales biliares y las proteasas digestivas destruyen la pared vesicular e inducen la salida o evaginación del escólex (9). Una vez evaginado, el escólex (Figura 5)

se fija en la pared del yeyuno por medio de sus ventosas y ganchos rostelares (9). A partir de entonces el escólex comienza a crecer y diferenciarse hasta convertirse en gusano adulto.

La tenia adulta mide entre 1.5 m y 5 m de longitud y su cuerpo esta formado por el escólex, el cuello y el estróbilo. El estróbilo es una cadena de segmentos o proglótidos que se desarrollan a partir del cuello. Los proglótidos poseen cientos de testículos y un ovario trilobulado (Figura 6), por lo que se piensa que se autofecunda para producir hasta 50,000 huevos infectantes (4). La contaminación de aguas y alimentos con los huevos es favorecida por el fecalismo al aire libre, el hacinamiento y la falta de higiene personal. Se ha demostrado que el principal factor de riesgo es la presencia de un portador de tenia en el ambiente cercano (18, 89, 90, 91, 92, 93). El ciclo de vida se cierra cuando el hospedero intermedio ingiere los huevos que contaminan alimentos y agua.

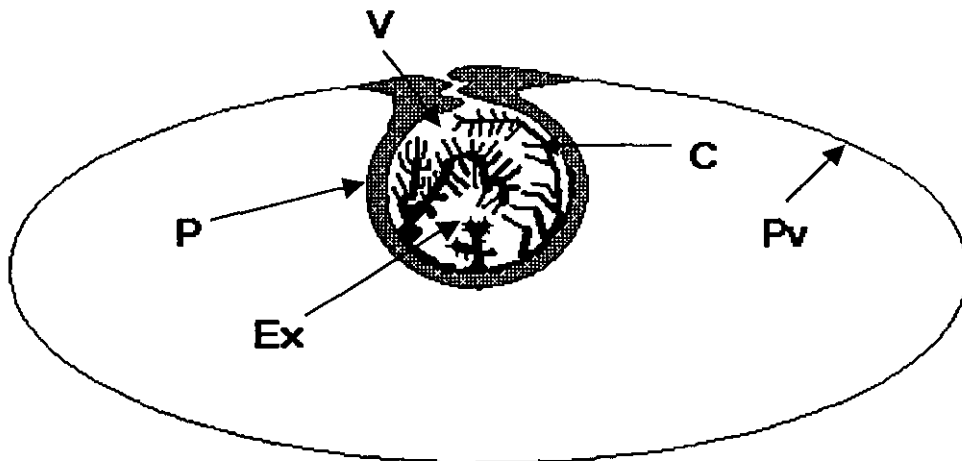


Figura 3. Ilustración esquemática de la larva o cisticerco de *Taenia solium*. C: canal espiral, Ex: escólex, P: pared vestibular, Pv: pared vesicular y V: espacio vestibular.

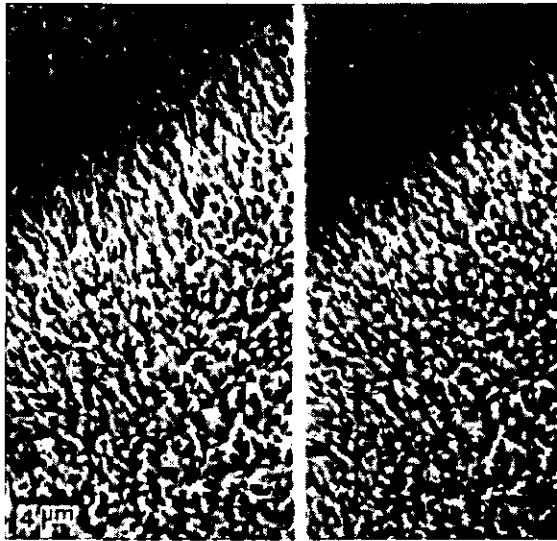


Figura 4. Superficie externa de la pared vesicular de un cisticerco de *Taenia solium* en la cual se pueden distinguir las microtricas (Tomada de 82).

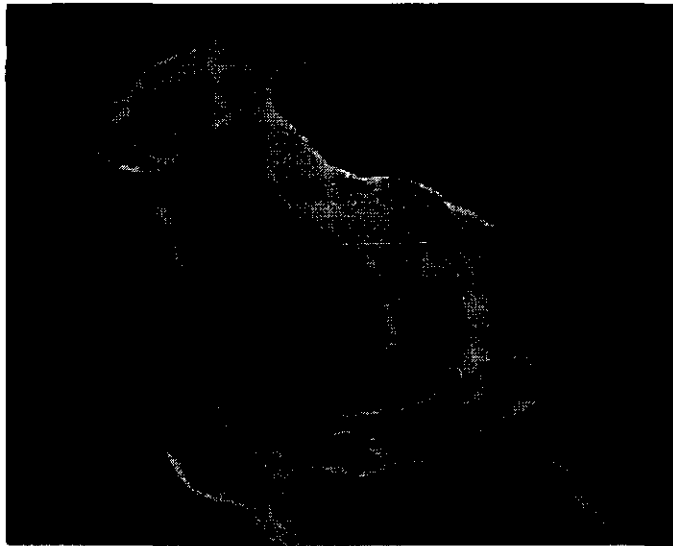


Figura 5. Micrografía electrónica de barrido del escólex de un cisticerco evaginado de *Taenia solium* (cortesía del Dr. Juan Pedro Laclette).

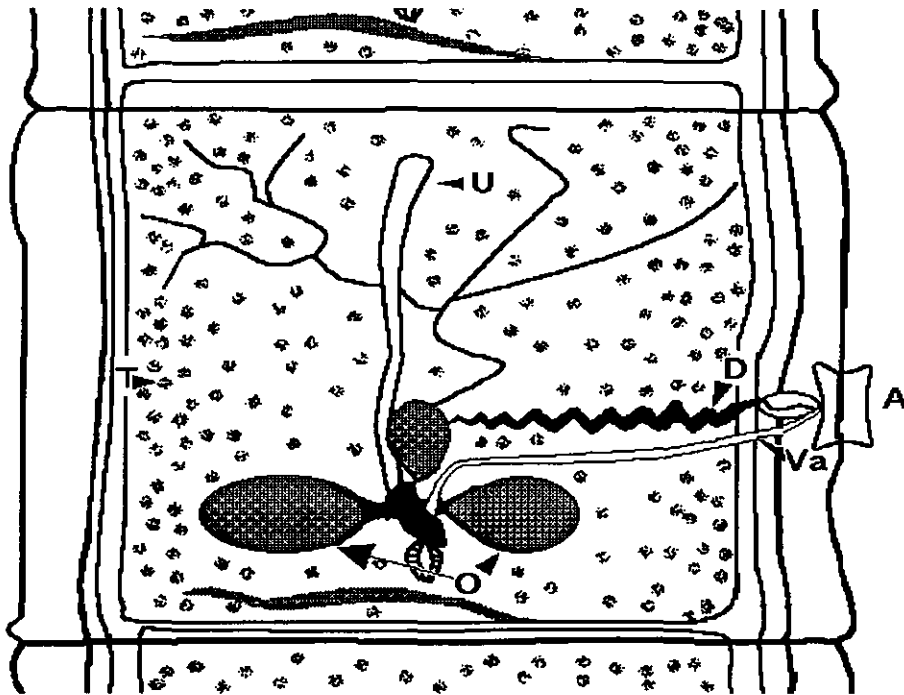


Figura 6. Representación esquemática de un proglótido de *Taenia solium*, enfatizando al aparato reproductor. A: atrio genital, D: ducto genital, O: ovario trilobulado, T: testículos, U: útero y Va: vagina.

2. Importancia de la cisticercosis

La cisticercosis humana es un problema de salud pública en México y otros países (24, 26). En un estudio realizado en 1982, Velasco-Suárez se calculan pérdidas económicas anuales equivalentes a 350 millones de dólares americanos, debidas a la incapacidad laboral de individuos con cisticercosis (115). La curación de enfermos con neurocisticercosis tiene un costo de 21 mil millones de pesos al año (88). También, se ha calculado que, durante 1986, el costo del cuidado médico de 2,700 nuevos casos de neurocisticercosis ascendió a 14.5 millones de dólares americanos; además, el 75% de los individuos adquieren la cisticercosis en edad productiva (24). En 1984, el gobierno de México estableció como prioritario un programa de salud para el control y la erradicación epidemiológicos(24).

En cuanto a la cisticercosis porcina, existen diversos estudios que han tratado de estimar la prevalencia de ésta, en diferentes regiones del país. El estudio más completo es el realizado con los registros de 75 rastros en 22 estados de la República, el cuál se puede ver en la tabla I (3).

La cisticercosis porcina causa considerables pérdidas económicas. En 1980 más de 43 millones de dólares se perdieron por decomisos de los rastros (2). Cabe mencionar que la cisticercosis porcina es susceptible al tratamiento con drogas cestocidas (24).

Se puede decir que la cisticercosis es un problema de salud pública que se mantiene por ignorancia, y falta de recursos (24). La costumbre de dejar deambular a los cerdos (Figura 7) incrementa el riesgo de que adquieran la cisticercosis por ingerir heces humanas contaminadas con huevos de *T. solium*. Los animales cisticercosos detectados en la inspección *post-mortem* deben ser decomisados y procesados adecuadamente para evitar destruir la carne. Cuando el animal infectado llega a un rastro, los animales cisticercosos son decomisados; sin embargo, en nuestro país, algunos animales infectados son distribuidos clandestinamente y no pasan la inspección veterinaria.



Figura 7. El cerdo es el hospedero intermediario de *Taenia solium*.

Tabla I. Prevalencia de la cisticercosis en diferentes regiones de país (Tomada de 3).

Estado	Localidad	Frecuencia	Año
Aguascalientes	Aguascalientes	0.52	1980
Chihuahua	Chihuahua	0.49	1980
	Chihuahua	3.32	1980
	Chihuahua	1.65	1981
Colima	Varios	2.40	1980
Coahuila	Torreón	2.37	1981
Distrito Federal	Ciudad de México	0.16	1981
Durango	Durango	2.21	1980
Guanajuato	Ocampo	10.0	1981
	San Felipe	3.0	1981
Jalisco	Guadalajara	0.005	1981
Michoacán	La Piedad	10.0	1980
Morelos	Varios	1.9	1980
	Cuernavaca	0.37	1980
Nuevo León	Monterrey	0.016	1981
Querétaro	Querétaro	0.74	1981
Sonora	Hermosillo	0.07	1980
Tamaulipas	Ciudad Victoria	0.37	1980
Tlaxcala	Huamantla	0.63	1980
	Apizaco	3.30	1980
Veracruz	Jalapa	0.11	1980
	Veracruz	0.75	1980
	Tuxpan	1.08	1980
Yucatán	Mérida	0.04	1980
Zacatecas	Jerez	0.75	1980
	Fresnillo	2.10	1980
	Zacatecas	1.26	1980
Tabasco	No se encontró información		
Campeche			

4. Inmunología de la cisticercosis humana y porcina

La presencia de los cisticercos en los tejidos de su hospedero humano o porcino induce la formación de una respuesta inmune. La respuesta inmune humoral del hospedero cisticercoso ha sido estudiada principalmente de una manera indirecta en trabajos relacionados con el inmunodiagnóstico. Se ha encontrado que la respuesta humoral no participa con la destrucción del metacéstodo. Los humanos con cisticercosis tienen anticuerpos contra el cisticercos y, a pesar de ello, el parásito sobrevive por periodos

relativamente prolongados. Algunos estudios han mostrado que el tiempo promedio para la aparición de los síntomas después de la infección en los pacientes es de 7 años y puede llegar hasta los 20 años (20)

La IgG es la inmunoglobulina predominante entre los anticuerpos anti-cisticerco, en humanos (14, 28). Inicialmente se mostró que los sueros de pacientes reconocen por inmunoelectroforesis hasta 8 antígenos y por Western blot más de 20 (27). En la cisticercosis humana los cisticercos presentan abundante IgG del hospedero asociada a la superficie, sin embargo, estas moléculas tampoco se relacionan con el daño en los cisticercos (14). También, se ha informado que hay anticuerpos humanos contra el glicocálix, componentes del citoplasma de los citones tegumentales, antígenos del estroma y del sistema ductural, pero no se ha encontrado en contra del tegumento del canal espiral, ni del músculo de las ventosas del escólex (100). En la cisticercosis porcina, la superficie del cisticerco, así como la cápsula inflamatoria formada por el hospedero, están cubiertas por inmunoglobulinas del cerdo (99). También, se ha descrito una molécula de 55 kDa que se une a la región Fc de las inmunoglobulinas (57).

Además, el hospedero es capaz de producir un infiltrado inflamatorio, cuyo perfil molecular es complejo y puede eventualmente eliminar al parásito. Por ejemplo, en el humano, en la cisticercosis meníngea, una de las formas relativamente benignas de la enfermedad, la reacción inflamatoria, es en general, escasa y el infiltrado está compuesto por linfocitos, células plasmáticas y epitelioides, pocas veces células gigantes y rara vez se observan eosinófilos. En contraste, en el caso de la cisticercosis meníngea cisternal, una de las formas más graves, la reacción inflamatoria está constituida por numerosas células inflamatorias entre las que se identifican linfocitos, células plasmáticas, algunos cuerpos de Russell, células epitelioides, numerosas células gigantes, pocos son polimorfonucleares y eosinófilos (80). El caso de la respuesta del cerdo es diferente. En la cisticercosis porcina en músculo esquelético, los eventos celulares durante la destrucción del parásito sugieren un proceso secuencial comenzado por los eosinófilos. Una vez iniciada la destrucción, se incrementan los macrófagos, células epitelioides, así como células gigantes que invaden la cavidad para fagocitar el exudado y los restos de la larva. Los linfocitos forman agregados similares a folículos, simultáneamente los eosinófilos parecen retirarse de la región más interna del proceso inflamatorio y se observan dispersos entre los demás elementos de la reacción granulomatosa (5). Cabe señalar que un punto discordante radica

en el tipo de infiltrado celular de la cisticercosis humana y de la porcina, ya que en el padecimiento humano casi no hay eosinófilos, lo cual ha sido explicado por el hecho de que la eosinofilia es un fenómeno temprano.

Las personas infectadas pudieran tener mayor susceptibilidad a otras enfermedades, lo cuál puede sugerir cierta inmunodeficiencia (14). Se ha descrito que la proliferación celular a mitógenos se encuentra disminuida en pacientes con cisticercosis (14), pero la evidencia es contradictoria (99, Apéndice 3). La disminución de la proliferación celular también ha sido descrita en la cisticercosis porcina (34, 65, 68, 106). Incluso se ha informado un factor de RNA que inhibe la activación de linfocitos por fitohemaglutinina (67). Sin embargo, se ha encontrado que los extractos del metacéstodo de la *T. solium* pueden ser mitogénicos para linfocitos de ratón (99).

Es consistente el hecho de que la disminución de la proliferación celular ha sido descrita en la cisticercosis murina por *T. crassiceps* (96, 116) y por *T. taeniaeformis* (50). Respecto a esto se ha reportado que antígenos de excreción/secreción del cisticerco de *T. crassiceps* pueden inhibir la proliferación de linfocitos T (103).

Se ha propuesto que el cisticerco emplea varios mecanismos para evadir la respuesta inmune del hospedero y sobrevivir por largos periodos (14). Entre los mecanismos propuestos se pueden mencionar: 1) secreción de antígenos inmunodominantes para desviar a los anticuerpos lejos de la superficie ("cortina de humo"), 2) enmascaramiento de la superficie con moléculas del hospedero, 3) modulación o supresión de la respuesta inmune del hospedero, 4) establecimiento del parásito en hospederos inmunosuprimidos y 5) alojamiento en lugares inmunológicamente privilegiados, como el sistema nervioso (14).

Se ha desarrollado un modelo de cisticercosis intraocular en conejos, la evidencia obtenida en este modelo indica que el cisticerco se puede establecer en sitios inmunológicamente privilegiados, pero que una vez que el hospedero se ha presensibilizado, los parásitos no se desarrollan (10).

5. Vacunación contra la cisticercosis

Se puede inducir inmunidad en cerdos con antígenos de excreción/ secreción obtenidos en cultivos de oncosferas (75), con extractos antigénicos del cisticerco de *T. solium* (65, 73) o de *T. crassiceps* (58, 95). También se puede proteger ratones de la

infección por *T. solium* y *T. saginata* con antígenos oncosferales de estos parásitos (66). En el caso de la *T. ovis* y de la *T. taeniaeformis*, se ha demostrado una alta protección utilizando proteínas oncosferales de excreción/ secreción o sus formas recombinantes (38, 39). Las formas recombinantes empleadas en el caso de *T. ovis*, también, inducen una elevada protección en la cisticercosis porcina (78). También se han detectado antígenos totales de *T. crassiceps* que pueden correlacionarse con la respuesta inmune protectora. (95). Recientemente, se han publicado revisiones sobre la vacunación contra la cisticercosis (25, 55).

En el desarrollo de vacunas contra los céstodos ténidos se han empleado oncosferas vivas con resultados muy positivos; se ha logrado inducir protección homóloga contra *T. ovis*, *T. hydatigena* y *E. granulosus* en borrego y *T. pisiformis* en conejos; la protección es más efectiva si el embrión eclosiona; además, se puede inducir inmunidad con oncosferas irradiadas para limitar la migración o colonización a otros tejidos (83). También, se ha logrado inducir protección con extractos completos de oncosferas contra *T. saginata*, *T. hydatigena*, *T. ovis* y *T. taeniaeformis* (83). Se ha demostrado que se puede inducir protección contra *H. nana* y se puede lograr protección contra el establecimiento/ supervivencia/ fecundidad de gusanos de *E. granulosus* en perros. Se ha sugerido que la infección previa de perros con gusanos de *E. granulosus* puede inducir protección, así como la inmunización oral con protoescolices irradiados, antígenos obtenidos de protoescolices o membranas de cisticercos. También, se puede inducir cierta protección contra *E. granulosus* con la inmunización parenteral de oncosferas activadas de *E. granulosus*, *T. hydatigena*, *T. ovis*, *T. multiceps*, *T. pisiformis* y *T. serialis* (54).

Por otro lado, se ha demostrado que los antígenos liberados por oncosferas vivas son capaces de proteger contra *T. ovis*, *T. taeniaeformis*, *T. hydatigena*, *T. pisiformis* y *T. saginata* (83). Una sola inmunización con antígenos del cultivo de oncosfera de *T. ovis* emulsificados en adyuvante incompleto de Freund inducen inmunidad protectora que dura 12 meses en ovejas. Sin embargo, lo mismo no se ha logrado con ganado y se piensa que la permanencia del antígeno tiene un papel determinante; incluso, se ha publicado que en corderos existen niveles elevados de anticuerpos protectores con una vida media corta contra *T. ovis* y *T. hydatigena* y, aparentemente, ocurre algo similar en la infección del conejo con *T. pisiformis*. Esto sugiere que en ausencia del antígeno, el anticuerpo protector tiende a desaparecer (83).

El desarrollo de una vacuna útil para el control de la taeniasis/ cisticercosis no es simple. Al respecto, se ha informado que la vacunación con altas dosis de antígeno de *T. crassiceps* en cerdos (95) y en ratón (98) parecen no ser protectoras o incluso podrían facilitar la infección, mientras que bajas dosis inducen la reducción de la carga parasitaria; también, se ha sugerido que el adyuvante empleado podría alterar la eficiencia de la protección en cerdos (95). Asimismo, se ha propuesto que algunos anticuerpos podrían facilitar la infección de *T. solium* en cerdos (95) y de *T. crassiceps* en ratón (94) y se ha encontrado que el genotipo puede influenciar la respuesta inmune a la infección por *T. crassiceps* en ratón (97) y lo mismo se ha sugerido en la cisticercosis porcina (95).

6. Mecanismo inmunológico humoral de protección

Los estudios sobre el mecanismo inmune de protección se han realizado principalmente en modelos experimentales de rata y ratón. En estos modelos se ha encontrado que el mecanismo de protección dependerá de la etapa de desarrollo del parásito. En rata y ratón se ha visto que la resistencia natural a la infección por oncosferas de *T. taeniaeformis* tiene componentes humorales. Esta resistencia se detecta en suero a partir de la segunda semana de infección. Existe evidencia que el mecanismo de resistencia depende del complemento. Sin embargo, después de la primera semana se pierde parte de la susceptibilidad del parásito a este mecanismo humoral de ataque. No obstante, después de esta etapa es posible inducir resistencia con extractos de cisticercos; la resistencia, si bien es humoral, depende de un perfil de isotipos diferente al producido después de la infección oral. Por otra parte, la IgA se ha involucrado en la resistencia natural pasiva transferida de ratas madres a sus crías durante la lactancia (117).

En ovejas se ha encontrado que la inmunidad inducida con antígenos liberados por cisticercos en cultivo se puede transferir de la madre a las crías por el calostro (83). En la hidatidosis ovina, la inmunidad no se transfiere pasivamente de madre a hijo (54).

La vacunación con antígenos de oncosferas de *T. taeniaeformis* ocasionan que muy pocas o ningún metacéstodo se establezcan, sin embargo las que llegan a establecerse permanecen viables y se desarrollan normalmente. La vacunación con antígenos de metacéstodos permite la detección de muchos parásitos después de las primeras semanas del reto; sin embargo, 5 semanas después son eliminados todos los parásitos; 60 días

después se evidencia que las lesiones remanentes de los parásitos eliminados desaparecen gradualmente y muy pocas pueden detectarse macroscópicamente (53).

Estudios morfológicos en oncosferas de *H. nana* que han penetrado el epitelio intestinal de ratones inmunes sugieren que el daño de los anticuerpos se localiza en la membrana externa del parásito. Además se ha demostrado que los anticuerpos y el complemento son los principales mecanismos que eliminan a las oncosferas. Sin embargo, la sensibilidad a este mecanismo se pierde en cuanto las oncosferas comienzan con el desarrollo de microvellosidades (83)

También, ratones con infección intraperitoneal primaria y ratones que no fueron protegidos por la infección subcutánea de *T. crassiceps* tuvieron niveles elevados de IgM, IgG1 y IgG3 séricos respecto a ratones controles y los ratones protegidos. Se ha demostrado IgG2b e IgG3 en la superficie de larvas viables de *T. crassiceps* (32).

7. Mecanismo inmunológico celular de protección

Los eosinófilos han sido frecuentemente relacionados con la destrucción del parásito. Este es el caso de la cisticercosis porcina. En la infección natural del cerdo por el cisticerco de *T. solium*, los eventos celulares durante la destrucción del parásito sugieren un proceso secuencial iniciado por los eosinófilos (5). Similarmente, en cerdos inmunizados con extractos de cisticerco de *T. solium* se han descrito varios tipos celulares en el proceso inflamatorio que destruye al parásito, tales como: eosinófilos, monocitos, linfocitos, macrófagos y células epitelioides. Sin embargo, los eosinófilos son los que participan en la destrucción del cisticerco, pues se ha encontrado que la inmunización induce eosinofilia. Estas células forman la capa más interna de la reacción granulomatosa que rodea al cisticerco, degranulan en las cercanías del parásito, se infiltran en el tegumento y rodean a los restos del parásito destruido (63, 64, 65, 73). En el modelo murino de cisticercosis por *T. taeniaeformis* se ha encontrado que después de que las oncosferas llegan al hígado, aparentemente, los eosinófilos se convierten en elementos prominentes de la respuesta inflamatoria que rodea y elimina las oncosferas (117). En infecciones intraperitoneales por *T. crassiceps* las células del hospedero tienden a acumularse alrededor del polo que gema antes de que se lleve a cabo la encapsulación del resto del cisticerco (32).

Además, al inducir protección con antígenos homólogos de oncosfera, a la infección intravenosa de huevos de *T. solium* o *T. saginatus*, se observa que los ratones controles en los estudios histopatológicos muestran una reacción inflamatoria alrededor del metacésto y en ocasiones bastante intensa, en donde se hallan macrófagos, linfocitos y células plasmáticas. Esta respuesta inflamatoria es diferente de la documentada en esquistosomosis o en cerdos infectados por *T. solium*, donde los eosinófilos se encuentran en contacto con la superficie del parásito. Esto puede sugerir que los eosinófilos no son atraídos hacia las etapas tempranas de los metacéstodos, sino más bien son reclutados en contra de etapas más tardías como en su hospedero natural (66).

Finalmente, en la infección intraperitoneal de ratones con metacéstodos de *T. crassiceps*, la resistencia se ha relacionado más claramente con la inmunidad celular que con anticuerpos (8).

8. Inmunología de la cisticercosis murina

El empleo del modelo murino ha permitido el conocimiento de puntos críticos de la inmunidad contra la cisticercosis, el modelo de cisticercosis murina por el cisticerco de *T. crassiceps* se discutirá más adelante. La penetración del epitelio intestinal y la diferenciación postoncosferal inmediata, son fenómenos muy importantes en términos de la infección y la respuesta al reto en animales inmunes; porque son en esos momentos cuando se inicia el contacto entre los determinantes antigénicos y el sistema inmune del hospedero. En la infección, el resultado es el desarrollo de una resistencia altamente específica y efectiva contra un reto; sin embargo, el metacésto logra establecerse e induce resistencia a infecciones similares posteriores. A partir de 3-4 días después de la infección se observa la infiltración de células fagocíticas atraídas probablemente por las células destruidas durante la penetración del parásito y la aparición de eosinófilos en las triadas portales (117).

Diferentes modelos han proporcionado diferentes conclusiones. Por ejemplo, el mecanismo de protección contra *T. taeniaeformis* en ratones parece no depender de la participación de linfocitos T, ya que ratones atímicos desnudos pueden ser protegidos de la infección por el parásito tan sólo con suero inmune. Por otro lado, se ha publicado que poblaciones enriquecidas de linfocitos B y T pueden causar reducción significativa de la

carga parasitaria, en menos tiempo del esperado para el mecanismo humoral (7, 117). Además, se ha informado que los cisticercos de *T. taeniaeformis* pueden sobrevivir por periodos largos en la cavidad peritoneal de ratas tratadas con grandes dosis de suero inmune protector (117).

8a. Inmunidad contra el cisticerco de *Taenia crassiceps*

En el modelo murino experimental de cisticercosis por el metacéstodo de *T. crassiceps*, el cisticerco se multiplica asexualmente por gemación en la cavidad peritoneal del ratón (29). El metacéstodo se mantiene por medio de pases sucesivos de ratón en ratón de tal manera que en este modelo experimental el parasito no llega al estado adulto. Sin embargo, este modelo ha permitido sugerir candidatos a vacuna contra la cisticercosis porcina (36, 58, 95).

Se puede inducir un nivel elevado de resistencia a la reinfección con *T. crassiceps* por la inoculación subcutánea de cisticercos vivos de *T. crassiceps* tres semanas antes del reto (32). Incluso, se han identificado antígenos de cisticercos de *T. crassiceps* con la capacidad de inducir protección en cerdos (58).

En la infección por *T. crassiceps*, se ha encontrado una relación entre eosinofilia y resistencia a la infección: la esinofilia fue más pronunciada cuando los cisticercos inyectados intraperitonealmente fueron destruidos o controlados por el hospedero; y mientras más rápido se desarrolla la eosinofilia, más eficiente es el control de los cisticercos (31).

La inmunización subcutánea con productos secretados-excretados de cisticercos de *T. crassiceps* en cultivo, con adyuvante completo de Freund o alumbre, son tan efectivas para inducir protección como los metacéstodos contra los cisticercos de *T. crassiceps* (32).

Se ha encontrado similitud antigénica entre *T. solium* y *T. crassiceps*. Esta similitud se puede aprovechar para inducir protección heteróloga. El suero de cerdos protegidos se ha usado para identificar cuatro clonas de una biblioteca de cDNA de cisticercos de *T. crassiceps* con la capacidad de inducir protección (58).

Recientemente, se ha sugerido que la respuesta Th1 ejerce control en la infección por el cisticerco de *T. crassiceps* (108, 116). Se ha encontrado que la respuesta protectora inducida con la inmunización con DNA está mediada por linfocitos T productores de IL-2

e IFN- γ (16). Un péptido con capacidad de inducir protección, también puede inducir la producción de IFN- γ (111). De manera similar la administración in vivo de IFN- γ o anti-IL-10 reduce la carga parasitaria (109). Se ha sugerido que la eliminación del parásito depende de una respuesta Th1 (IL-2 e IFN- γ) (87). En el laboratorio del Dr. Laclette hemos obtenido resultados similares a estos (Apéndice 2). Además se ha publicado que en esta infección se desarrolla una respuesta inmune mixta, es decir, Th1 y Th2 (103, 110). Previamente, en esquistosomosis, se ha sugerido que la protección inducida por la paramiosina tiene un mecanismo tipo Th1 (*ver adelante*).

9. La paramiosina de la *Taenia solium*

Uno de los antígenos mejor caracterizados del cisticerco de la *T. solium* es sin duda el antígeno B (AgB). Este antígeno fue caracterizado inicialmente como un arco de precipitación sin carga neta aparente, identificado por inmunoelectroforesis al confrontar un extracto de cisticercos contra sueros de pacientes con neurocisticercosis (Figura 8). En esta prueba, fue el antígeno reconocido con mayor frecuencia por anticuerpos en sueros de pacientes con neurocisticercosis, es decir, se trata de un antígeno inmunodominante (21, 119).

En 1982 se publicó el primer método de purificación del AgB. Este método era complejo y laborioso y permitía la purificación de pequeñas cantidades de proteína. El AgB purificado por el método original mostraba dos bandas de 85 y 95 kDa en electroforesis en gel de poliacrilamida (33).

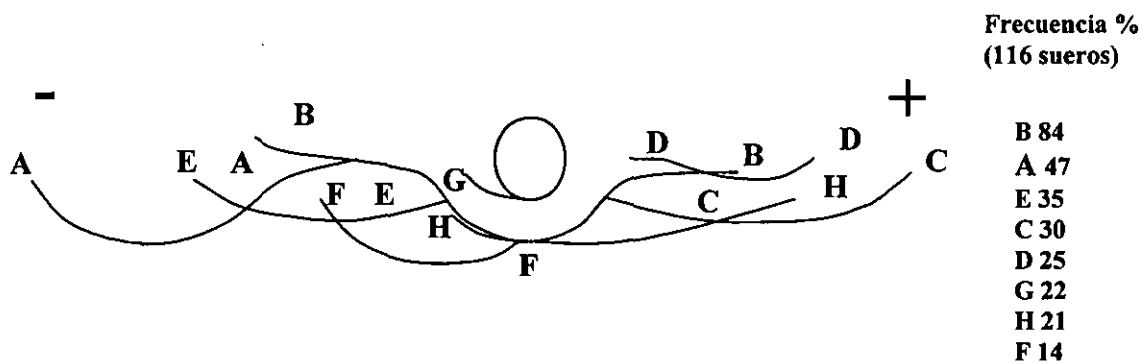


Figura 8. Diagrama clásico de las 8 bandas de precipitación reconocidas por anticuerpos en sueros humanos, enfrentados contra un extracto de cisticercos de *Taenia solium*, mediante la técnica de inmunoelectroforesis (Tomado de 26, 27).

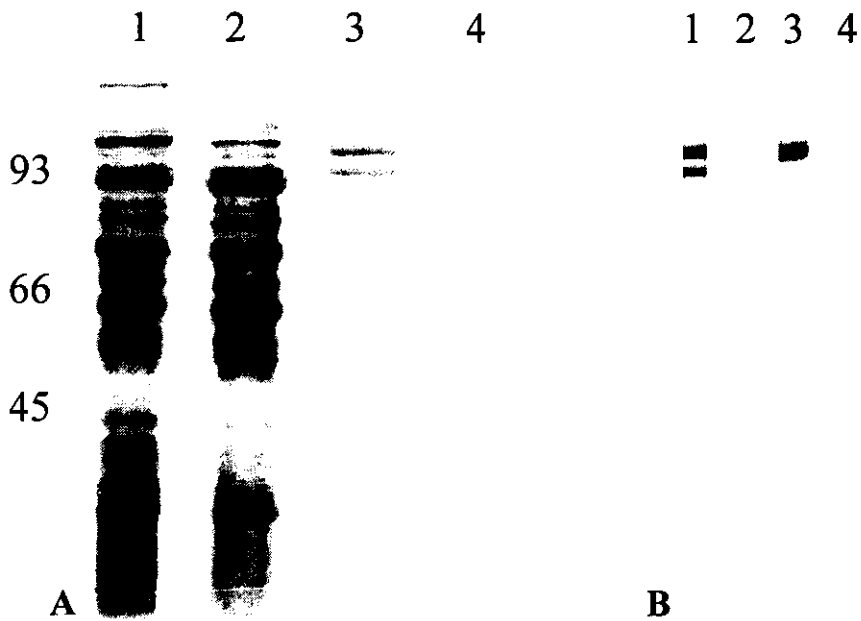


Figura 9. Purificación del AgB de *Taenia solium* a partir de un extracto crudo de cisticercos por afinidad a colágena. **A:** Gel de poliacrilamida teñido con azul de Coomassie de: 1) extracto crudo de cisticercos, 2) extracto crudo de cisticercos después de incubación con colágena polimérica. Fracciones unidas a la colágena cuando el extracto crudo se incubó en ausencia (3) o en presencia (4) de inhibidores de proteínasa. **B:** Inmoelectroforesis de la fracción A3 (carriles 1 y 2) y A4 (carriles 3 y 4) incubadas con IgG de conejo anti-AgB (tiras 1 y 3) y con suero normal de conejo (tiras 2 y 4) (Tomado de 45).

Accidentalmente se encontró que el AgB se une a la colágena (79), lo que dio la pauta para desarrollar un procedimiento de purificación por afinidad (Figura 9). El uso de este nuevo método de purificación permitió mostrar que el péptido de 85 kDa era en realidad un producto proteolítico de 95 kDa (41).

La localización de AgB en el cisticerco ha sido llevada a cabo por métodos de inmunofluorescencia e inmunoperoxidasa indirecta, así como por métodos de yodación radioactiva de la superficie (43). El antígeno se encontró ampliamente distribuido en el tejido del cisticerco, con una fluorescencia más intensa en los citones tegumentales (43, 45) (Figura 10). Dado que estas células participan activamente en la producción de

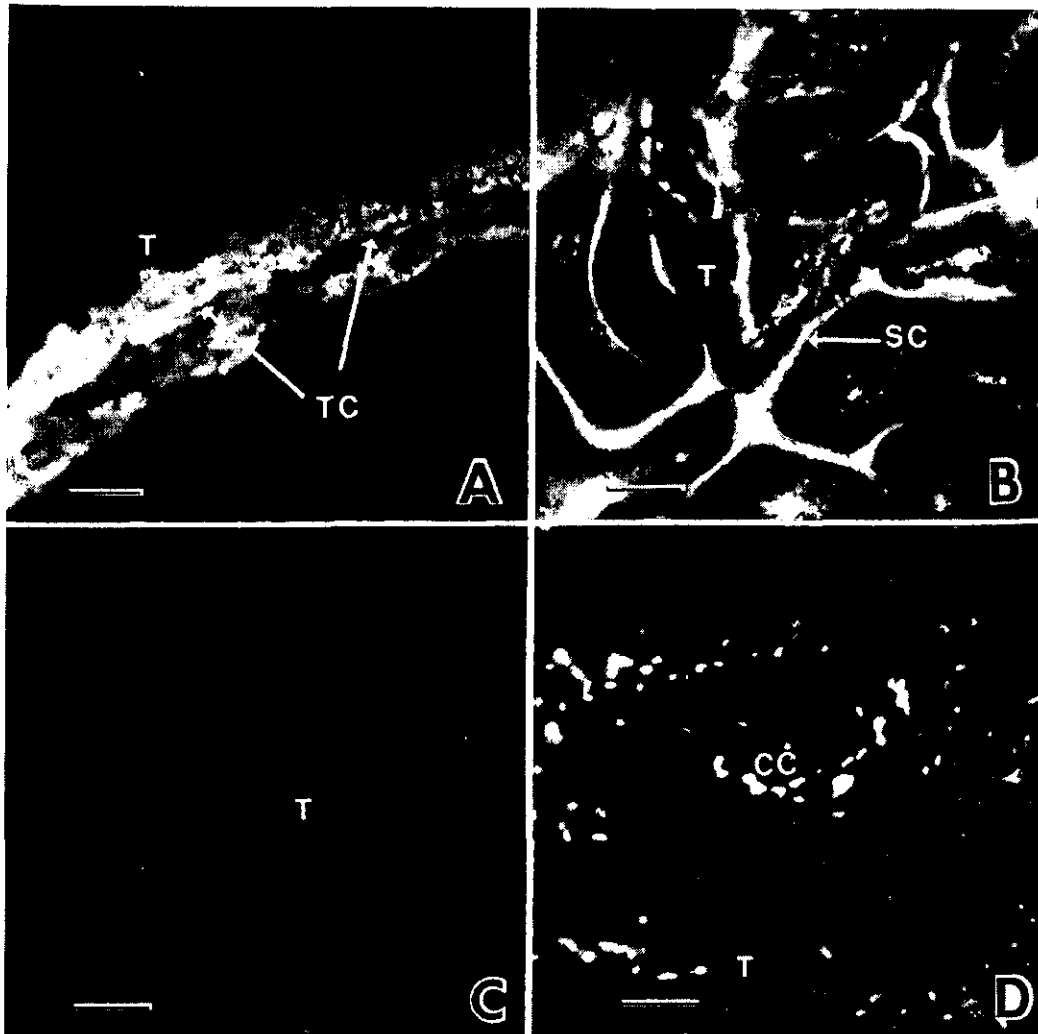


Figura 10. Inmunofluorescencia indirecta de cortes del tegumento (A y C) y el escólex (B y D) del cisticerco de *Taenia solium* incubado con un suero anti-AgB (A y B) o suero de conejo normal (C y D). Como segundo anticuerpo se usó un suero de chivo α -conejo acoplado a isotiocianato de fluoresceína. C.C., corpúsculos calcáreos; S.C., canal espiral; T.C., citones tegumentales; T, tegumento. Barra=80 μ m (A y C), 90 μ m (B y D) (Tomado de 43).

proteínas y glicoproteínas que se envían al citoplasma distal (56, 112), se propuso que el AgB podría ser sintetizado en los citones tegumentales y enviado al tegumento para su liberación hacia los tejidos del hospedero (43). Los resultados de experimentos con inmunoperoxidasa indirecta y yodinación radioactiva de superficie, indicaron que el AgB no era una proteína de superficie por lo que se propuso que se trataba de un producto de excreción-secreción del parásito (43, 45). Además, se puede coleccionar AgB en el sobrenadante de cultivo *in vitro* de cisticercos (45) y se le puede detectar en el líquido

cefaloraquídeo de pacientes con neurocisticercosis (14). Cabe señalar que recientemente se ha detallado la localización del AgB en el tegumento de helmintos (47).

La posibilidad de que se trate de un producto de excreción-secreción concordaba con su inmunodominancia y se correlacionaba bien con la producción intensa de anticuerpos en las células plasmáticas que rodean al cisticerco en el músculo de cerdo (17). Sin embargo no concuerda con el infiltrado inflamatorio débil en el granuloma que rodea al cisticerco en el músculo esquelético del cerdo (5).

La relación entre el AgB y la reacción inflamatoria surgió a partir de su propiedad de unión a colágena. Esto llevó a cuestionar qué otras moléculas con estructura colagénica podrían unirse al AgB. Entre las proteínas con estructura colagénica cuya función se relaciona al sistema inmune, se encuentra el C1q. Esta proteína es un subcomponente del C1, el primer componente de la cascada del complemento.

Ensayos iniciales mostraron que una preincubación de suero humano con AgB purificado, disminuye los niveles de complemento funcional en el suero (45). La inhibición del C1, posiblemente debida a la unión del AgB con el C1q (Figura 11) (46). Una secuencia parcial del AgB mostró homología con la secuencia también parcial de la paramiosina del *Schistosoma mansoni* (42). A partir de este hallazgo fue posible obtener clonas de cDNA que contienen la secuencia codificadora completa del AgB de *T. solium*, tal como se muestra en la figura 12 (49). La secuencia de aminoácidos deducida a partir de la secuencia nucleotídica codifica para una proteína de 863 residuos de aminoácidos con un peso molecular de 98,000. El análisis de la secuencia de aminoácidos mostró un 72% de similitud con la paramiosina de *S. mansoni* y alrededor de un 30% de homología con paramiosinas de nemátodos como *Caenorhabditis elegans* y *Dirofilaria immitis* o de artrópodos como *Drosophyla melanogaster* (49). También, se demostró identidad inmunológica de la proteína recombinante, expresada en *Escherichia coli*, con el AgB (49), además de identidad inmunológica entre paramiosina de *S. mansoni* y el antígeno B. Estos resultados demuestran que el AgB es la paramiosina de la *T. solium* (TPmy), por lo que a partir de aquí se utilizará exclusivamente el término de paramiosina. Las paramiosinas son proteínas del músculo de invertebrados (12, 43, 47). La paramiosina es una proteína filamentosa con estructura de un α -hélice superenrollada que forma homodímeros paralelos (12).

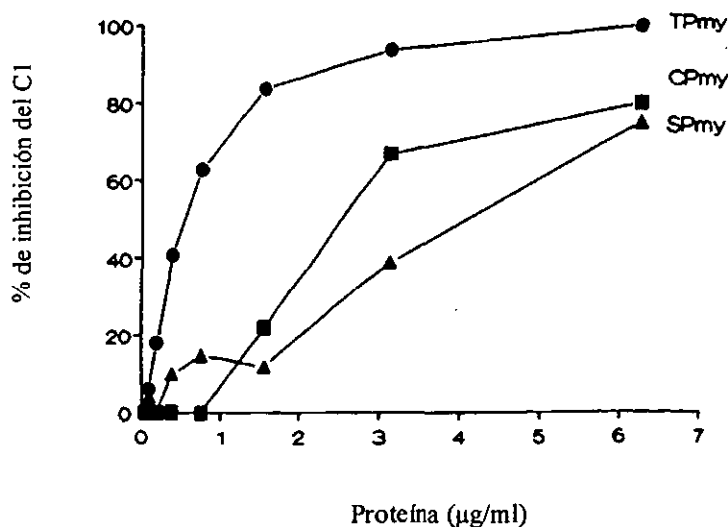


Figura 11. Inhibición de la actividad del complemento por la paramiosina. Diferentes cantidades de paramiosina se incubaron a 37°C por 30 min con C1 aislado. La actividad residual de C1 se evaluó con un ensayo hemolítico (Tomado de 46).

Nuestro grupo ha propuesto que las paramiosinas inhiben la producción de mediadores complementarios de inflamación en la interfase hospedero-cisticerco, es decir, que desempeñan un papel inmunomodulador de la respuesta del hospedero (46, 49). El cisticerco puede evitar el reclutamiento de células hacia la interfase para disminuir la confrontación con su hospedero humano o porcino. Por lo anterior, la TPmy se ha convertido en un candidato para el desarrollo de una vacuna en contra de la cisticercosis.

Cabe mencionar que la paramiosina es también candidato para el desarrollo de una vacuna contra infecciones helmínticas tales como esquistosomosis (23, 48, 76, 77, 81, 84) y filariasis (51, 52, 70). Además, se puede inducir protección contra *Schistosoma japonicum* con un anticuerpo monoclonal IgE anti-paramiosina (71) y se ha sugerido que la respuesta inmune a la paramiosina se relaciona con la resistencia natural a la esquistosomosis en humanos (15). Incluso, se ha logrado producir anticuerpos anti-paramiosina en ratón al vacunar con fragmentos de DNA que codifican para paramiosina de *Schistosoma japonicum* (120). Algunos resultados obtenidos en el laboratorio del Dr. Laclette muestran que la inmunización con TPmy recombinante induce protección en contra de la cisticercosis murina (Apéndice 2). Recientemente se ha encontrado que la inmunización con DNA de TPmy puede inducir protección contra la infección por el cisticerco de *T. crassiceps* (Laclette, comunicación personal). Finalmente, se ha

TPmyX1 →
1 ATGCTCGAATCACACGTCAAAATTTCTCGTACCATCATACGCGGGACTTCCCAAGTACTGTTCCGACTTGAGAGTCCGCTACGAGAACTGGAGGACCTGC
M S E S H V K I S R T I I R G T S P S T V R L E S R V R E L E D L 33

101 TCGACTTTGAGCGAGATCTCGCGTCCGGGCTGAACGCAATGCCAACGAGATGAGCATTGAGCTGGACACCATGGCTGAAACGCTTTCGACGAATGAGTGC
L D L E R A D R V R A E R N A N E M S I Q L D T M A E R L D E L S G 67

201 TACTTCTCTCAGACTCAGGATGCTATTCGCGCTAAGGATATGGAGATCTCGAAGCTGCGCAAGGATCTGGAAAAATGCCAACGCTCTTTCGAACTGCC
T S S Q T H D A I R R K D M E I S K L R K D L E N A N A A F E T A 100

301 GAGGCCACTCTGCGCGCAAAACAACACCATGATCTCCGAGATCTCCAGCGAGGTTGAGAATTTGCAGAAGCAGAAGGGCAGGCGAGAGAAGGACAAGA
E A T L R R K H N T M I S E I S S E V E N L Q K Q K G R A E K D K 133

401 GCCAGCTCATGCTTGAATCGATAACGTTCTGGTCAACTTGATGGCGCTTTAAAGGCCAAGGCCCTCAGCGGAGAGCAAACTGGAGGGCTTGGACAGCCA
S Q L M L B I D N V L G Q L D G A L K A K A S A E S K L B E G L D S Q 167

501 GCTGACGCGCTGAAAGCGCTGACGCGATCTTCAACGCAAAATGGCCGACGCTAACTCTGCCAAGTCGCGTTTGGCCGAGAGAATTCGAAATGGTT
L T R L K A L T D D L Q R Q M D A N S A K S R L A E A T T G 200

601 CGCGTAAATCAGGAGTATGAAGCACAGTCTCACCTTCTTAAGACAAAGGCCGCTCTTGAAGCCAGCTGGATGACCTTAAACGGGCCATGGATGAAG
R V N Q E Y E A Q V V T F S K T K A A L E S Q L D D L K R A M D E 233

701 ATGCACGCAATCGCCTAAGCCTTCAAAACACAGTTTGGAGTCTGCAAAATGGACTACGACAACTGCAAGCAGTTACGAGGAGGAAGCGAGGCGCGG
D A R N R L S L Q T Q L S S L Q M D Y D N L Q A R Y E E E A E A A G 267

801 AAATCTCGCAACCAAGTTGCCCAAATTCACGCGGATATGGCTGCCCTCAAGACCGCTCTTGAGAGAGAATTTATGGCCAAGACTGAAGAGTTTGAAGAA
N L R N Q V A K F N A D M A A L K T R L E R E L M A K T E E F E E 300

TPmyX4 →

901 CTCAAACGCAAGCTGACTGTTTCGCAATCACGAGTTGGAGGATATGGCTGAACATGAGCGCACTCGTGCCAACAACCTGGAGAGACCAAAAGTTAAGCTGA
L K R K L T V R I T E L E D M A E H E R T R A N N L E K T K V K L 333

1001 CTCTTGAGATCAAGGATCTACAGGCTGAGAACGAGCGGTTGGCAGCAGAGAAATGAGAGTTAACGCATCGGGCGAAAGGAGGAGAAATCTGCCAATGA
T L E I K D L Q A E N E A L A A E N G E L T H R A N E A E N L A N B 367

1101 GCTGACGCTCGAATAGACGAGATGACAGTGAATCAACAACCTCACTCGGCCAAACAGCGCTCTAGAGGGCGGACAACAATGCGCCTCAAGGGCGAGTCT
L Q R R I D E M T V E I N T L N S A N S A L E A D N M R L K G Q V 400

1201 GGTCACCTCACGACCGCATCGCAATCTCGACCGGAAAAACCGCAACTTGGCGATCAACTGAAGGAGACGAAATCAGCCCTGCGTATGCGAATCGTCTC
G D L T D R I A N L D R E N R Q L G D Q L K E T K S A L R D A N R 433

1301 GACTGACCGATTGGAGGCCCTCGCAGTCACTGGAGGAGAGCGTCAACCTCGCCCTGCTCTCCATGATGCTGAGGAGGACTGAAGGAGATGGA
R L T D L E A L R S Q L E A E R D N L A S A L H D A E E A L K E M E 467

1401 AGCGAAGTACGTTCCGCGAGAACGCTTAAATCACCTCAAGTCCGAGATGGAACAACGCTCTGCGTGAAGGAGCAGGAACTGGAGAAATCTGAGAAAG
A K Y V A S Q N A L N H L K S R M E Q R L R E K D E E L E N L R K 500

1501 AGCAGCTCGCAAGATGAGGAGTTGACAAACCACTCTCAGAGATGGAGTTTCGCTTCAAGTCCGATATGCTCTGCTGAAGAAGAAGTACGAGGCGA
S T T R I E E L T T T I S E H E V R F K S D M S R L L K K Q L E A 533

1601 CAATCAGCGAGCTAGAGGTGCAACTAGACGTTGCGAAGCGGAAAGCGTCAACCTCAACCGCGAGAACAAAAACCTGGCTCAACGAGTTCAAGAGCTGCA
T I S E L E V Q L D V A N K A N V N L N R E N K T L A Q R V Q B E L Q 567

TPmyX7 ← TPmyX5 →

1701 GGCTGCGTTGGAGGACGAGCGACGAGCTCGCAAGCTGAGAGCAACTTGCAGGTGAGCGGCGCAACGCACTCGCCCTGCTCTGGAAGTGAAGAG
A A L E D E R R A R E A A E S N L Q V S E R K R I A L A S E V E E 600

1801 ATTGCGAGCCAATGGAACTCAGTGAACCGCGCTCGCAAGAGCGAGTCCGAACTCAACGATGCCAATGGAAGTATCTCGGAGCTCACCCCTATCGGTCA
I R S Q L E L S D R A R K N A E S E L N D A N G R I S E L T L S V 633

1901 AACTCTTACCAATGACAAACCTGACTTGAAGCGGATATGGCGTCAAGCGGATCTCGATGAGGCGCTCAATGCGCGCAAGGCTCTGAGGATAG
N T L T N D K R R L E G D I G V M Q G D L D B A V N A R K A A E D R 667

2001 AGCTGACCGTCTGAACGCTGAGGTTCTCGCGCTGGCTGAGCTGCGACAGGAACAAGAAAAATCAACGCTGCTGAGACTCTGCGCAAGCAACTTGAG
A D E R L N A D E L R L A D E L R Q E Q E N Y K R A E T L R K Q L E 700

2101 ATCGAGATCCGTTGAGATCAAGTCAAGTTGGAGGAGCTGAGGCTTTCGCTACTCGTGAAGGCTCGCGTATGGTTCAAAGCTCCAGAAATCCGGTGAAGG
I E I R E I T V K L E E A E A F A T R E G R R M V Q K L Q N R V R 733

2201 AGCTTGAGGCGGACGTTGGAACGAGAAATTCGTCGCGCAAGGAGCGCTTCGCAACGCGCGCAATAAGAGCTCAATCAAGGAACTGAGACACAGAG
E L E A D V D G E I R R A K E A P A N A R K Y E R Q F K E L Q T Q S 767

2301 CGAGGATGATAACGCATGATTTGGAGCTTCAAGACCTGCTAGACAGACTCAGATCAAGATGAAAGCCTACAAACGTCAGCTTGGAGAACAGGAAGAG
E D D K R M I L E L Q D L L D K T Q I K M K A Y K R Q L E E Q E E 800

2401 GTGCTCAGCTGACGATGAGCAAGTACCGTAAAGCGCAGCAACAGATTGAGGAGCGCAACATCGTCTGACATGGCGAGAGGACGATCACCAATTAAGA
V S Q L T M S K Y R K A Q Q Q I E E A E H R A D H A E R T I T I K 833

2501 GGACAAATGGTGGACCCGTTCCCGCGCGCTTTCGGTGGTTGGGAGATCAACAGTGTCTCCCGTGGTAAACCGTCAACCGATCATGAGATGCTCTC
R T I G G P G S R A V S V V R E I N S V S R G N R A T S I M - - - 863

TPmyX2 ←

Figura 12. Secuencia nucleotídica y de aminoácidos de la región codificadora de la clona de cDNA de la paramiosina de la *Taenia solium*. Los codones de iniciación (ATG) y de terminación (TAG) se encuentran tachados. Las secuencias subrayadas señalan las secuencias correspondientes a los oligonucleótidos empleados para amplificar los fragmentos de la TPmy (Tomada de 49).

encontrado que un anticuerpo monoclonal dirigido contra un antígeno de superficie de 14 kDa de *Onchocerca microfilariae* reconoce una molécula que parece ser la paramiosina en un extracto de gusano adulto (13).

Para caracterizar la interacción de la paramiosina con la colágena y el C1q a nivel submolecular, en nuestro laboratorio se han preparado una serie de construcciones plasmídicas para la expresión recombinante de diferentes fragmentos de paramiosina, así como de la molécula completa. Cada uno de los fragmentos recombinantes ha sido expresado, purificado en cantidad suficiente (del orden de miligramos) y probado en experimentos de unión a colágena y C1q, así como de inhibición del complemento. Cabe hacer notar que esta estrategia es posible gracias a que disponemos de clonas de cDNA, conteniendo la secuencia codificadora completa de TPmy (49).

Desde los primeros ensayos se determinó que la interacción con C1q es a través del extremo amino-terminal de la paramiosina. Por lo cual, en nuestro grupo se han realizado cinco series más de construcciones de expresión, que han permitido localizar el sitio de unión con C1q en fragmentos peptídicos cada vez menores, siempre asociado al extremo amino de la TPmy. El número total de construcciones de expresión exitosas obtenidas para el gene de TPmy se aproxima a 30. Se ha logrado expresar TPmy en cantidades preparativas incluso en sistemas eucarióticos glicosilantes. En la actualidad se tiene una idea razonable de la región de la TPmy que se une al C1q y este proyecto del grupo se encuentra en una situación investigativa especialmente interesante (Laclette, comunicación personal).

La expresión de TPmy recombinante también ha permitido estudiar hacia que regiones de la proteína se dirige la respuesta inmune humoral y celular del hospedero. En estos estudios se utilizaron algunos de los fragmentos recombinantes mencionados arriba. Los ensayos de Western blot en los cuales se enfrentan sueros de pacientes con cisticercosis con cada uno de los fragmentos recombinantes, indican que los anticuerpos reaccionan principalmente con el extremo carboxilo-terminal de la TPmy, mientras que la respuesta celular de los sanos muestra una preferencia por el extremo amino-terminal (Apéndice 1). Estos resultados sugieren que el parásito oculta la región que une C1q al reconocimiento por anticuerpos. Recientemente se ha utilizado la técnica de “phage display” para la caracterización de secuencias epitópicas dentro de la TPmy (30).

El caso anterior es un ejemplo de la aplicación de la ingeniería genética para identificar las regiones de una molécula que son relevantes en su interacción con otras moléculas. Debido a que la paramiosina es un antígeno natural e inmunodominante es especialmente interesante determinar cuáles son las regiones de la molécula que interaccionan con el sistema inmune. Este estudio puede ayudarnos a comprender qué características debe reunir una molécula para ser inmunodominante o inmunogénica..

10. La paramiosina como antígeno protector

La inmunización con paramiosina induce protección contra la esquistosomosis (23, 77, 81, 101) y contra la filariasis (52, 70). Incluso el DNA codificante de paramiosina induce protección contra *S. japonicum* (121) y se ha inducido protección en cerdos contra la infección por *S. japonicum* (11).

La paramiosina también puede inducir protección heteróloga. La Pmy de *Caenorhabditis elegans* induce protección contra *Brugia malayi* (70) y lo mismo se ha sugerido de *Lumbricus terrestris* contra *Schistosoma japonicum* (118); algo similar se ha encontrado en el laboratorio del Dr. Lacleste, ya que la paramiosina de *T. solium* induce protección parcial contra *T. crassiceps* (Apéndice 2). Se ha propuesto que además de la protección de acuerdo al número de adultos de *S. mansoni*, también induce reducción en la formación de granulomas generados por huevos (35).

Existe evidencia que sugiere que la respuesta inmune contra paramiosina se correlaciona con resistencia en humanos a esquistosomosis (15) y oncocercosis (104).

La evidencia respecto al mecanismo protector que induce la inmunización con paramiosina es interesante, especialmente por la polarización que fue descubierta en ratón entre la respuesta Th1 y Th2. Se sabe que la paramiosina induce protección contra *S. mansoni* o *B. malayi* junto con hipersensibilidad de tipo tardío o DTH (70, 101), y que provoca la liberación de linfocinas activadoras de macrófagos contra *S. mansoni* (77, 101); esto sugiere un mecanismo tipo Th1. En otro sentido, se induce protección contra *S. japonicum* con un anticuerpo monoclonal IgE y se induce citotoxicidad contra esquistosómulas cuando se incuban con eosinófilos (40); esto sugiere un mecanismo tipo Th2. Estos datos sugieren que la resistencia contra esta clase de parásitos tiene, en parte al componente celular.

V. OBJETIVO DE PROYECTO:

El objetivo general de esta tesis es contribuir a la caracterización de la respuesta inmune que el ser humano y el ratón desarrollan contra la paramiosina de la *T. solium*.

Objetivos particulares:

1) Inicialmente se estudió la respuesta humoral y celular del humano con cisticercosis en contra de la TPmy; con el objeto de determinar si la respuesta humoral y celular de los pacientes mostraba una preferencia de reconocimiento hacia alguna región de la TPmy, se expresaron en bacteria cuatro productos recombinantes de la TPmy: la proteína completa, el tercio amino-terminal, el tercio central y el tercio carboxilo-terminal. Todos ellos fueron purificados prácticamente a homogeneidad usando una técnica de cromatografía de afinidad (Apéndice 1), y puestos a reaccionar con sueros de pacientes humanos, o fueron usados para estimular células de sangre periférica de pacientes en un sistema de proliferación de linfocitos *in vitro*.

2) Debido a que no existe una vacuna establecida contra la cisticercosis evaluamos la capacidad de la TPmy para inducir protección en contra de la cisticercosis en el modelo murino. Además, se decidió estudiar la respuesta humoral y celular del ratón en contra de la TPmy; en concreto, se determinó si la respuesta humoral y celular del ratón mostraba una preferencia de reconocimiento hacia una región de la TPmy. Para ello, se emplearon los mismos cuatro productos recombinantes de la TPmy. Se inmunizaron ratones con la proteína completa y, los tercios fueron puestos a reaccionar con sueros de los ratones inmunizados, o fueron usados para estimular células de bazo en un sistema de proliferación de linfocitaria.

VI. HIPÓTESIS

Dado que la paramiosina genera protección contra la esquistosomosis y la filariasis, induce protección contra la cisticercosis. Esto es a través de un perfil de respuesta inmune tipo Th1 que genera protección contra el cisticerco de *T. crassiceps* en el hospedero murino.

VII. RESULTADOS

Los resultados de esta tesis se presentan en forma de artículos publicados. Los primeros trabajos, que se realizan con el fin de caracterizar la respuesta inmune del humano y del ratón en contra de la TPmy, se encuentran en los apéndices 1 y 2, en dónde puede apreciarse que la respuesta inmune humoral y la celular contra la TPmy es diferente contra cada región de la molécula, a pesar de haber un gran parecido conformacional entre ellas. También, se informa que la TPmy induce protección contra la cisticercosis. El tercer trabajo analiza la respuesta inmune-celular de individuos con neurocisticercosis y la compara con la de individuos sanos.

Un artículo referido es: “Human T and B cell epitope mapping of *Taenia solium* Paramyosin” por José Vázquez-Talavera, Carlos F. Solís, Edith Medina-Escutia, Zoila Morales López, Jefferson Proaño, Dolores Correa & Juan Pedro Laclette que aparecerá publicado en *Parasite Immunology* (Apéndice 1). En dicho artículo se describe la elaboración de cuatro construcciones plasmídicas para expresar, por medio de técnicas de DNA recombinante, la TPmy completa, el tercio amino-terminal, el tercio central y el tercio carboxilo-terminal. La obtención de los fragmentos de la TPmy se llevó a cabo por la amplificación por PCR de tres regiones diferentes del gen completo de la TPmy, estas amplificaciones se realizaron empleando oligonucleótidos sintéticos que permitieron la ligación a un vector de expresión bacteriano (pRSET). Al ligar los fragmentos del gen a este vector las proteínas fueron expresadas unidas a un péptido de fusión que contiene una secuencia de seis histidinas, las cuales facilitaron su posterior purificación por cromatografía de afinidad (*ver Materials and Methods del Apéndice 1*). Posteriormente, se analiza la respuesta inmune de individuos con neurocisticercosis por medio de la técnica de Western blot. Se encontró que el reconocimiento de anticuerpos en el suero de pacientes neurocisticercosos es preferentemente hacia el extremo carboxilo-terminal de la TPmy, mientras que los mismos anticuerpos reconocieron pobremente al extremo amino-terminal (Figura 2 *del Apéndice 1*). Por otro lado, las células de sangre periférica mostraron un patrón totalmente diferente. Las células de pacientes neurocisticercosos proliferaron con, prácticamente, la misma frecuencia al ser estimuladas con los tres fragmentos. En contraste,

las células de individuos sanos de la misma zona endémica proliferaron en mayor frecuencia al ser estimuladas con el extremo amino-terminal (Tabla 1 *del* Apéndice 1).

Otro artículo es: "Characterization and Protective Potential of the Immune Response to *Taenia solium* Paramyosin in a Murine Model of Cysticercosis." por José Vázquez-Talavera, Carlos F. Solís, Luis I. Terrazas, and Juan P. Lacleste, que se publicó en *Infection and Immunity* (2000), 69:5412-5416 (Apéndice 2). En dicho artículo se emplearon las proteínas recombinantes anteriores (la TPmy completa, la amino-terminal, la central y la carboxilo-terminal) para inducir protección en contra del cisticerco de *T. crassiceps*. Al inmunizar ratones con las cuatro proteínas recombinantes y retarlos con el cisticerco, se observó que la TPmy completa indujo protección contra la cisticercosis murina y que, en el extremo amino-terminal radicó la capacidad protectora (Tabla 1 *del* Apéndice 2). Al analizar los sobrenadantes de esplenocitos de ratones que se inmunizaron con el extremo protector y se estimularon con este mismo fragmento, para la cuantificación de citocinas, se detectó la liberación de IL-2 e IFN- γ de una manera antígeno específica, pero no de IL-4, es decir, una respuesta inmune tipo Th1 (Tabla 4 *del* Apéndice 2). También, se puede observar que los anticuerpos de los ratones inmunizados con TPmy-completa reconocieron preferentemente al extremo carboxilo-terminal, mientras que el extremo amino-terminal es pobremente reconocido (Tabla 2 *del* Apéndice 2), lo cual es similar a lo encontrado en humanos. En contraste, los linfocitos T de los mismos ratones proliferaron principalmente al ser estimulados con el extremo amino-terminal (Tabla 3 *del* Apéndice 2). Asimismo, se encontró que el isotipo de anticuerpos generado en contra de la proteína recombinante amino-terminal es IgG1; no obstante, como se verá en la *Discusión* esto ya ha sido publicado.

A través de un trabajo de colaboración con el grupo de D. Correa (Apéndice 3) se decidió estudiar si la respuesta inmune celular del individuo con neurocisticercosis, es diferente de la respuesta del individuo sano; en otras palabras, se buscaron evidencias de inmunosupresión en el individuo con neurocisticercosis. Se investigó la presencia de infecciones recurrentes que señalen un estado inmunosuprimido. Se analizó la respuesta celular en casos de neurocisticercosis activa en respuesta a concanavalina A y a un extracto crudo de cisticercos de *Taenia solium*. También se estudia el número de células con los marcadores CD3, CD4 y CD8. Asimismo, se explora la síntesis de mRNA (RNA

mensajero) de IFN- γ , IL-2, IL-4 e IL-10 por amplificación con técnicas de PCR (reacción en cadena de polimerasa). La respuesta celular, los marcadores y las citocinas se analizaron con el fin de saber si la respuesta inmune celular está suprimida. Como se puede ver en el *Apéndice 3* se encuentra que las características mencionadas anteriormente (infecciones, respuesta celular, marcadores, citocinas) de los individuos con neurocisticercosis son similares a los de los individuos sanos. En conclusión, en ningún caso encontramos evidencias de inmunosupresión.

VIII. DISCUSIÓN GENERAL

En la presente tesis se estudiaron las propiedades inmunológicas de la paramiosina completa así como de tres diferentes regiones: el tercio amino-terminal, el tercio central y el tercio carboxilo-terminal. Además, en colaboración con otro laboratorio se analizó la respuesta inmune celular del paciente neurocisticercoso. Primero se discutirán ciertos aspectos de los resultados obtenidos al analizar la respuesta inmune humana y murina en contra de la paramiosina de la *Taenia solium* y posteriormente, se discutirán ciertos aspectos de la respuesta inmune celular en general.

Un hecho básico para el desarrollo de la presente tesis fue el aprovechamiento de técnicas de DNA recombinante. Previamente se habían obtenido, caracterizado y expresado clonas con la secuencia codificadora total de la TPmy (49). Estas clonas fueron usadas como templado para obtener por amplificación con PCR, las regiones codificadoras de los tres fragmentos y de la proteína completa (113, 114). La amplificación se realizó con oligonucleótidos sintéticos diseñados para amplificar solamente las regiones deseadas. Los oligonucleótidos tenían, además, un sitio de restricción (EcoRI o HindIII) para facilitar su posterior ligación a un vector de expresión (pRSET).

La decisión para usar este vector de expresión se debe, por un lado, a que posee un promotor viral de T7, capaz de inducir altos niveles de expresión de la proteína recombinante. Otra ventaja, es la facilidad y seguridad que ofrece el vector para controlar la expresión del promotor, lo que garantiza la rápida y segura expansión de las bacterias transformantes antes de la inducción. Finalmente, una ventaja más que ofrece el vector es que la proteína se expresa unida a un péptido de fusión con seis histidinas que permite la posterior purificación por cromatografía de afinidad (Apéndice 1).

La purificación de las proteínas recombinantes consistió básicamente en el aislamiento de los cuerpos de inclusión y su solubilización en un medio altamente desnaturalizante, aprovechando la afinidad del péptido de fusión hacia metales divalentes (Apéndice 1).

Se ha sugerido que la paramiosina induce protección contra infecciones parasitarias del ser humano. Se ha relacionado la respuesta inmune humana contra la paramiosina con

la resistencia a esquistosomosis o a oncocercosis. Además, con la paramiosina se ha generado protección contra las mismas infecciones helmínticas en el modelo murino; en la presente tesis se muestra que la TPmy induce protección contra el cisticerco de *Taenia crassiceps*. Como se puede ver con más detalle en la tabla 4 del apéndice 2, la protección va acompañada de una respuesta inmune tipo Th1.

Se observó que la respuesta humoral humana se dirige preferentemente contra el tercio carboxilo-terminal, siendo el tercio amino-terminal, pobremente reconocido y que en los ratones inmunizados ocurría el mismo fenómeno que en la infección natural humana. Como se discute con más detalle en la publicación, los anticuerpos de los individuos infectados con *Schistosoma japonicum*, también reconocen preferentemente al tercio carboxilo-terminal (72).

Es posible que el reconocimiento débil del tercio amino-terminal se deba a un bloqueo causado por la unión del C1q en la vecindad del cisticerco. En resultados no publicados se ha encontrado que en el tercio amino-terminal de la TPmy se concentra su capacidad para unirse al C1q del complemento. Es posible que en el individuo infectado, el C1q se encuentre unido al tercio amino-terminal de la TPmy resultando en una incapacidad del sistema inmune para reconocer a este tercio. Esto podría explicar por qué en dos sistemas (humano y ratón) y por dos métodos (Western blot y ELISA) el tercio amino-terminal es el menos reconocido.

Llama la atención el contraste entre el reconocimiento humoral del tercio amino-terminal y el tercio carboxilo-terminal, en el humano y el ratón. Ambos fragmentos tienen tercios con estructura al azar (random coil) y una gran porción en forma de una α -hélice superenrollada (12). Por lo cual no hay diferencias conformacionales obvias que sugieran que las diferencias en el reconocimiento por anticuerpos estén relacionadas con diferencias estructurales entre los dos tercios. Además, se empleó un programa que analiza secuencias de aminoácidos con el fin de encontrar el punto de mayor hidrofiliidad, lo que permite localizar determinantes antigénicos (37), y se pudo realizar ya que se conoce la secuencia de aminoácidos completa de la TPmy. El nivel de hidrofiliidad lo calcula asignándole a cada aminoácido un valor numérico (un valor de hidrofiliidad) y repetitivamente promedia esos valores evaluando segmentos de 6 residuos a lo largo de la cadena polipeptídica. La secuencia con valor promedio local más alto invariablemente corresponde, o está

inmediatamente adyacente, a un determinante antigénico. Usamos este programa para analizar la secuencia de la TPmy. El programa indicó que el principal determinante antigénico en la secuencia se localiza entre los residuos 489-494 (en el tercio central). En contraste, el principal determinante antigénico del tercio amino-terminal, mucho más débil que el anterior, se localiza entre los residuos 128-133. Estas predicciones correlacionan con los resultados encontrados en ratón, pero no con los de humano; ya que en el ratón, el tercio central y el tercio carboxilo-terminal fueron más reconocidos que el tercio amino; y en el humano, el tercio central fue poco reconocido. Tal vez, epítomos importantes localizados en el tercio central se desnaturalizan durante la inmunoelectrotransferencia. También, encontramos que la secuencia 767-772 (en el tercio carboxilo) tiene una baja probabilidad de ser un determinante antigénico; sin embargo, fue preferentemente reconocido en los dos modelos (humano y ratón) y en ambos sistemas (Western blot y ELISA).

También, se analizaron los isotipos de anticuerpos de los ratones inmunizados con el tercio amino-terminal, encontrándose dominancia de la subclase IgG1 sobre la IgG2a, lo cual sugiere un perfil de respuesta tipo Th2. Sin embargo, como se muestra en la *Tabla 4 del Apéndice 2*, esos ratones no mostraban producción de IL-4 antígeno-específica. A este respecto se ha publicado que existen dos tipos de IgG1; un tipo tiene actividad anafiláctica y es dependiente de IL-4. El otro tipo no tiene esta actividad, no es dependiente de IL-4 y su síntesis es estimulada por la IL-12 o por el IFN- γ (22). Además, se ha encontrado que si bien la respuesta policlonal de IgG1 se correlaciona con la presencia de IL-4, la respuesta antígeno-específica no se correlaciona (107). Por lo anterior, es posible que la IgG1 detectada pueda producirse de manera independiente a IL-4, o bien, solamente se produce IgG1 contra el tercio amino-terminal, aunque policlonalmente sea una respuesta Th1. Este isotipo de anticuerpos es similar al hallado en esquistosomiasis en donde también se detecta IgG1 al inmunizar los ratones con paramiosina de *S. mansoni* (85, 120).

Aunque, en las publicaciones incluidas en la presente tesis no se presenta detalle, vale la pena mencionar que la resistencia en la infección natural en humanos parece estar relacionada con la respuesta celular contra el tercio amino-terminal, ya que un mayor porcentaje de individuos sanos reaccionaron contra este tercio, en comparación con los infectados. Como también se describe en una de las publicaciones, es posible inducir 47-87% de protección por inmunización de ratones con el mismo tercio amino-terminal.

Además, se encontró que los linfocitos T de ratones inmunizados con la TPmy proliferan principalmente contra el mismo tercio amino-terminal (*ver* Tabla 3 *del* Apéndice 2). También se encontró que la respuesta inmune que induce este fragmento es tipo Th1, es decir, que tiene un fenotipo celular. Además, el perfil de proliferación de los individuos sanos que se muestra en la tabla 1 del apéndice 1 es muy similar a la del grupo murino control de la tabla 3 del apéndice 2; es decir, más humanos sanos respondieron al tercio amino-terminal y central que al tercio carboxilo-terminal y, de manera similar, el grupo control murino tiene mayor índice de proliferación al ser estimulado con el tercio amino-terminal y central que al ser estimulado con el tercio carboxilo-terminal. Por lo tanto, pareciera que el nivel de proliferación depende de la región de la proteína que se usa para estimular. Es posible que la respuesta inmune-celular en contra del tercio amino-terminal sea consecuencia de que éste puede unirse a la colágena. Existe un receptor con una región de estructura colagénica que se encuentra en macrófagos, el receptor “scavenger”. De hecho, alguna evidencia reciente de nuestro propio grupo indica que la TPmy interacciona con el receptor “scavenger”, siendo capaz de inducir la internalización de partículas de lipoproteínas de baja densidad (62). Se ha sugerido que los antígenos al unirse a este receptor son mejor presentados a los linfocitos T y son más inmunogénicos (1). Por lo tanto, el tercio amino-terminal puede tener una mayor capacidad unirse a una célula presentadora cómo el macrófago que el tercio carboxilo-terminal, explicando la mayor proliferación linfocitaria en ambos sistemas (humano y ratón). También, explica la relación entre la respuesta inmune celular y la protección (*ver* sección II. 10 y 86).

Con el objeto de identificar epítomos para células T, se empleó un programa con un algoritmo basado en el modelo de hélice anfipática (60), el cual postula que los sitios antigénicos son hélices con una “cara” predominantemente polar y la opuesta es una “cara” apolar. Por lo tanto, el algoritmo busca α -hélices y β -plegadas en una cadena peptídica. Al analizar la secuencia polipeptídica de la TPmy que es una proteína cuya secuencia de aminoácidos forma α -hélice, se encontró que la secuencia entre los residuos 720-751 (cerca del tercio carboxilo-terminal) tiene la mayor anfipatía, seguida por las secuencias 355-377 y 398-436 (en el tercio central) y posteriormente, la secuencia 57-67 (una secuencia amino-terminal). Sin embargo, estas regiones de la TPmy no se correlacionan con respuesta

celular observada en pacientes (Tabla 1 de Apéndice 1), ni en ratones inmunizados (Tabla 3 de Apéndice 2).

Analizamos el perfil de citocinas que liberaban los esplenocitos de manera inmune-específica al ser estimulados con el tercio protector, el tercio amino-terminal, detectándose la liberación de IL-2, IFN- γ , pero no de IL-4. En resultados no incluidos en las publicaciones, este perfil también se observa por RT-PCR, ya que se detectó la producción de mRNA de IFN- γ en más ratones inmunizados (4/5) que en ratones controles (2/4). Estas citocinas son propias de un tipo de respuesta Th1, similar a lo descrito previamente por otros grupos para *T. crassiceps* (ver II.8a).

También se realizó el análisis del fenotipo (CD4+ o CD8+) de los linfocitos T para determinar si una población dominante participaba en la protección. Sin embargo, los porcentajes obtenidos en los grupos experimentales y los controles no mostraron diferencias significativas ni en ratones sólo inmunizados, ni en ratones protegidos, ni en cultivos de esplenocitos estimulados con antígeno de ratones inmunizados. Estos resultados son similares a los encontrados en otras publicaciones en donde buscan qué linfocito T (CD4 o CD8) participa de forma dominante en el control la infección (16, 59, 69, 108). La evidencia indica que ambas poblaciones (CD4+ y CD8+) participan en la protección.

También, exploramos la duración de la protección, ya que no sabíamos cuanto tiempo pasaría entre la inmunización y el reto por lo tanto se infectó a los cinco, diez y quince días después de la última inmunización. A los quince días la protección desciende al 16% (datos no mostrados en esta tesis).

En la presente tesis se estudiaron las propiedades inmunológicas de una región de la TPmy que induce protección contra la cisticercosis murina (tercio amino-terminal) (Apéndice 2). Se detectó la liberación de IL-2, IFN- γ , pero no de IL-4 de manera antígeno-específica, en los ratones inmunizados con el tercio amino-terminal (ver Tabla 4 del Apéndice 2). Sin embargo, no se encontraron evidencias claras acerca de si los linfocitos CD4+ o los CD8+ participan en la protección. Finalmente, también se observó que la protección desaparece rápidamente. En este sentido, es necesario establecer un método de inmunización que prolongue la protección antes de realizar pruebas de campo.

En la tercera publicación (Apéndice 3) en que se compara la respuesta inmune celular de pacientes con neurocisticercosis con la respuesta inmune de individuos sanos, se

reporta que ambos responden de la misma forma; es decir que en pacientes con cargas parasitarias bajas no se detectan señales de inmunosupresión (ver Tabla I del Apéndice 3). Este resultado contrasta con varias publicaciones que muestran fenómenos de inmunosupresión en cerdos o ratones cisticercosos (ver II. 4). En otra publicación que analiza la respuesta inmune de pacientes humanos (14), además de la cisticercosis padecían otras enfermedades tales como: amibiasis, ascariasis, teniasis, asma, rinitis y alergias a alimentos. Es posible que estos pacientes posean una inmunodeficiencia que los hace más susceptibles a diferentes enfermedades, entre ellas, la cisticercosis. La idea del establecimiento de cisticercos en individuos con inmunodeficiencias ya ha sido sugerida anteriormente (14), quienes no especifican si los pacientes estaban siendo tratados con corticosteroides. Los corticosteroides se emplean en neurocisticercosis para controlar la sintomatología; además, los corticosteroides inhiben la proliferación de linfocitos T y la transcripción de genes de citocinas (105). Puesto que en 1984 se empleaban los corticosteroides (61) es posible que los pacientes incluidos en aquella publicación (14) hubieran sido tratados con corticosteroides, por lo que podrían estar inmunosuprimidos por el tratamiento; sin embargo, este efecto en el sistema inmune no permite explicar la presencia de las otras infecciones (amibiasis, ascariasis, teniasis, asma, rinitis y alergias a alimentos); por lo tanto, es posible que los pacientes poseyeran una inmunodeficiencia que los hiciera más susceptibles a diferentes enfermedades. En cambio, en nuestra publicación los pacientes no recibieron tratamiento inmunosupresor, cestocida, ni presentaban infecciones recurrentes. La inmunodeficiencia previa permite explicar las diferencias en la evidencia presentada en ambas publicaciones.

IX. CONCLUSIÓN

Hemos obtenido evidencia en el humano y el modelo experimental murino de cisticercosis por el metacéstodo de *T. crassiceps*, que permite sugerir que la respuesta inmune celular en contra de la región amino-terminal de la TPmy se correlaciona con resistencia y/o protección a la infección por el cisticerco. Se ha demostrado que este modelo experimental permite sugerir candidatos a vacuna contra la cisticercosis porcina (36, 58, 95). Debido a que es más plausible la aplicación de este antígeno en el hospedero porcino, es necesaria la realización de estudios piloto en cerdo antes de aplicar este antígeno al nivel de campo.

X. BIBLIOGRAFÍA

1. **Abraham R., N. Singh, A. Mukhopadhyay, S.K. Basu, V. Bal, and S. Rath.** 1995. Modulation of Immunogenicity and Antigenicity of Proteins by Maleylation to Target Scavenger Receptors on Macrophages. *J. Immunol.* **154**: 1-8
2. **Acevedo-Hernández A.** 1989. Epidemiología de la cisticercosis porcina, p. 251-253. *En*: Flisser A., y F. Malagón (ed.), *Cisticercosis humana y porcina. Su conocimiento e investigación en México.* Limusa. México.
3. **Aluja A.S.** 1982. Frequency of porcine cysticercosis in Mexico, pp 53-62. *En*: A. Flisser, K. Willms, J.P. Laclette, C. Larralde, C. Ridaura, and F. Beltrán (ed.), *Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives.* Academic Press. New York, U.S.A.
4. **Aluja, A.S., A. Escobar, F. Escobedo, A. Flisser, J.P. Laclette, C. Larralde, I. Madrazo, V. Velásquez, y K. Willms.** 1987. p. 20. *Cisticercosis: Una recopilación actualizada de los conocimientos básicos para el manejo y el control de la cisticercosis causada por Taenia solium.* Fondo de Cultura Económica, México D.F.
5. **Aluja A., and G. Vargas.** 1988. The histopathology of porcine cysticercosis. *Vet. Parasitol.* **28**:65-77
6. **Ambrosio J, Landa A., M.T. Merchant, and JP. Laclette.** 1994. Protein uptake by cysticerci of *Taenia crassiceps*. *Arch. Med. Res.* **25**: 325-330
7. **Asano K., A. Ito, and K. Okamoto.** 1993. The role of OX22' helper T cells in protective immunity to reinfection with *Taenia taeniaeformis* in rats. *Parasite. Immunol.* **15**:663-668
8. **Bojalil R., L.I. Terrazas, T. Govezensky, E. Sciutto, and C. Larralde.** 1993. Thymus-related celular immune mechanisms in sex associated resistance to experimental murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). *J. Parasitol.* **79**:384-389
9. **Cañedo L., J.P. Laclette, and E. Morales.** 1982. Evagination of the metacestode of *Taenia solium*, pp 363-374. *En*: A. Flisser, K. Willms, J.P. Laclette, C. Larralde, C. Ridaura, and F. Beltrán (ed.), *Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives.* Academic Press. New York, U.S.A.
10. **Cárdenas F., A. Plancarte, H. Quiroz, M.T. Rabiela, A. Gómez-Leal, D. Correa and A. Flisser.** 1989. Experimental model of intraocular cysticercosis. *Exp. Parasitol.* **69**: 324-329
11. **Chen H., T. Nara, X. Zeng, M. Satoh, G. Wu, W. Jiang, F. Yi, S. Kojima, S. Zhang, and K. Hirayama.** 2000. Vaccination of domestic pig with recombinant paramyosin against *Schistosoma japonicum* in China. *Vaccine* **18**:2142-2146.

12. Cohen C., and D.A.A. Parry. 1990. α -Helical Coiled Coils and Bundles: How to Design an α -Helical Protein. *PROTEINS: Structure, Function, and Genetics* 7:1-15.
13. Conraths F.J., H.W. Harnett, M.J. Worms, and R.M. Parkhouse. 1992. Immunological cross-reaction between an *Onchocerca* paramyosin-like molecule and a microfilaria surface antigen. *Trop. Med. Parasitol.* 43:135-138.
14. Correa D., A. Tovar, B. Espinoza, A. Plancarte, and A. Flisser. 1989. Cisticercosis humana: relación inmunológica huésped-parásito, pp 31-43. *En: A. Flisser y F. Malagón (ed.), Cisticercosis humana y porcina. Su conocimiento e investigación en México.* Limusa. México.
15. Correa-Oliveira R., E.J. Pearce, G.C. Oliveira, D.B. Golgher, Katz N., Bahia L.G., O.S. Carvalho, G. Gazzinelli, and A. Sher. 1989. The human immune response to defined immunogens of *Schistosoma mansoni*: elevated antibody levels to paramyosin in stool-negative individuals from two endemic areas in Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 83, 798-804
16. Cruz-Revilla C., G. Rosas, G. Fragoso, F. Lopez-Casillas, Toledo A., C. Larralde, and E. Sciutto. 2000. *Taenia crassiceps* cysticercosis: protective effect and immune response elicited by DNA immunization. *J. Parasitol.* 86: 67-74
17. Díaz S. 1983. Tesis de Maestría. Síntesis de anticuerpos en la reacción inflamatoria al cisticercosis de la *Taenia solium* en el músculo porcino. Facultad de Medicina. UNAM, México.
18. Díaz-Camacho S., Candil-Ruiz A., Uribe-Beltrán M. Y Willms K. 1989. Epidemiología de la teniasis/cisticercosis en una comunidad de Sinaloa. p 243. *En: Flisser A., y F. Malagón (ed.), Cisticercosis humana y porcina. Su conocimiento e investigación en México.* Limusa. México
19. Dixon H., and W. Hardgraves. 1944. A further ten years clinical study covering 248 cases. *Quart. J. Med.* 13: 107-121
20. Dixon H., and F. Lipscomb. 1961. Cysticercosis: An analysis and follow-up of 450 cases. Stationery office, Medical Research Council Special Reports Series, 229, 58: London
21. Espinoza B., G. Ruiz-Palacios, A. Tovar, M.A. Sandoval, A. Plancarte, and A. Flisser. 1986. Response in patients with neurocysticercosis and its application in immunodiagnosis. *J. Clin. Microbiol.* 24: 536-541
22. Faquim-Mauro E. L., L. Robert Coffman, I. A. Abrahamsohn, and M. S. Macedo. 1999. Cutting Edge: Mouse IgG1 Antibodies Comprise Two Functionally Distinct Types That Are Differentially Regulated by IL-4 and IL-12. activity and its synthesis is stimulated by IL-12 or IFN- γ . *J. Immunol.* 163: 3572-3576.

23. Flanigan T.P., C.H. King, R.R. Lett, J. Nanduri, and A.A. Mahmoud. 1989. Induction of resistance to *Schistosoma mansoni* infection in mice by purified parasite paramyosin. *J. Clin. Invest.* **83**: 1010-1014
24. Flisser A. 1988. Neurocysticercosis in México. *Parasitol. Today* **4**: 131-137
25. Flisser A. and M.W. Lightowers. 2001. Vaccination against *Taenia solium* Cysticercosis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* **96**: 353-356
26. Flisser A., I. Madrazo y H. Delgado. 1997. Epidemiología y control, pp 61-64. *En* Flisser A., I. Madrazo y H. Delgado. *Cisticercosis humana. Manual Moderno, México*
27. Flisser A., A. Plancarte, B. Espinoza, E. Woodhouse, L. Rivera, T. Trueba, V. Yakoleff-Greenhose, A. Sierra, J.P. Laclette, L. Cañedo, and C. Larralde. 1983. The immune state of patients with cysticercosis. *Afr. J. Clin. and Exp. Immunol.* **3**:183
28. Flisser A., E. Woodhouse, and C. Larralde. 1980. Human cysticercosis: antigens, antibodies and nonresponders. *Clin. Exp. Immunol.* **39**: 27-37
29. Freeman R. S. 1962. Studies on the biology of *Taenia crassiceps* (Zeder, 1800) Rudolphi, 1810 (cestoda). *Canadian Journal of Zoology* **40**: 969-991
30. Gazarian K.G., T.G. Gazarian, C.F. Solis, R. Hernandez, C.B. Shoemaker, and Laclette. J.P. 2000. Epitope mapping on N-terminal region of *Taenia solium* paramyosin. *Immunol. Lett.* **72**: 191-195
31. Gemmel M.A. and R. Lawson 1982. Ovin cysticercosis: An epidemiological model for the cysticercosis I. The free living phase, pp 87-98. *En*: A. Flisser, K. Willms, J.P. Laclette, C. Larralde, C. Ridaura, and F. Beltrán (ed.), *Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives.* Academic Press. New York, U.S.A.
32. Good A.H., Jr.A.E. Siebert, P. Robbins, and Zaun. S. 1982. Modulation of the host immune response by larvae *Taenia crassiceps*, pp 593-610. *En*: A. Flisser, K. Willms, J.P. Laclette, C. Larralde, C. Ridaura, and F. Beltrán (ed.), *Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives.* Academic Press. New York, U.S.A.
33. Guerra G., A. Flisser, L. Cañedo, and J.P. Laclette. 1982. Biochemical and immunological characterization of antigen B purified from cysticerci of *Taenia solium*, pp 437-452. *En*: A. Flisser, K. Willms, J.P. Laclette, C. Larralde, C. Ridaura, and F. Beltrán (ed.), *Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives.* Academic Press. New York, U.S.A.
34. Herrera L.A., P. Santiago, G. Rojas, P.M. Salazar, P. Tato, J.L. Molinari, D. Schiffmann, and P. Ostrosky-Wegman. 1994. Immune response impairment,

genotoxicity and morphological transformation induced by *Taenia solium* metacestode. Mutation. Res. 305: 223-228

35. Hirsch C., C. Carvalho-Queiroz, G.R. Franco, S.D. A.J. Pena, Simpson, and A.M. Goes. 1997. Evidentiation of paramyosin (Sm-97) as a modulating antigen on granulomatous hypersensitivity to *Schistosoma mansoni* eggs. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 92: 663-667
36. Huerta M., de Aluja A.S., Fragoso G., Toledo A., Villalobos N., Hernandez M., Gevorkian G., Acero G., Diaz A., Alvarez I., Avila R., Beltran C., Garcia G., Martinez J.J., Larralde C., and E. Sciutto. 2001. Synthetic peptide vaccine against *Taenia solium* pig cysticercosis: successful vaccination in a controlled field trial in rural Mexico. Vaccine 12;20: 262-266
37. Hoop T.P., and K.R. Woods. 1981. Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:3824-3828
38. Ito A., T. Takami, and M. Itoh. 1991. Vaccine effect of intact metacestodes of *Taenia crassiceps* against *T. taeniaeformis* infection in rats. Am. J. Trop. Med. Hyg. 44:696-701
39. Johnson K.S., G.B. Harrison, M.W. Lightowers, K.L. O'Hoy, W.G. Cogle, R.P. Dempster, S.B. Lawrence, J.G. Vinton, D.D. Heath, and M.D. Rickard. 1989. Vaccination against ovine cysticercosis using a defined recombinant antigen. Nature. 338: 585-587
40. Kojima S., T. Janecharut, H. Hata, and M. Niimura. 1987. Role of a mouse monoclonal IgE antibody in passive transfer of immunity to *Schistosoma japonicum* infection. Mem. Inst. Oswaldo Cruz Rio J. 82: 237-241
41. Laclette J.P., A. Alagon, K. Willms, and A. Torre-Blanco. 1990. Purification of antigen B from *Taenia solium* Cysticerci by affinity to Mammalian collagen. J. Parasitol. 76: 273-275
42. Laclette J.P., A. Landa, L. Arcos, K. Willms, A.E. Davis, and C.B. Shoemaker. 1991. Paramyosin is the *Schistosoma mansoni* (Trematoda) homologue of antigen B from *Taenia solium* (Cestoda). Mol. Biochem. Parasitol. 44: 287-295
43. Laclette J.P., M.T. Merchant, and K. Willms. 1987. Histological and ultrastructural localization of antigen B in the metacestode of *Taenia solium*. J. Parasitol. 73: 121-129.
44. Laclette J.P., Y. Ornelas, M.T. Merchant, and K. Willms. 1982. Ultrastructure of surrounding envelopes of *Taenia solium* eggs, pp 375-388. En: A. Flisser, K. Willms, J.P. Laclette, C. Larralde, C. Ridaura, and F. Beltrán (ed.), Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives. Academic Press. New York, U.S.A.

45. **Laclette J.P., M. Rodriguez, A. Landa, Arcos L., de Alba P., Mancilla R., and K. Willms.** 1989. The coexistence of *Taenia solium* cysticerci and the pig: Role of antigen B. *Acta Leidensia* **57**:115-122
46. **Laclette J.P., C.B. Shoemaker, D. Richter, L. Arcos, N. Pante, C. Cohen, D. Bing, and A. Nicholson-Weller.** 1992. Paramyosin inhibits complement C1. *J. Immunol.* **148**: 124-128
47. **Laclette J.P., P.J. Skelly, M.T. Merchant, and C.B. Shoemaker.** 1995. Aldehyde fixation dramatically alters the immunolocalization pattern of paramyosin in platyhelminth parasites. *Exp. Parasitol.* **81**: 140-143
48. **Lanar D.E., E.J. Pearce, S.L. James, and A. Sher.** 1986. Identification of paramyosin as schistosome antigen recognized by intradermally vaccinated mice. *Science.* **234**: 593-596
49. **Landa A., J.P. Laclette, Nicholson-Weller A., and C.B. Shoemaker.** 1993. cDNA cloning and recombinant expression of collagen-binding and complement inhibitor activity of *Taenia solium* paramyosin (AgB). *Mol. Biochem. Parasitol.* **60**: 343-347
50. **Letonja T., C. Hammemberg, and G. Schurig.** 1987. Evaluation of spleen lymphocyte responsiveness to a T-cell mitogen during early infection with larval *Taenia taeniaformis*. *Parasitol. Res.* **73**: 265-270
51. **Li B.W., R. Chandrashekar, R.M. Alvarez, F. Liftis, and G.J. Weil.** 1991. Identification of paramyosin as a potential protective antigen against *Brugia malayi* infection in jirds. *Mol. Biochem. Parasitol.* **49**: 315-324
52. **Li B.W., R. Chandrashekar, and G.J. Weil.** 1993. Vaccination with recombinant filarial paramyosin induces partial immunity to *Brugia malayi* infection in jirds. *J. Immunol.* **150**: 1881-1885
53. **Lightowers M.W.** 1989. Recent advances in vaccination against cysticercosis. *Acta Leiden.* **57**: 135-142
54. **Lightowers M.W.** 1990. Cestode infections in animals: immunological diagnosis and vaccination. *Rev. Sci. Tech.* **9**: 463-487.
55. **Lightowers M.W., Flisser A., Gauci C.G., Heath D.D., Jensen O.** 2000. Rolfe R. Vaccination against cysticercosis and hydatid disease. *Parasitol. Today* **16**: 191-196
56. **Lumsden R.D.** 1966. Cytological studies on the absorptive surface of cestode. II. The synthesis and intracellular transport of protein in the strobilar integument. *Zeitschr. Parasitenk.* **28**: 1-13
57. **Mandujano A., and D. Correa.** 1992. Presence of an Fc binding molecule in *Taenia solium* cysticerci, p. 2,104. *En: Tharavanij S., Fungladda W., Kuhsmith S., Pruekwatana O.* (ed.), XIIIth International congress for Tropical medicine and malaria.

58. Manoutcharian K., G. Rosas, M. Hernandez, G. Fragoso, A. Aluja, N. Villalobos, L.F. Rodarte, and E. Sciutto. 1996. Cysticercosis: identification and cloning of protective recombinant antigens. *J. Parasitol.* **82**: 250-254
59. Manoutcharian K., L.I. Terrazas, G. Gevorkian, G. Acero, P. Petrossian, M. Rodriguez, and T. Govezensky. 1999. Phage-displayed T-cell epitope grafted into immunoglobulin heavy-chain complementarity-determining regions: an effective vaccine design tested in murine cysticercosis. *Infect. Immun.* **67**: 4764-4770
60. Margalit H., J.L. Spouge, J.L. Cornette, K.B. Cease, C. Delisi, and J.A. Berzofsky. 1987. Prediction of immunodominant helper T cell antigenic sites from the primary sequence. *J. Immunol.* **138**: 2213-2229
61. Markwalder K., Hess K., Valavanis A., and F. Witassek. 1984. Cerebral cysticercosis: treatment with praziquantel. Report of two cases. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **33**: 273-280
62. Mas-Oliva J., G. Velasco-Loyden, C. Solís, and J.P. Laclette. The geometric control of receptor mediated endocytosis. *Sometido.*
63. Molinari J.L., R. Meza, B. Suarez, S. Palacios, and P. Tato. 1983. *Taenia solium*: immunity on hogs to the cysticercus. *Exp. Parasit.* **55**: 340-357
64. Molinari J.L., R. Meza, and P. Tato. 1983. *Taenia solium*: Cell reactions to the larva (*Cysticercus cellulosae*) in naturally parasitized, immunized hogs. *Exp. Parasit.* **56**: 327-338
65. Molinari J.L., R. Soto, P. Tato, D. Rodriguez, A. Retana, J. Sepulveda, and A. Palet. 1993. Immunization against porcine cysticercosis in an endemic area in Mexico: a field and laboratory study. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **49**: 502-512
66. Molinari J.L., P. Tato, T. Aguilar, and A. Palet. 1988. Immunity in mice to an oncosphere infection by using oncospherical antigens from *Taenia solium* or *Taeniarhynchus saginatus*. *Rev. Latino-am. Microbiol.* **30**: 325-333
67. Molinari J.L., P. Tato, O.A. Reynoso, and J.M. Cazares. 1990. Depressive of a *Taenia solium* cysticercus factor on culture human lymphocytes stimulated with phytohaemagglutinin. *Ann. Trop. Med. and Parasit.* **84**: 205-208
68. Molinari J.L., P. Tato, and Y. Valles. 1987. Helper T lymphocytes depressed by *Cysticercus cellulosae* in immunized and control hogs. *Rev. Latinoam. Microbiol.* **29**: 293-300
69. Mooney K.A., R.J. Spolski, E.J. See, and R.E. Kuhn. 2000. Immune destruction of larval *Taenia crassiceps* in mice. *Infect. Immun.* **68**: 2393-23401

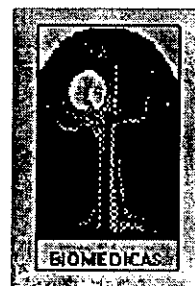
70. **Nanduri J., and J.W. Kazura.** 1989. Paramyosin-enhanced clearance of *Brugia malayi* microfilaremia in mice. *J Immunol.* **143:** 3359-3363
71. **Nara T., N. Matsumoto, T. Janecharut, H. Matsuda, K. Yamamoto and T. Kojima.** 1994. Demonstration of the target molecule of a protective IgE antibody in secretory glands of *Schistosoma japonicum* larvae. *Int. Immunol.* **6:** 963-971
72. **Nara T, Tanabe K, Mahakunkijcharoen Y, Osada Y, Matsumoto N, Kita K, Kojima S.** 1997. The B cell epitope of Paramyosin recognized by a protective monoclonal IgE antibody to *Schistosoma japonicum* . *Vaccine* **15:** 79-84
73. **Nascimento E., J.O. Costa, M.P. Guimaraes, and C.A. Tavares.** 1995. Effective immune protection of pigs against cysticercosis. *Vet Immunol. Immunopathol.* **45:**127-137
74. **Oaks J., and R.D. Lumsden.** 1971. Cytological studies on the absorptive surface of cestodes. V. Incorporation of carbohydrate containing macromolecules into tegument membranes. *J. Parasitol.* 1256-1268
75. **Pathak K.M.L., and S.N.S. Gaur.** 1990. Immunization of pigs with culture antigens of *Taenia solium*. *Vet. Parasit.* **34:** 353-356
76. **Pearce E.J., S.L. James, J. Dalton, A. Barrall, C. Ramos, M. Strand, and A. Sher.** 1986. Immunochemical 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.* **137:** 3593-35600
77. **Pearce E.J., S.L. James, S. Hieny, D.E. Lanar, and A. Sher.** 1988. Induction of protective immunity against *Schistosoma mansoni* by vaccination with schistosome paramyosin (Sm97), a nonsurface parasite antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85:** 5678-5682
78. **Plancarte A., A. Flisser, C.G. Gauci and M.W. Lightowers.** 1999. Vaccination against *Taenia solium* cysticercosis in pigs using native and recombinant oncosphere antigens. *Int. J. Parasitol.* **29:** 643-647
79. **Plancarte A., A. Flisser, and C. Larralde.** 1982. Fibronectin-like properties of antigen B from cysticerci of *Taenia solium*, pp 453-464. *En:* A. Flisser, K. Willms, J.P. Lacleste, C. Larralde, C. Ridaura, and F. Beltrán (ed.), *Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives.* Academic Press. New York, U.S.A.
80. **Rabiela M.T.** 1989. Cisticercosis humana: relación inmunológica huésped parásito, p. 107-123. *En:* Flisser A., y F. Malagón (ed.), *Cisticercosis humana y porcina. Su conocimiento e investigación en México.* Limusa. México
81. **Ramirez B.L., J.D. Kurtis, P.M. Wiest, P. Arias, F. Aligui, L. Acosta, P. Peters, and G.R. Olds.** 1996. Paramyosin: a candidate vaccine antigen against *Schistosoma japonicum*. *Parasite. Immunol.* **18:** 49-52

82. **Ramírez-Bon E., M.T. Merchant, M. Gonzalez-Del pliego and L. Cañedo.** 1982. Ultrastructure of the bladder wall worm of the metacestode of *Taenia solium*, pp 261-280. *En:* A. Flisser, K. Willms, J.P. Lacleste, C. Larralde, C. Ridaura, and F. Beltrán (ed.), Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives. Academic Press. New York, U.S.A.
83. **Rickard M.D.** 1982. Immunization against infection with larval taeniid cestodes, p. 633-646. *En:* A. Flisser, K. Willms, J.P. Lacleste, C. Larralde, C. Ridaura, and F. Beltrán (ed.), Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives. Academic Press. New York, U.S.A.
84. **Richter D., and D.A. Harn.** 1993. Candidate vaccine antigens identified by antibodies from mice vaccinated with 15- or 50-Kilorad-irradiated cercariae of *Schistosoma mansoni*. *Infect. Immun.* **61:** 146-154
85. **Richter D., Incani R.N., and D.A. Harn..** 1993. Isotype responses to candidate vaccine antigens in protective sera obtained from mice vaccinated with irradiated cercariae of *Schistosoma mansoni*. *Infect. Immun.* **61:** 3003-3011.
86. **Richter D., S.R. Reynolds, and D.A. Harn.** 1993. Candidate vaccine antigens that stimulate the cellular immune response of mice vaccinated with irradiated cercariae of *Schistosoma mansoni*. *J. Immunol.* **151:** 256-265
87. **Robinson P., R.L. Atmar, D.E. Lewis, and A.C.Jr. White.** 1997. Granuloma cytokines in murine cysticercosis. *Infect. Immun.* **65:** 2925-2931.
88. **Rodriguez-Carbajal J., A. Flisser, F. Rubio-Donnadieu, A. Escobar-Izquierdo, and F. Escobedo.** 1988. Human cysticercosis in México. *Gac. Med. Mex.* **124:** 191-208
89. **Sarti E.J., P.M. Schantz, R. Lara, H. Gómez and A. Flisser.** 1988. *Taenia solium* taeniasis and cysticercosis in a Mexican village. *Trop. Med. Parasitol.* **39:** 194-198.
90. **Sarti E., P.M. Schantz, A. Plancarte, M. Wilson, I.O. Gutiérrez , J. Aguilera, J. Roberts and A. Flisser.** 1994. Epidemiologic investigation of *Taenia solium* taeniasis and cysticercosis in a rural village of Michoacan State, Mexico. *Trans. Royal. Soc. Trop. Med. Hyg.* **88:** 49-52
91. **Sarti E., P.M. Schantz, A. Plancarte, M. Wilson, I.O. Gutiérrez , A.S. López, J. Roberts and A. Flisser.** 1992. Prevalence and risk factor for *Taenia solium* taeniasis and cysticercosis in humans and pigs in a village in Morelos, Mexico. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **46:** 677-684
92. **Schantz P.M., A. Moore, J.L. Muñoz, B. Hartman, J. Schaefer, A. Aron, D. Persaud, E. Sarti, M. Wilson and A. Flisser.** 1992. Neurocysticercosis in an orthodox jewish community in New York City. *NEJM* **327:** 692-695

93. **Schantz P.M., E. Sarti, A. Plancarte, M. Wilson, J.L. Criales, J. Roberts and A. Flisser.** 1994. Community-based epidemiological investigations of cysticercosis due to *Taenia solium*: comparison of serological screening tests and clinical findings in two populations in Mexico. *Clin. Infect. Dis.* **18**: 879-885
94. **Sciutto E.** 1990. Aportaciones de la cisticercosis murina experimental por *Tenia crassiceps* al conocimiento de los factores biológicos que participan en la susceptibilidad a la infección por metacéstodos y al diagnóstico y prevención de la cisticercosis por *Taenia solium*. p. 234. Tesis de Doctorado. UNAM, México.
95. **Sciutto E., A. Aluja, G. Fragoso, L.F. Rodarte, M. Hernandez, M.N. Villalobos, A. Padilla, N. Keilbach, M. Baca, T. Govezensky, et al.** 1995. Immunization of pigs against *Taenia solium* cysticercosis: factors related to effective protection. *Veterinary Parasitology* **60**: 53-67
96. **Sciutto E., G. Fragoso, M. Baca, V. De la Cruz, L. Lemus, and E. Lamoyi.** 1995. Depressed T-cell proliferation associated with susceptibility to experimental *Taenia crassiceps* infection. *Infect. Immun.* **63**: 2277-2281
97. **Sciutto E, G. Fragoso, M.L. Diaz, F. Valdez, R.M. Montoya, T. Govezensky, C. Lomeli, and C. Larralde.** 1991. Murine *Taenia crassiceps* cysticercosis: H-2 complex and sex influence on susceptibility. *Parasitology Research* **77**: 243-246
98. **Sciutto E., G. Fragoso, L. Trueba, D. Lemus, R.M. Montoya, M.L. Diaz, T. Govezensky, C. Lomeli, G. Tapia, and C. Larralde.** 1990. Cysticercosis vaccine: cross protecting immunity with *Taenia solium* antigens against experimental murine *T. crassiceps* cysticercosis. *Parasite Immunology* **12**: 687-696
99. **Sealey M., and L. Ortiz-Ortiz.** 1982. Cellular immunity in cysticercosis: a review, pp 565-574. *En*: A. Flisser, K. Willms, J.P. Lacleste, C. Larralde, C. Ridaura, and F. Beltrán (ed.), *Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives*. Academic Press. New York, U.S.A.
100. **Shankar S.K., V. Ravi, V. Suryanarayana, A. Chandramukhi, and B.V. Ravikumar.** 1995. Immunoreactive antigenic sites of *Cysticercus cellulosae* relevant relevant to human neurocysticercosis-immunocytochemical localization using human CSF as source of antibody. *Clin-Neuropathol.* **14**:33-36
101. **Sher A., E. Pearce, S. Hieny, and S. James.** 1986. 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.* **136**: 3878-3883
102. **Silverman P.** 1954. Studies on the biology on some tapeworms of the genus *Taenia*. I. Factors affecting hatching and of taeniid ova, and some criteria of their viability. *Ann. Trop. Med. and Parasitol.* **48**: 207.

103. Spolski R.J., J. Corson, P.G. Thomas, and R.E. Kuhn. 2000. Parasite-secreted products regulate the host response to larval *Taenia crassiceps*. *Parasite Immunol.* **22**: 297-305
104. Steel C., R.J. Limberger, L.A. McReynolds, E.A. Ottesen, and T.B. Nutman. 1990. B cell responses to paramyosin. Isotypic analysis and epitope mapping of filarial paramyosin in patients with onchocerciasis. *J. Immunol.* **145**: 3917-3923
105. Suthanthiran M., R.E. Morris, and T.B. Strom. 1996. Immunosuppressants: cellular and molecular mechanisms of action. *Am. J. Kidney Dis.* **28**:159-172
106. Tato P., Y. Valles, and J.L. Molinari. 1987. Effect of immunization in immunodepressed hogs naturally parasitized with *Cysticercus cellulosae*. *Rev. Latinoam. Microbiol.* **29**: 67-71
107. Taylor C.E. 1995. Cytokines as Adjuvants for Vaccines: Antigen-Specific Responses Differ from Polyclonal Responses. *Infect. Immun.* **63**: 3241-3244
108. Terrazas L.I., R. Bojalil, T.Govezensky, and C. Larralde. 1998. Shift from an early protective Th1-type immune response to a late permissive Th2 response in murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). *J. Parasitol.* **84**: 74-81
109. Terrazas L.I., M. Cruz, M. Rodriguez-Sosa, R. Bojalil, F. Garcia-Tamayo, and C. Larralde. 1999. Th1-type cytokines improve resistance to murine cysticercosis caused by *Taenia crassiceps*. *Parasitol. Res.* **85**: 135-141
110. Toenjes S.A., Spolski R.J., Mooney K.A., and R.E.Kuhn. 1999. The systemic immune response of BALB/c mice infected with larval *Taenia crassiceps* is a mixed Th1/Th2-type response. *Parasitology* **118**: 623-633
111. Toledo A., C. Larralde, G. Fragoso, G. Gevorkian, K. Manoutcharian, M. Hernandez, G. Acero, G. Rosas, F. Lopez-Casillas, C.K. Garfias, R. Vazquez, I. Terrazas, and E. Sciutto. 1999. Towards a *Taenia solium* cysticercosis vaccine: an epitope shared by *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* protects mice against experimental cysticercosis. *Infect. Immun.* **67**: 2522-2530
112. Trimble J., and R.D. Lumsden. 1975. Cytochemical characterization of tegument membrane associated carbohydrates in *Taenia crassiceps* larvae. *J. Parasitol.* **61**: 665-676
113. Vázquez-Talavera J. 1993. *En* Distribución de epítopes para células B de un antígeno inmunodominante en la cisticercosis humana. Tesis de Licenciatura. UNAM.
114. Vázquez-Talavera J. 1996. *En* Distribución de epítopes para células T y B en el antígeno B de la *Taenia solium*, Tesis de Maestría. UNAM.
115. Velasco-Suárez M., M.A. Bravo, and F. Quirasco. 1982. Human cysticercosis: medical implication and economic impact, pp 47-52. *En*: A. Flisser, K. Willms, J.P. Lacleste, C. Larralde, C. Ridaura, and F. Beltrán (ed.), *Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives*. Academic Press. New York, U.S.A.

116. **Villa O.F., and R.E. Kuhn.** 1996. Mice infected with the larvae of *Taenia crassiceps* exhibit a Th2-like immune response with concomitant anergy and downregulation of Th1-associated phenomena. *Parasitology*. **112**: 561-570
117. **Williams J.F., P.G. Engelkirk, and Lindsay. MC.** 1982. Mechanisms of immunity in rodent cysticercosis, pp 621-632. *En*: A. Flisser, K. Willms, J.P. Lacleste, C. Larralde, C. Ridaura, and F. Beltrán (ed.), *Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives*. Academic Press. New York, U.S.A.
118. **Wisnewski A.V., and T.F. Kresina.** 1995. Induction of protective immunity to schistosomiasis with immunologically cross-reactive *Lumbricus* molecules. *Int. J. Parasitol.* **25**: 503-510
119. **Woodhouse E., A. Flisser, and C. Larralde.** 1982. Seroepidemiology in human cysticercosis in Mexico, pp 11-24. *En*: A. Flisser, K. Willms, J.P. Lacleste, C. Larralde, C. Ridaura, and F. Beltrán (ed.), *Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives*. Academic Press. New York, U.S.A.
120. **Yang W., G.J. Waine, and D.P. McManus.** 1995. Antibodies to *Schistosoma japonicum* (Asian bloodfluke) paramyosin induced by nucle acid vaccination. *Biochem Biophys Res Commun* **212**: 1029-1039
121. **Zhou S., S. Liu, G. Song, Y. Xu, and W. Sun.** 2000. Protective immunity induced by the full-length cDNA encoding paramyosin of Chinese *Schistosoma japonicum*. *Vaccine* **18**: 3196-3204



PARASITE IMMUNOLOGY

*Edited by G.A.T. Targett, London School of Hygiene and Tropical Medicine and
D. Wakelin, University of Nottingham*

Please reply to:
25 John Street,
London WC1N 2BS
UK

Tel: 020 7404 4101
Fax: 020 7831 6745

DR Juan Lacleste
Department of Immunology
Instituto de Investigaciones Biomedicas
UNAM
A.P.70228
04510 Mexico D.F.
Mexico

12th July 2001

Dear Dr Lacleste

Re: 00/92 - Human T & B cell epitope mapping of Taenia solium paramyosin


Thank you for resubmitting your paper to the journal.

I am pleased to say that it has now been accepted for publication and the proofs will follow from the Publishers in due course. It will be appreciated if these are dealt with promptly and accurately.

Please can you return one of the enclosed copyright forms and your paper on disc as soon as possible.

Yours sincerely



 Professor D Wakelin
Editor

Parasite Immunology, 2001, 23: 1–6

Human T and B cell epitope mapping of *Taenia solium* paramyosin

JOSÉ VÁZQUEZ-TALAVERA¹, CARLOS F. SOLÍS¹, EDITH MEDINA-ESCUZIA², ZOILA MORALES LÓPEZ³,
JEFFERSON PROAÑO³, DOLORES CORREA² & JUAN PEDRO LACLETTE¹

¹Department of Immunology, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, México, ²Department of Biotechnology, Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos, SSA and ³Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, México

SUMMARY

Taenia solium paramyosin is an immunodominant antigen in human and porcine cysticercosis that has shown promise as a vaccine candidate against schistosomiasis and some filariasis. There are few studies to identify the immunologically relevant regions of paramyosin. In this work, we characterize the humoral and cellular response of neurocysticercotic patients against *T. solium* paramyosin. Western blots using different recombinant fragments of *T. solium* paramyosin, showed that the sera from neurocysticercotic patients were strongly reactive against the carboxyl end region, with poor recognition of the central and amino regions. In contrast, the cellular immune response of patients did not show preferential recognition of any region of TPmy.

PARAMYOSIN

Keywords paramyosin, *Taenia solium*, cysticercosis, epitope mapping

INTRODUCTION

Paramyosin (Pmy) is a filamentous, α -helical, coiled-coil protein of approximately 100 kDa that is present in the muscle of invertebrates, including some flatworms that are parasites of human and domestic animals, such as *Schistosoma mansoni* (1), *Schistosoma japonicum* (2), *Taenia solium* (3) and *Echinococcus granulosus* (4). Paramyosins from different parasites have several immunological properties. *T. solium* paramyosin (TPmy) is an immunodominant antigen in human and porcine cysticercosis (5). Paramyosin has also been characterized as a modulating antigen on granulomatous hypersensitivity to *S. mansoni* eggs (6). Sera from patients with onchocerciasis from Guatemala and Ghana show antibody recognition to paramyosin (7). In *Wuchereria bancrofti*-parasitized individuals, the presence of paramyosin-reactive immunoglobulin (Ig)G4 is associated with the presence of parasites (8). Using peripheral blood mononuclear cells from individuals living in an endemic area for schistosomiasis japonica, paramyosin stimulated cellular proliferation in 38.5% of subjects, which is close to the 51.3% induced by a soluble whole parasite extract (9).

Paramyosin has shown promise as a vaccine candidate antigen against *S. mansoni* (6,10), *S. japonicum* (11,12) and *Brugia malayi* (13). In addition, paramyosin from *T. solium* inhibits the classical pathway of complement through inhibition of C1 function (3).

There are few studies to identify the immunologically relevant regions of these protective proteins. In this regard, epitope-mapping studies carried out with sera from patients infected with *S. japonicum* revealed a dominant recognition of the carboxyl-termini of the molecule (14). Similar results were obtained using sera from mice immunized with TPmy (not shown). However, in the case of sera from patients infected by *Dirofilaria immitis*, the dominant recognition was the amino terminus (7).

Here, we report that the humoral immune response of neurocysticercotic patients against paramyosin is highly

Correspondence: J.P. Laclette, Department of Immunology, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM., A.P. 70228, 04510 México D.F., México (e-mail: laclette@servidor.unam.mx).

Received: 5 October 2000

Accepted for publication: 12 July 2001

biased towards the carboxyl region, whereas the cellular response shows no preferential recognition.

MATERIALS AND METHODS

Patients sera

Fifty human sera from neurocysticercotic individuals, collected during fieldwork in endemic areas, were kindly provided by K. Willms. All these sera were positive against a crude extract of cysticerci through an immune assay with 85% sensitivity and 100% specificity (15). Five sera from patients with *Mycobacterium tuberculosis* and five sera from patients with *Entamoeba histolytica* were kindly provided by L. Ortíz-Ortíz.

Mononuclear cells

Mononuclear cells were obtained from other 24 adult patients with neurocysticercosis, recruited between between January 1996 and August 1998 in the Hospital de Especialidades, CMN siglo XXI. All patients had cysticerci within the brain parenchyma, subarachnoid or ventricular spaces, or in various sites (mixed). Diagnosis and localization was confirmed by magnetic resonance and computerized tomography and supported by a search for specific antibodies by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and Western blot in serum and cerebrospinal fluid (15,16). The selected group of patients had not received treatment with cestocide or immunosuppressive drugs before blood samples were obtained. A control group

of 24 individuals within the same age range and gender ratio was chosen from healthy volunteers from the same endemic areas. Twenty milliliters of blood samples were collected from patients and healthy individuals by venopuncture in sterile Vacutainer tubes containing heparin as anticoagulant. Peripheral blood mononuclear cells were isolated by centrifugation over Histopaque density gradients (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA). After separation, cells were washed with Hank's balanced solution (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA) and resuspended in RPMI-1640 medium (Gibco BRL), supplemented with 15% heat inactivated bovine fetal serum (HyClone Laboratories, Inc., Logan, UT, USA), 50 mM 2-mercaptoethanol, 200 mM L-glutamine, 100 µ/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 0.1 mM nonessential amino acids and 1% antimycotic (PPLO; Gibco BRL). Cell viability was assessed by the trypan blue exclusion test.

***T. solium* paramyosin**

TPmy was purified from *T. solium* cysts by affinity to collagen as described previously (3). A series of constructs derived from the full length coding sequence of TPmy (17) were designed to express recombinant fragments approximately corresponding to thirds of the total length of TPmy. The selected coding regions were amplified by polymerase chain reaction and cloned with the appropriate reading frame into the pRSET vector (Invitrogen, Co., San Diego, CA, USA). *E. coli* JM109 bacterial strain was transformed with each construct and induced in culture for the expression of recombinant TPmy and its fragments,

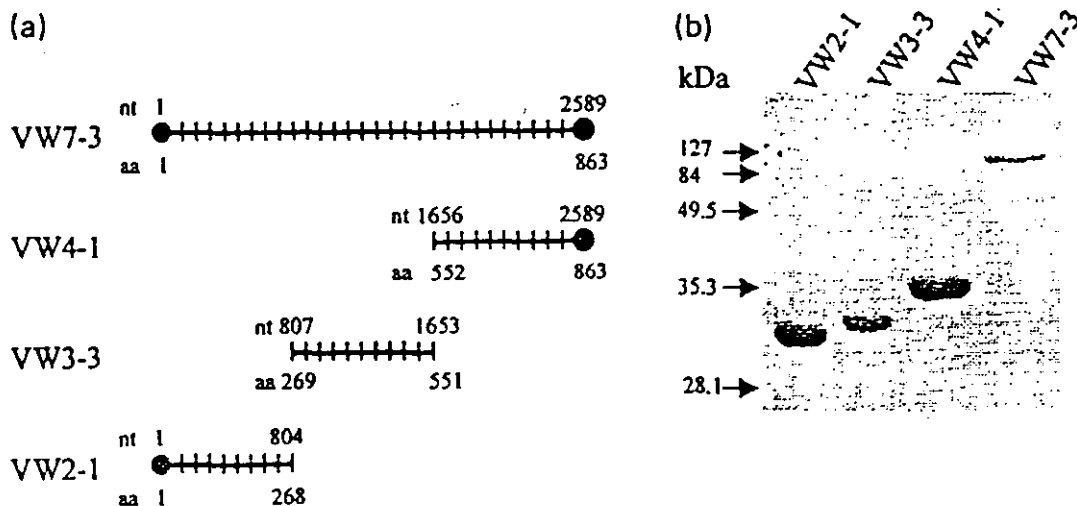


Figure 1 Recombinant products of *Taenia solium* paramyosin used in this study. (a) Schematic representation; nucleotide (nt) and amino acid (aa) positions are indicated by numbers based on the full-length sequence. (b) SDS-PAGE analysis showing purified recombinant products of TPmy: 1, VW2-1; 2, VW3-3; 3, VW4-1; 4, VW7-3.

Volume 23, Number 000, March 2001

T and B cell epitope mapping of TPmy

following the recommendations from the manufacturer. Bacteria were harvested 4–6 h postinduction and inclusion bodies were purified and solubilized in 5 M guanidine hydrochloride. The TPmy recombinant proteins were expressed as fusion products with an amino terminal 46 amino acid peptide, including a 6-histidine tag used for high affinity chromatography purification through HiTrap chelating columns (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA). The purified recombinant proteins were exhaustively dialysed against 0.5 M NaCl, pH 7.3 and the protein concentration determined using the Bradford protein assay (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). The full-length paramyosin contains amino acids 1–863 (VW7-3); the amino terminal fragment contains amino acids 1–268 (VW2-1); the central fragment contains amino acids 269–551 (VW3-3) and the carboxyl terminal fragment contains amino acids 552–863 (VW4-1). All fractions were analysed by SDS-PAGE (Figure 1).

Antibody recognition of the recombinant fragments of TPmy

To evaluate the recognition of different regions of TPmy by antibodies from neurocysticercotic patients, Western blots were carried out with 35 human serum samples. 5 µg of each recombinant fragment (VW7-3, VW2-1, VW3-3 and VW4-1) were electrophoresed and blotted onto nitrocellulose paper and blocked with 5% skimmed milk in phosphate-buffered saline (PBS). Strips of nitrocellulose were incubated for 1 h at 25°C with each serum diluted 1 : 500 in PBS plus skimmed milk, washed with PBS plus 0.05% Tween 20 and incubated for 1 h with rabbit anti-human IgG antibody conjugated to horseradish peroxidase (Zymed Laboratories, San Francisco, CA, USA) diluted

1 : 500 in PBS plus skimmed milk, at room temperature. The reaction was developed with 0.5 mg/ml of DAB (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride) plus 0.1 µl/ml of fresh 30% hydrogen peroxide. Similar Western blots were carried out with sera from healthy individuals, as well as sera from patients with amebiasis and tuberculosis.

Proliferation assays

Proliferation assays of human mononuclear cells were carried out by quintuplicate in 96-well flat-bottom microtitre plates (COSTAR, Cambridge, MA, USA) at 300 000 cells per well and incubated with supplemented RPMI-1640 medium in the presence of Con A (5 µg/ml), TPmy (3.5 µg/ml), or VW2-1, VW3-3 or VW4-1 (1.75 µg/ml), in a final volume of 200 µl/well. Negative controls did not contain antigen. Cells were incubated at 37°C in 95% humidity, 5% CO₂ for 96 h. 1 µCi/well of [methyl-³H]-thymidine (Pharmacia Biotech) was added to the cultures and incubated for the final 18-h period. Cells were harvested in glass fibre filters and processed for scintillation counting. The proliferation index was calculated dividing the mean counts per min (c.p.m.) of experimental wells by the mean c.p.m. of the wells with cells cultured in medium alone.

RESULTS AND DISCUSSION

Paramyosins form dimers with the two amino acid chains running in the same direction to make the coiled-coil. This homodimeric structure allowed our approach for epitope mapping, using recombinant fragments of TPmy, corresponding approximately to thirds of the full length molecule (Figure 1). Mapping of B cell epitopes was

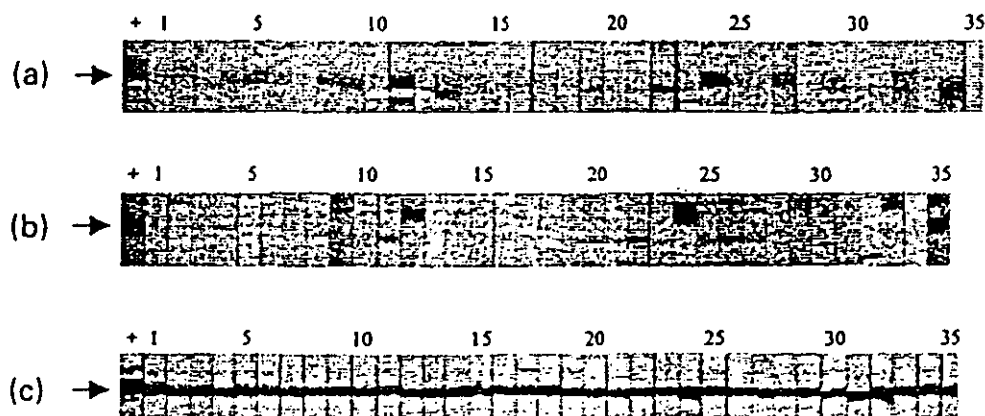


Figure 2 Human antibody recognition of the recombinant fragments of *Taenia solium* paramyosin. Sera from neurocysticercotic patients (1–35) were tested by Western blot against: (a) VW2-1, (b) VW3-3 and (c) VW4-1. Lanes on the left (+) show the recognition of each fragment by a rabbit anti-TPmy sera.

Table 1 Responsiveness of peripheral blood cells from patients and healthy individuals against the recombinant fragments of *Toenia solium* paramyosin

Human samples	Stimulation with the recombinant products of TPmy*			Number of cases
	VW2-1	VW3-3	VW4-1	
Neurocysticercotic patients responsive to TPmy: 9/24†	+	+	+	3
	-	-	-	2
	+	+	-	1
	+	-	+	1
	-	-	+	1
	-	+	+	1
% Positive	55	55	66	Total 9
Healthy individuals responsive to TPmy: 9/24†	+	+	-	6
	+	+	+	1
	+	-	+	1
	-	-	-	1
% Positive	88	77	22	Total 9

†Cell samples from 24 neurocysticercotic or healthy individuals from the same endemic area for cysticercosis were stimulated as described in the Materials and Methods, with TPmy purified from *T. solium* cysts. When the stimulation index ≥ 2 , the individual was considered responsive.

*Stimulation index ≥ 2 was considered positive (+), otherwise negative (-).

carried out by determining the antibody recognition of the recombinant fragments corresponding to approximate thirds of the TPmy molecule. Thirty-five sera that were positive against native TPmy by Western blot were selected from a group of 50 human sera from neurocysticercotic patients (data not shown). As shown in Figure 2, a remarkable dominance in the recognition towards the carboxyl end (VW4-1) was found when sera from human cysticercotic patients were tested, indicating that B cell epitopes are predominantly located in that region of TPmy. This result is interesting because TPmy is a particularly homogenous molecule: with approximately 95% of the amino acid sequence maintaining the 7/28 repeat pattern, characteristic of α -helical coiled-coil proteins (17). Only the two ends of this filamentous molecule, contain small sequences (15 residues at the amino terminus and 31 residues at the carboxyl terminus) that break the helical secondary structure. Recognition of the central (VW3-3) and of the amino end (VW2-1) fragments was considerably lower. The sera from patients with tuberculosis and amebiasis were nonreactive to any recombinant fragment (not shown), eliminating the possibility that recognition of VW4-1 might be due to binding of immunoglobulins through the Fc region, caused by the ability of TPmy to bind C1q (3). The results with the sera from human patients are consistent with the concept that differences in these nonhelical regions have a strong influence on the outcome of the antibody recognition.

Release of TPmy by the cysticerci has been proposed to modulate the host inflammatory response by decreasing the

production of complement mediators of inflammation, through binding to C1q and inhibition of the C1 function (3). Interestingly, extensive structure/function analysis of TPmy by recombinant expression of a number of TPmy fragments indicates that the C1q binding site is located in the amino-terminal end of the molecule (not shown). This suggests that even in the presence of high levels of anti-TPmy antibodies, the amino end might still be free to interact with C1q and block C1 function.

Our results of antibody recognition of the recombinant fragments of TPmy, using human sera, are similar to those obtained using sera from mice immunized with full-length recombinant TPmy (not shown) and with sera from patients infected with *S. japonicum* (14). In contrast, sera from onchocercosis patients reacted preferentially with the amino end of paramyosin (7). These differences could be due to the phylogenetic relationships between these parasites, with *S. japonicum* and *T. solium* (Platyhelminthes) being far closer than the nematode *Onchocerca volvulus*.

The responsiveness of peripheral blood mononuclear cells from neurocysticercotic patients and healthy individuals from an endemic area for taeniasis/cysticercosis, stimulated with TPmy purified from *T. solium* cysts, was almost identical. In both cases, nine out of 24 cell samples were positive (stimulation index ≥ 2 was considered positive). This indicates a high exposure to the parasite antigens on individuals living in endemic areas. When the mononuclear cells from the patients that were positive against the full length TPmy were stimulated with the

Volume 23, Number 000, March 2001

T and B cell epitope mapping of TPmy

recombinant fragments of TPmy, no preferential responsiveness was observed against any region of TPmy (Table 1). In contrast, TPmy-responsive cells of healthy individuals from the same endemic areas for cysticercosis were more responsive towards the amino and central regions of TPmy.

A genetically based, immunologically mediated resistance is present in two examples of murine cysticercosis (18,19). If something similar occurs in human cysticercosis, it should be expected that not all humans are susceptible to infection. In contrast to patients with neurocysticercosis, the response of mononuclear cells from seropositive healthy individuals living in endemic areas for taeniasis/cysticercosis, described in the present study, is directed mainly to the amino and central regions of the TPmy, suggesting a differential outcome of the immune response in susceptible and resistant individuals.

Previous reports have shown that the immune response towards paramyosin is related to resistance against helminth infection (7,20,21). However, the protective potential of the immune response towards paramyosin remains to be evaluated in infections by cestode parasites.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work has been partially supported by grants from CONACYT: LOO42-M9607 (JPL), 1387P-M9507 (DC) and DGAPA IN-225798 (JPL). JVT was supported by scholarships from DGAPA-UNAM and CONACYT.

REFERENCES

- 1 Grossman Z, Ram D, Markovics A *et al.* *Schistosoma mansoni*: stage-specific expression of muscle-specific genes. *Exp Parasitol* 1990; 70: 62-71.
- 2 Kalinna BH, McManus DP. A vaccine against the Asian schistosome, *Schistosoma japonicum*: an update on paramyosin as a target of protective immunity. *Int J Parasitol* 1997; 27: 1213-1219.
- 3 Lacleite JP, Shoemaker CB, Richter D *et al.* Paramyosin inhibits complement C1. *J Immunol* 1992; 148: 124-128.
- 4 Muhlschlegel F, Sygulla L, Frosch P *et al.* Paramyosin of *Echinococcus granulosus*: cDNA sequence and characterization of a tegumental antigen. *Parasitol Res* 1993; 79: 660-666.
- 5 Riebes A, González D, Rodríguez-Carbajal J *et al.* Swine cysticercosis treated with praziquantel, a short report. *Acta Leidensia* 1989; 57: 255-258.
- 6 Hirsch C, Carvalho-Cueiroz C, Franco GR *et al.* Evidentiation of

- paramyosin (Sm-97) as a modulating antigen on granulomatous hypersensitivity to *Schistosoma mansoni* eggs. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1997; 92: 663-667.
- 7 Steel C, Limberger RJ, McReynolds LA *et al.* B cell responses to paramyosin. Isotypic analysis and epitope mapping of filarial paramyosin in patients with onchocerciasis. *J Immunol* 1990; 145: 3917-3923.
- 8 Langy S, Plichart C, Luquiaud P *et al.* The immunodominant *Brugia malayi* paramyosin as a marker of current infection with *Wuchereria bancrofti* adult worms. *Infect Immun* 1998; 66: 2854-2858.
- 9 Waine GJ, Yang W, Ross AG *et al.* Differential antigen-stimulated proliferation of human mononuclear cells by recombinant *Schistosoma japonicum* antigens in a Chinese population. *Clin Exp Immunol* 1998; 112: 69-73.
- 10 Flanigan TP, King CH, Lett RR *et al.* Induction of resistance to *Schistosoma mansoni* infection in mice by purified parasite paramyosin. *J Clin Invest* 1989; 83: 1010-1014.
- 11 Ramirez BL, Kurtis JD, Wiest PM *et al.* Paramyosin: a candidate vaccine antigen against *Schistosoma japonicum*. *Parasite Immunol* 1996; 18: 49-52.
- 12 Yang W, Geoffrey N, Gobert GN, McManus DP. Oral vaccination of mice with recombinant *Schistosoma japonicum* proteins induces specific anti-parasites antibodies and damage to adult worms after a challenge infection. *Int J Parasitol* 1997; 27: 843-853.
- 13 Li BW, Chandrasekar R, Weil GJ. Vaccination with recombinant filarial paramyosin induces partial immunity to *Brugia malayi* infection in jirds. *J Immunol* 1993; 150: 1881-1885.
- 14 Nara T, Tanabe K, Mahakunkijcharoen Y *et al.* The B cell epitope of Paramyosin recognized by a protective monoclonal IgE antibody to *Schistosoma japonicum*. *Vaccine* 1997; 15: 79-84.
- 15 Espinoza B, Ruiz-Palacios G, Tovar A *et al.* Characterization by enzyme-linked immunosorbent assay of the humoral immune response in patients with neurocysticercosis and its application in immunodiagnosis. *J Clin Microbiol* 1986; 24: 536-541.
- 16 Wilson MRT, Bryan JA, Fried DA *et al.* Clinical evaluation of the cysticercosis enzyme-linked immunoelectrotransfer blot in patients with neurocysticercosis. *J Infect Dis* 1991; 164: 1007-1009.
- 17 Landa A, Lacleite JP, Nicholson-Weller A, Shoemaker CB. *Taenia solium* Paramyosin (AgB): cDNA cloning and recombinant expression of collagen binding and complement inhibitor activity. *Mol Biochem Parasitol* 1993; 60: 343-347.
- 18 Mitchell GF. In *Cysticercosis: Present State of Knowledge and Perspectives*, eds Lacleite JP, Larralde C, Ridaura C, Beltrán F. New York: Academic Press; 1982; 575-584.
- 19 Sciutto E, Fragoso G, Diaz ML *et al.* Murine *Taenia crassiceps* cysticercosis: H-2 complex and sex influence on susceptibility. *Parasitol Res* 1991; 77: 243-246.
- 20 Correa-Oliveira R, Pearce EJ, Oliveira GC *et al.* The human immune response to defined immunogens of *Schistosoma mansoni*: elevated antibody levels to paramyosin in stool-negative individuals from two endemic areas in Brazil. *Trans Royal Soc Trop Med Hygiene* 1989; 83: 798-804.
- 21 Hernandez MG, Hafalla JC, Acosta LP *et al.* Paramyosin is a major target of the human IgA response against *Schistosoma japonicum*. *Parasite Immunol* 1999; 21: 641-647.

Characterization and Protective Potential of the Immune Response to *Taenia solium* Paramyosin in a Murine Model of Cysticercosis

JOSÉ VÁZQUEZ-TALAVERA, CARLOS F. SOLÍS, LUIS I. TERRAZAS, AND JUAN P. LACLETTE*

Department of Immunology, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, C.P. 04510, Mexico

Received 14 March 2001/Returned for modification 5 May 2001/Accepted 18 June 2001

Paramyosin has been proposed as a vaccine candidate in schistosomiasis and filariasis. However, limited information is available about its protective potential against cysticercosis and the immune response it induces. Immunization of mice with recombinant full-length paramyosin of *Taenia solium* (TPmy) results in about a 52% reduction in parasite burden after a subsequent challenge by intraperitoneal inoculation of *Taenia crassiceps* cysticerci. Immunization assays using recombinant fragments of TPmy, corresponding approximately to thirds on the amino, central, or carboxyl regions, suggest that protective epitopes are located mostly in the amino-end third. Proliferation assays using T cells obtained from mice immunized with the full-length recombinant TPmy also showed a preferential response to the amino-terminal fragment. In contrast, antibodies in the sera from these mice predominantly recognize epitopes located in the carboxyl-terminal fragment, being the immunoglobulin G1 subclass, the predominant antibody isotype. Characterization of the cellular immune response induced against the protective amino-terminal fragment reveals production of gamma interferon and interleukin-2, but not interleukin-4, suggesting a Th1-like profile.

Paramyosin (Pmy) is a filamentous, α -helical, coiled-coil protein of about 100 kDa, present in some muscles of invertebrates. It is also an antigen during infections by several flatworms that are important parasites of humans and of domestic animals such as *Schistosoma mansoni* (10), *Schistosoma japonicum* (4), *Taenia solium* (10, 12), and *Echinococcus granulosus* (18). The paramyosin of *T. solium* (TPmy) is present in the musculature but has also been found associated with the tegument of the parasite (7). The collagen-binding and complement-inhibitory properties of TPmy have been described previously (8, 9, 11). TPmy is synthesized by the tegumentary cytons and apparently released through the cyst tegument (8). Furthermore, TPmy can be collected in the culture medium in which *T. solium* cysts are maintained (8), suggesting that a similar release to the host tissues might occur in vivo and that TPmy may modulate the host response through diminution of the inflammatory mediators at the host-parasite interface (8, 11).

Paramyosins have been proposed as vaccine candidates in a number of helminthiasis including schistosomiasis (3, 20) and filariasis (14, 19). Despite their protective abilities against schistosomiasis and filariasis, limited information is available on their potential as vaccines against cysticercosis. Here we report that immunization of mice with recombinant fragments of TPmy induces significant levels of protection in the murine model of cysticercosis by *Taenia crassiceps*. The profile of cytokine production suggests that the protective amino-terminal fragment of TPmy induces a Th1-like immune response.

* Corresponding author. Mailing address: Dirección, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, A.P. 70228, Ciudad Universitaria, C.P. 04510, Mexico City, Mexico. Phone: (525) 622-3862. Fax: (525) 550-6447. E-mail: laclette@servidor.unam.mx.

MATERIALS AND METHODS

Animal model. Mice used in all experiments were 4- to 6-week-old female BALB/c AnN strain mice. The ORF strain of *T. crassiceps* was maintained by consecutive passages of cysts in the peritoneal cavities of mice (26). Cysts used to challenge mice in protection studies were obtained from mice after 2 to 3 months of infection, those with diameters of 1 to 2 mm being the ones selected.

Recombinant proteins. A series of constructs derived from the full-length coding sequence of TPmy were designed to express either the full-length protein or fragments that correspond to approximately thirds of TPmy. The full-length paramyosin (VW7-3) is an 863-amino-acid protein as described elsewhere (12); the amino-terminal fragment contains amino acids 1 to 268 (VW2-1), the central fragment contains amino acids 269 to 551 (VW3-3), and the carboxyl-terminal fragment contains amino acids 552 to 863 (VW4-1). All TPmy products were recombinantly expressed and purified by affinity chromatography as described before (J. Vázquez-Talavera et al., submitted for publication). Purified recombinant proteins were exhaustively dialyzed against 0.5 M NaCl, pH 7.3, and the protein concentration was determined using the Bradford protein assay (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Calif.).

Preparation of immunogens. Recombinant fragments (VW2-1, VW3-3, and VW4-1) or full-length rTPmy (VW7-3) were mixed with 1.6% alum [$Al_2(OH)_3$] to a final ratio of 1 to 50 (wt/wt) and incubated at room temperature for 20 min. Alum was sedimented by centrifugation at $8,000 \times g$ for 10 min and resuspended in sterile saline. The amount of protein bound to $Al_2(OH)_3$ was determined by quantifying the amount of protein in the supernatant after centrifugation. Binding of protein to the alum was higher than 95%. In all immunizations, one dose corresponded to 20 μ g of protein adsorbed to 1 mg of alum.

Protection studies. Mice were immunized two times intraperitoneally (i.p.) at 1-week intervals with one of the recombinant products of TPmy (VW2-1, VW3-3, VW4-1, or VW7-3), prepared as described above. Control mice were injected with 1 mg of alum in saline, following the same procedure as with immunized mice. One week after the last immunization, mice were i.p. challenged with 10 *T. crassiceps* cysts in saline. Mice were bled every week after the last immunization and sacrificed by cervical dislocation at 45 days postinfection, and cysts from the peritoneal cavities were collected and counted.

Antibody recognition of the recombinant fragments of TPmy. To evaluate the antibody recognition of the different regions of TPmy, enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) were performed using pooled sera from four mice that had been immunized i.p. three times at 1-week intervals with VW7-3 that was prepared as described above. Mice were bled 1 week after the last immunization. ELISA was carried out binding equimolar amounts of each recombinant TPmy fragment (VW2-1, VW3-3, and VW4-1) to microtiter plate wells. In brief, 96-well microtiter plates (Immulon 2; Dynatech, Chantilly, Va.) were coated with equal amounts of the immunoglobulin fraction of chicken hyperimmune sera directed

TABLE 1. Protection assays in the murine model of cysticercosis by *T. crassiceps*^a

Expt no.	Vaccination	No. of mice	Individual burden	Parasite load ^b	Protection ^c (%)
1	Alum VW7-3	4	48, 38, 22, 36	36 ± 11	55 ^d
		4	4, 24, 24, 12	16 ± 10	
2	Alum VW7-3	6	7, 36, 54, 76, 141, 76	65 ± 45	52 ^d
		6	19, 24, 52, 37, 43, 9	31 ± 16	
3	Alum VW2-1 VW4-1	5	20, 31, 73, 92, 134	70 ± 46	87 ^d -25
		5	0, 0, 1, 2, 41	9 ± 18	
		6	40, 73, 78, 82, 110, 147	88 ± 36	
4	Alum VW2-1 VW4-1	5	38, 44, 54, 76, 110	64 ± 29	47 ^d 36
		6	7, 9, 18, 38, 43, 86	34 ± 30	
		6	0, 0, 10, 20, 66, 150	41 ± 59	
5	Alum VW3-3	5	81, 82, 86, 31, 158	88 ± 45	34
		5	79, 8, 70, 79, 54	58 ± 30	
6	Alum VW3-3	6	107, 300, 134, 55, 170, 64	138 ± 90	52 ^d
		6	99, 39, 29, 90, 120, 22	67 ± 42	

^a Mice were challenged by inoculation of 10 cysts 1 week after the last immunization as described in Materials and Methods.

^b Values are means ± standard deviations of the parasite loads after 45 days of infection.

^c Protection was calculated as the reduction of parasite load expressed in percentage, where the alum-injected control mice burden is 100%.

^d Statistically significant difference between alum-injected control mice and immunized mice ($P \leq 0.05$).

to the 46-amino-acid fusion peptide, located at the amino-terminal end of all recombinant fragments. After being washed four times with phosphate-buffered saline (PBS) containing 0.03% polyoxyethylene sorbitan monolaurate (PBS-Tween 20) and blocking with PBS-Tween 20 plus 1% bovine serum albumin, 100 ng of each recombinant fragment was added per well and incubated at room temperature for 1 h. After being washed, 1:200 dilutions of the pooled sera from the immunized mice were added and incubated at 37°C for 1 h. The amount of antibody bound was quantified using a secondary horseradish peroxidase-conjugated rabbit anti-mouse immunoglobulin G (IgG) plus IgM plus IgA plus IgD antibody, following the manufacturer recommendations (Zymed Laboratories, Inc., San Francisco, Calif.). The reaction was developed with *o*-phenylenediamine dihydrochloride plus hydrogen peroxide and stopped with 2.5 N H₂SO₄. Readings of optical density at 490 nm (OD₄₉₀) were carried out in an ELISA reader (Human Gesellschaft für Biochemia und Diagnostica, Taunusstein, Germany). Isotype analysis of the sera from mice that were immunized with one of the recombinant products of TPmy (VW2-1, VW3-3, VW4-1, or VW7-3) was carried out by ELISA using a crude extract (9) bound to microtiter plate wells and a secondary horseradish peroxidase rabbit anti-mouse IgG1 or IgG2a antibody (Zymed Laboratories, Inc.).

T-cell proliferation assays. A pool was made with spleen cells obtained from four mice immunized with VW7-3 as described above (see "Antibody recognition of the recombinant fragments of TPmy") 1 week after the last immunization. As a control group, a pool of cells was obtained from four naive mice. The T-cell-enriched fractions from naive or immunized mice were obtained by panning the spleen cells in polystyrene tissue culture plates coated with affinity-purified rabbit anti-mouse IgA plus IgG plus IgM antibodies (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.). The nonadherent cells (including T cells) were recovered from the culture media and used for proliferation assays. Quantification of T cells in this nonadherent fraction, by flow cytometry using fluorescent monoclonal antibodies to surface markers, indicated that T cells (CD3e⁺) represented about 60%, whereas B cells (CD19⁺) and macrophages (Mac3⁺) represented less than 0.5%. The remaining 39% of this nonadherent fraction corresponded to cells that were not recognized by the monoclonal antibodies specific for CD3e, CD19, and Mac3. The T cells were cultured in 96-well microtiter plates (Costar, Cambridge, Mass.) containing 2.5 × 10⁵ cells per well, supplemented with 1.25 × 10³ adherent naive cells in a final volume of 200 µl in RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal calf serum, 0.2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 0.1 mM nonessential amino acids, 100 U of penicillin per ml, and 100 µg of streptomycin per ml (RPMI-sup). The optimal dose and time for culture were determined by stimulation of T cells with 0.6 to 600 pmol of VW7-3 per ml during 48 to 216 h. The T-cell-enriched fraction from immunized mice proliferated optimally (i.e., it had the highest stimulation index, which is the ratio of stimulated cells to unstimulated cells) with a dose of 60 pmol/ml during 72 h. Cultures were maintained at 37°C with 5% CO₂ and humidity at saturation. Eighteen hours before harvesting, cells were

pulsed with [*methyl*-³H]thymidine, 1 µCi/well (NEN Life Science Products, Inc., Boston, Mass.), and the amount of incorporated radioactive label was measured in a liquid scintillation counter (Betaplate, Turku, Finland).

Cytokine quantification. Spleen cells from normal mice and from mice that were immunized with VW2-1 (see "Protection studies" above) were cultured in RPMI-sup on flat-bottom 16-well microtiter plates (Costar) at a concentration of 5 × 10⁶ cells per well. Spleen cells were stimulated with 60 pmol of amino-terminal fragment (VW2-1) per ml during 48 h, and the supernatants were collected, aliquoted, and stored at -70°C until used. Basal (nonstimulated) cytokine levels were evaluated in all cultures. The presence of interleukin-2 (IL-2), gamma interferon (IFN-γ), and IL-4 in supernatants was assayed by sandwich ELISA with cytokine-specific kits (PharMingen, San Diego, Calif.) following the instructions from the manufacturer.

Statistical analysis. Student's *t* test was used to compare pairs of data and the analysis of variance test was used for multiple group designs.

RESULTS

Protection assays. The murine model of cysticercosis was used for the identification of potentially protective epitopes in the molecule of TPmy. Protection induced by recombinant fragments of TPmy can be easily evaluated in this model by counting the numbers or determining the volumes of cysts growing in the peritoneal cavities of immunized or control mice after an initial challenge. Susceptible female BALB/c AnN mice were immunized twice with VW7-3 or any of the recombinant fragments of TPmy and challenged by i.p. injection of 10 cysts. The mice were sacrificed 45 days after the challenge, and the numbers of cysts in the peritoneal cavities were evaluated. Mice immunized with VW7-3 showed an ~52% reduction in the number of cysts (Table 1). Protection induced by recombinant fragments of TPmy was highly variable between experiments; however, the higher and significant reduction in the parasite burden was obtained by immunization with the amino-terminal fragment (VW2-1), which induced 47 and 87% protection in two experiments. In contrast, the other fragments showed lower, nonsignificant levels of protection, suggesting that most of the protective epitopes are located in the amino-terminal fragment of TPmy. ELISA tests

TABLE 2. Humoral reactivity against Pmy recombinant fragments after immunization of mice with VW7-3^a

Antigen	Sera	
	Naive	Immune
VW7-3	0.023 ± 0.015	2.295 ± 0.080 ^b
VW2-1	0.076 ± 0.018	0.075 ± 0.006
VW3-3	0.062 ± 0.003	0.515 ± 0.021 ^b
VW4-1	0.059 ± 0.010	0.426 ± 0.012 ^b

^a Sera from naive and VW7-3-immunized mice (diluted 1:200) were analyzed by ELISA as described in Materials and Methods. Values are means ± standard deviations of quadruplicates expressed in OD₄₉₀ units.

^b Values are statistically significantly different from those obtained with naive mice sera ($P < 0.01$).

showed that serum samples from mice immunized with the fragments of TPmy, taken before and after challenge infection, had similar levels of IgG1 and IgM antibodies (not shown). Marginal levels of IgG2a were also detected in immunized mice. Experiments of passive transfer of sera from mice immunized with VW2-1 into naive receptors showed no significant differences of cyst burden compared to recipients of sera from naive mice, indicating that protection is not mediated through antibodies (data not shown).

Antibody reactivity against TPmy recombinant fragments. B-cell epitopes were located on the TPmy recombinant fragments by ELISA using sera from mice immunized with VW7-3. This experiment was feasible given the extensive cross-recognition between paramyosins from different flatworms and other invertebrates (11). The sera from mice immunized with the VW7-3 were highly positive against the central (VW3-3) region and the carboxyl end (VW4-1) but negative to the amino end (VW2-1) (Table 2). No antigen-specific antibody reactivity was detected against an unrelated protein containing the same fusion peptide (data not shown).

T-cell response against TPmy recombinant fragments. In order to determine if a specific cellular immune response is generated in mice after immunization with VW7-3, a T-cell-enriched fraction was cultured and stimulated in vitro with VW7-3 and the recombinant fragments (VW 2-1, VW 3-3, and VW4-1). A significant antigen-specific proliferation was observed in the T cells from immune mice stimulated with VW7-3, VW2-1, and VW3-3 but not VW4-1 (Table 3). Unexpectedly, T cells from naive mice were also responsive at lower levels to the full-length VW7-3, VW2-1, and VW3-3, suggesting that some mitogenic activity is associated to the amino and central regions of TPmy. No antigen-specific proliferative response was detected against two control-unrelated proteins containing the same fusion peptide (data not shown).

Cytokine production. To establish the cytokine profile induced by the immunization with the protective amino terminal fragment (VW2-1), spleen cells from immunized and naive mice were stimulated in vitro with the same recombinant product. As shown in Table 4, IL-2 and IFN- γ but not IL-4 are produced in an antigen-specific fashion. No statistically significant differences in cell phenotypes were found in unstimulated spleen cells from control, immunized, and infected mice (data not shown). These results suggest that a Th1 profile is induced by immunization with the amino-terminal fragment of TPmy. The marginal but significant stimulation observed in naive cells

TABLE 3. Antigen-specific proliferation of T cells from VW7-3-immunized mice

Stimulation ^a	Stimulation index ^b for:	
	Naive mice	Immune mice
RPMI ^c	1	1
RPMI + VW7-3	7.44 ^d	15.7 ^d
RPMI + VW2-1	3.5 ^d	7.1 ^d
RPMI + VW3-3	3.22 ^d	4.6 ^d
RPMI + VW4-1	1.11	1.2

^a Proliferation was assayed with T cells from immunized and naive mice stimulated with the recombinant fragments of Pmy as described in Materials and Methods.

^b Reported values are stimulation indexes calculated from the means of radioactivity incorporation (quadruplicates) for each experimental group after an 18-h pulse with [³H]thymidine.

^c Absolute values were 1.8 ± 0.3 and 1.5 ± 0.3 (kcpm ± standard deviation) for naive and immune medium controls, respectively.

^d Absolute values for each experimental group were statistically different from absolute values for RPMI-stimulated control cells ($P < 0.05$).

cultured with VW2-1 involving IL-2 but not IFN- γ or IL-4 again suggests that a mitogenic activity is associated to the amino-terminal region of TPmy.

DISCUSSION

Paramyosins have been proposed as vaccine candidate antigens against trematodes like *S. mansoni* (3, 22) and *S. japonicum* (20, 21, 23), as well as against nematodes like *Brugia malayi* (14, 19). The feasibility of inducing protection through immunization with heterologous paramyosins has been demonstrated in several parasite models; it was found that vaccination of mice with Pmy from the nematode *Caenorhabditis elegans* induces up to 60% protection against challenge with *B. malayi* (19). Another extreme example is the induction of 35% protection against *S. japonicum* through immunization of mice with a soluble paramyosin-containing fraction from the earthworm *Lumbricus terrestris* (36). In this report, we show that *T. solium* Pmy induced partial heterologous protection against murine cysticercosis by *T. crassiceps* and that most of the protective epitopes are located at the amino-terminal fragment of the protein.

Information on the location of protective epitopes on the Pmy molecule is scarce. Immunization of mice with a recombinant fragment of Pmy from *S. mansoni* corresponding to the central region (amino acids 303 to 742) induces protection against *S. mansoni* (22). In the murine infection by *S. japonicum*, the B-cell epitope IRRA, recognized by a protective monoclonal IgE antibody, is located in residues 359 to 362 of the *S. japonicum* Pmy (21). This sequence is also found at the same position in the *S. mansoni* Pmy. In contrast, although the sequence IRRA is also found in TPmy at positions 743 to 746, it was not associated with protection, as the carboxyl-end fragment was found to be not significantly protective.

Sera from mice immunized with VW7-3 reacted much more against the carboxyl-terminal fragment (VW4-1) and the central fragment (VW3-3) than against the amino terminal (VW2-1) fragment. The sera from neurocysticercotic patients are also strongly reactive against the carboxyl-end region, with poor recognition of the central and amino regions (Vázquez-Talavera et al., submitted). These results are intriguing, con-

TABLE 4. Proliferation and cytokine profile of spleen cells from mice immunized with VW2-1

Immunization status of mice	Treatment ^a of spleen cells	Stimulation index ^b	Mean \pm SD of production (pg/ml) of:		
			IL-2	IFN- γ	IL-4
Naive	None	1	713 \pm 62	2,683 \pm 1,765	\geq 30
	VW2-1	3.25 ^c	954 \pm 45 ^c	4,635 \pm 1,260	107 \pm 118
Immunized with VW2-1	None	1	813 \pm 76	2,032 \pm 436	\geq 30
	VW2-1	7.33 ^c	1,841 \pm 274 ^c	7,619 \pm 1,019 ^c	33 \pm 39

^a Spleen cells from naive mice or from mice immunized with VW2-1 were cultured in vitro with or without VW2-1 as described in Materials and Methods ("Cytokine quantification") to evaluate proliferation and quantify cytokines in the culture supernatants.

^b Reported values are stimulation indexes calculated from the means of radioactivity incorporation for three individual mice per group after an 18-h pulse with [³H]thymidine.

^c Statistically significant difference between stimulated cells and nonstimulated cells ($P < 0.01$).

sidering that the secondary structure of paramyosins is highly homogeneous: about 95% of the complete amino acid sequences of these proteins maintains the 7/28 repeat pattern characteristic of α -helical coiled-coil proteins (10, 12). TPmy contains small sequences (15 residues at the amino end and 31 residues at the carboxyl end) that break the helical secondary structure, suggesting that the nonhelical regions have small influence on the asymmetry of the antibody recognition (12). B-cell epitope mapping carried out on *Dirofilaria immitis* paramyosin using sera from patients infected with *Onchocerca volvulus* indicated a preferential recognition of the amino end of the molecule (29). However, sera from patients infected by *S. japonicum* preferentially recognized the carboxyl end (21). These results indicate that paramyosins from helminth parasites have dominant epitopes located in different regions of the molecule.

Mice vaccinated with the recombinant fragments of TPmy produced IgG1 antibodies with marginal levels of IgG2a. This is in agreement with previous studies showing that mice vaccinated with irradiated cercaria from *S. mansoni* show high levels of IgG1 antibodies against recombinant Pmy from *S. mansoni* (24) and that vaccination with DNA encoding *S. japonicum* Pmy also induces production of IgG1 antibodies (37). In contrast to our results, the IgG1 isotype has also been correlated with protection in schistosomiasis (2).

Paramyosins induce proliferative responses of mononuclear cells from patients infected with *S. japonicum* (35) and splenocytes from mice immunized with irradiated cercaria from *S. mansoni* (25). However, no information was available about the region(s) of the molecule inducing the response. Our results indicated that only the amino-terminal (VW2-1) and the central (VW3-3) fragments induced proliferation when a T-cell-enriched fraction was used in the assays.

Information on vaccination against cysticercosis using different antigens is growing rapidly and has been recently reviewed (6, 15, 16, 27). Previous reports suggested that protection against murine cysticercosis by *T. crassiceps* is mediated by a Th1 response (32, 34) featured by CD4⁺ or CD8⁺ T cells, implying that T lymphocytes can induce protection irrespective of their phenotypes (17, 31, 33). The in vitro production of IL-2 and IFN- γ by the protective fragment VW2-1 also suggested that protection induced by TPmy is based on a Th1 response. IFN- γ is also produced by immunization with *S. mansoni* Pmy (22), and a delayed-type hypersensitivity response against Pmy is commonly detected in filariasis (19). The failure of a hyper-immune serum raised against the amino-terminal fragment to

passively transfer significant resistance to infection in recipient naive mice also supports the idea that protection involves a T-cell-mediated response, as described for *S. mansoni* infection of mice (22).

In contrast to immunized mice, spleen cells from infected mice showed a weak proliferation against TPmy (data not shown). These results suggest that the lower response may result from a long-term infection, as proposed for human (1), porcine (5), and murine cysticercoses (13, 28). This diminution in spleen cell responsiveness might be the consequence of an immunosuppression state induced by the parasite (30).

Our results demonstrate that a moderate protection can be induced by Pmy in a murine model of cysticercosis. This is in agreement with results obtained for other helminth parasites including trematodes and nematodes. Current efforts are being directed to finding out how protection levels are influenced by the profile of the resulting immune response. Although our data provide information on the location of protective epitopes on the protein and on the profile of the protective response, little can be advanced on the mechanism of the TPmy-induced protection. In particular, the accessibility of this protein on the external surfaces of the cysts to become the target of protective immunity deserves further study.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported in part by grants from CONACYT (LOO42-M9607 to J.P.L.), DGAPA-UNAM (IN-207195 to J.P.L.), and PADEP-UNAM (030326 and 030360 to J.V.-T.). J.V.-T. is being supported by scholarships from DGAPA-UNAM and CONACYT.

We thank P. de la Torre and C. Castellanos for skillful technical help. We thank Tzipe Govezensky for statistical help.

REFERENCES

- Correa, D., A. Tovar, B. Espinoza, A. Plancarte, and A. Flisser. 1989. Cisticercosis humana: relación inmunológica huésped-parásito, p. 31-43. In A. Flisser and F. Malagón (ed.), Cisticercosis humana y porcina: su conocimiento e investigación en México. Limusa, México.
- Delgado, V., and D. J. McLaren. 1990. Evidence for enhancement of IgG1 subclass expression in mice polyvaccinated with radiation-attenuated cercariae of *Schistosoma mansoni* and the role of this isotype in serum-transferred immunity. *Parasite Immunol. (Oxford)* 12:15-32.
- Flanigan, T. P., C. H. Kling, R. R. Lett, J. Nanduri, and A. A. Mahmoud. 1989. Induction of resistance to *Schistosoma mansoni* infection in mice by purified parasite paramyosin. *J. Clin. Investig.* 83:1010-1014.
- Gobert, G. N., D. J. Stenzel, M. K. Jones, D. E. Allen, and D. P. McManus. 1997. *Schistosoma japonicum*: immunolocalization of paramyosin during development. *Parasitology* 114:45-52.
- Herrera, L. A., P. Santiago, G. Rojas, P. M. Salazar, P. Tato, J. L. Molinari, D. Schiffmann, and P. Ostrosky-Wegman. 1994. Immune response impairment, genotoxicity and morphological transformation induced by *Taenia solium* metacystode. *Mutat. Res.* 305:223-228.
- Huerta, M., E. Scutto, G. Garcia, N. Villalobos, M. Hernandez, G. Frago, G.

- J. Diaz, A. Diaz, R. Ramirez, S. Luna, J. Garcia, E. Aguilar, S. Espinoza, G. Castilla, J. R. Bobadilla, R. Avila, M. V. Jose, C. Larralde, and A. S. de Aluja. 2000. Vaccination against *Taenia solium* cysticercosis in underfed rustic pigs of Mexico: roles of age, genetic background and antibody response. *Vet. Parasitol.* 27:209-219.
7. LaClette, J. P., P. Skelly, M. Merchant, and C. B. Shoemaker. 1995. Aldehyde fixation dramatically alters the immunolocalization pattern of paramyosin in helminth parasites. *Exp. Parasitol.* 81:140-144.
8. LaClette, J. P., M. Rodríguez, A. Landa, L. Arcos, P. de Alba, R. Mancilla, and K. Willms. 1989. The coexistence of *Taenia solium* cysticerci and the pig: role of antigen B. *Acta Leidensia.* 57:115-122.
9. LaClette, J. P., A. Alagón, K. Willms, and A. Torre-Blanco. 1990. Purification of antigen B from *Taenia solium* cysticerci by affinity to mammalian collagen. *J. Parasitol.* 76:273-275.
10. LaClette, J. P., A. Landa, L. Arcos, K. Willms, A. E. Davis, and C. B. Shoemaker. 1991. Paramyosin is the *Schistosoma mansoni* (Trematoda) homologue of antigen B from *Taenia solium* (Cestoda). *Mol. Biochem. Parasitol.* 44:287-295.
11. LaClette, J. P., C. B. Shoemaker, D. Richter, L. Arcos, N. Pante, C. Cohen, D. Bing, and A. Nicholson-Weller. 1992. Paramyosin inhibits complement C1. *J. Immunol.* 148:124-128.
12. Landa, A., J. P. LaClette, A. Nicholson-Weller, and C. B. Shoemaker. 1993. cDNA cloning and recombinant expression of collagen-binding and complement inhibitor activity of *Taenia solium* paramyosin (AgB). *Mol. Biochem. Parasitol.* 60:343-347.
13. Letonja, T., C. Hammberg, and G. Schurig. 1987. Evaluation of spleen lymphocyte responsiveness to a T-cell mitogen during early infection with larval *Taenia taeniaeformis*. *Parasitol. Res.* 73:265-270.
14. Li, B. W., R. Chandrashekar, and G. J. Weil. 1993. Vaccination with recombinant filarial paramyosin induces partial immunity to *Brugia malayi* infection in jirds. *J. Immunol.* 150:1881-1885.
15. Lightowers, M. W. 1999. Eradication of *Taenia solium* cysticercosis: a role for vaccination of pigs. *Int. J. Parasitol.* 29:811-817.
16. Lightowers, M. W., A. Flisser, C. G. Gauci, D. D. Heath, O. Jensen, and R. Rolfe. 2000. Vaccination against cysticercosis and hydatid disease. *Parasitol. Today* 16:191-196.
17. Manoutcharian, K., L. I. Terrazas, G. Gevorkian, G. Acero, P. Petrossian, M. Rodríguez, and T. Govezensky. 1999. Phage-displayed T-cell epitope grafted into immunoglobulin heavy-chain complementarity-determining regions: an effective vaccine design tested in murine cysticercosis. *Infect. Immun.* 67:4764-4770.
18. Muhlschlegel, F., L. Sygulla, P. Frosch, P. Massetti, and M. Frosch. 1993. Paramyosin of *Echinococcus granulosus*: cDNA sequence and characterization of a tegumental antigen. *Parasitol. Res.* 79:660-666.
19. Nanduri, J., and J. W. Kazura. 1989. Paramyosin-enhanced clearance of *Brugia malayi* microfilaremia in mice. *J. Immunol.* 143:3359-3363.
20. Nara, T., N. Matsumoto, T. Janecharu, H. Matsuda, K. Yamamoto, T. Irimura, K. Nakamura, M. Aikawa, I. Oswald, A. Sher, K. Kita, and S. Kojima. 1994. Demonstration of the target molecule of a protective IgE antibody in secretory glands of *Schistosoma japonicum* larvae. *Int. Immunol.* 6:963-971.
21. Nara, T., K. Tanabe, Y. Mahakunijcharoen, Y. Osada, N. Matsumoto, K. Kita, and S. Kojima. 1997. The B cell epitope of paramyosin recognized by a protective monoclonal IgE antibody to *Schistosoma japonicum*. *Vaccine* 15:79-84.
22. Pearce, E. J., S. L. James, S. Hienny, D. E. Lanar, and A. Sher. 1988. Induction of protective immunity against *Schistosoma mansoni* by vaccination with schistosome paramyosin (Sm97), a nonsurface parasite antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5678-5682.
23. Ramirez, B. L., J. D. Kurtis, P. M. Wiest, P. Arias, F. Aligui, L. Acosta, P. Peters, and G. R. Olds. 1996. Paramyosin: a candidate vaccine antigen against *Schistosoma japonicum*. *Parasite Immunol.* 18:49-52.
24. Richter, D. R. N. Incani, and D. A. Harn. 1993. Isotype responses to candidate vaccine antigens in protective sera obtained from mice vaccinated with irradiated cercariae of *Schistosoma mansoni*. *Infect. Immun.* 61:3003-3011.
25. Richter, D., S. R. Reynolds, and D. A. Harn. 1993. Candidate vaccine antigens that stimulate the cellular immune response of mice vaccinated with irradiated cercariae of *Schistosoma mansoni*. *J. Immunol.* 151:256-265.
26. Sciutto, E., G. Fragoso, L. Trueba, D. Lemus, R. M. Montoya, M. L. Diaz, T. Govezensky, C. Lomeli, G. Tapia, and C. Larralde. 1990. Cysticercosis vaccine: cross protecting immunity with *Taenia solium* antigens against experimental murine *Taenia crassiceps* cysticercosis. *Parasite Immunol.* 12:687-696.
27. Sciutto, E., G. Fragoso, A. Fleury, J. P. LaClette, J. Sotelo, A. Aluja, L. Vargas, and C. Larralde. 2000. *Taenia solium* disease in humans and pigs: a major health problem of global dimensions. *Microbes Infect.* 2:1875-1890.
28. Sciutto, E., G. Fragoso, M. Baca, V. De la Cruz, L. Lemus, and E. Lamoyl. 1995. Depressed T-cell proliferation associated with susceptibility to experimental *Taenia crassiceps* infection. *Infect. Immun.* 63:2277-2281.
29. Steel, C., R. J. Limberger, L. A. McReynolds, E. A. Ottesen, and T. B. Nutman. 1990. B cell responses to paramyosin. Isotypic analysis and epitope mapping of filarial paramyosin in patients with onchocerciasis. *J. Immunol.* 145:3917-3923.
30. Tato, P., Y. Valles, R. Rolon, and J. L. Molinari. 1987. Effect of immunization in immunodepressed pigs naturally parasitized by *Cysticercus cellulosae*. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 29:67-71. (In Spanish.)
31. Terrazas, L. I., R. Bojalil, T. Govezensky, and C. Larralde. 1998. Shift from an early protective Th1-type immune response to a late permissive Th2 response in murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). *J. Parasitol.* 84:74-81.
32. Terrazas, L. I., M. Cruz, M. Rodríguez-Sosa, R. Bojalil, F. García-Tamayo, and C. Larralde. 1999. Th1-type cytokines improve resistance to murine cysticercosis caused by *Taenia crassiceps*. *Parasitol. Res.* 85:135-141.
33. Toledo, A., C. Larralde, G. Fragoso, G. Gevorkian, K. Manoutcharian, M. Hernández, G. Acero, G. Rosas, F. López-Casillas, C. K. Garfias, R. Vázquez, I. Terrazas, and E. Sciutto. 1999. Towards a *Taenia solium* cysticercosis vaccine: an epitope shared by *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* protects mice against experimental cysticercosis. *Infect. Immun.* 67:2522-2530.
34. Villa, O. F., and R. E. Kuhn. 1996. Mice infected with the larvae of *Taenia crassiceps* exhibit a Th2-like immune response with concomitant anergy and down regulation of Th1-associated phenomena. *Parasitology* 112:561-570.
35. Waine, G. J., W. Yang, A. G. Ross, Y. S. Li, A. C. Sleight, B. H. Kalinna, J. C. Scott, D. Mazzer, Y. Li, and D. P. McManus. 1998. Differential antigen-stimulated proliferation of human mononuclear cells by recombinant *Schistosoma japonicum* antigens in a Chinese population. *Clin. Exp. Immunol.* 112:69-73.
36. Wisniewski, A. V., and T. F. Kresina. 1995. Induction of protective immunity to schistosomiasis with immunologically cross-reactive *Lumbricus* molecules. *Int. J. Parasitol.* 25:503-510.
37. Yang, W., G. J. Waine, and D. P. McManus. 1995. Antibodies to *Schistosoma japonicum* (Asian bloodfluke) paramyosin induced by nucleic acid vaccination. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 212:1029-1039.

CELLULAR IMMUNE RESPONSE AND TH1/TH2 CYTOKINES IN HUMAN NEUROCYSTICERCOSIS: LACK OF IMMUNE SUPPRESSION

Edith Medina-Escutia, Zoila Morales-López, Jefferson V. Proaño*, José Vázquez†, Víctor Bermúdez‡, Vianney Ortiz-Navarrete*, Vicente Madrid-Marina‡, Juan P. Lactette†, and Dolores Correa§

Departamento de Biotecnología, Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos, Secretaría de Salud, México, Carpio 470, Col. Sto. Tomás, 11340 DF. email: mcorrea@mailier.main.conacyt.mx or Mariadol@yahoo.com.

ABSTRACT: Some reports have suggested that human neurocysticercosis (NCC) induces immunosuppression. To test this hypothesis, we performed a study on active cases of NCC who had not received cestocidal or immunosuppressive treatments. We examined blood counts and specific T cell markers (CD3, CD4, and CD8) by flow cytometry and found no differences between patients with NCC and healthy individuals. Both groups responded to concanavalin A (Con A), and patients with NCC responded more to a parasite crude antigen than uninfected individuals. Peripheral blood mononuclear cells were examined for interleukin (IL)-2, interferon- γ , IL-10, and IL-4 mRNA. Regardless of infection status, more than 60% of individuals synthesized IL-2 mRNA and, less frequently, the other cytokines. These data suggest that immunosuppression does not occur in NCC patients.

Neurocysticercosis (NCC) is caused by the ingestion of *Taenia solium* eggs that differentiate into metacestodes (cysticerci). It is the most common parasitic infection of the human nervous system and is a major public health problem in several developing countries (Del-Bruto et al., 1996). A number of useful immunological methods emerged years ago to support clinical diagnosis (Flisser et al., 1997).

Besides their practical use, these techniques generated valuable information related to the host's antibody response that was shown to be predominantly IgG, although IgA and IgM antibodies may also be present (Flisser et al., 1980; Espinoza et al., 1986). NCC is remarkably heterogeneous among patients, with respect to immunoglobulins present in the cerebrospinal fluid (CSF) and the serum and to the different antigens recognized (Espinoza et al., 1986; Larralde et al., 1989).

However, data are scarce with respect to the human T-cell response to this parasite. Some early studies suggested that both humans and pigs with *T. solium* cysticercosis had depressed immune responses (Molinari et al., 1987; Correa et al., 1989).

More recently, cytokines have been examined in the CSF and the serum of patients with NCC. Ostrosky-Zeichner et al. (1996) found increased levels of interleukin (IL)-6 and IL-1 in the CSF of patients with inflammatory NCC. Evans et al. (1998) reported that IL-5 is increased in the serum and CSF of individuals with NCC as compared to controls; eotaxin was also found to be increased in serum. Restrepo et al. (1998) looked for cytokines in the tissues surrounding cysticerci in 4 cases submitted to surgery, and found both Th1 and Th2 interleukins in situ. Even though these studies have provided valuable data, they were performed with a small number of cases, a mixture of inactive and active forms of the disease, or with patients

treated with immunosuppressive or cestocidal drugs. There are no studies on the proliferative response of human cells against specific antigens.

Here, the present study reports the results of a case-control study of active, untreated cases of NCC. Several general blood and T-cell markers were analyzed, as well as the proliferative response to concanavalin A (Con A), a crude parasite antigen, and 4 cytokines produced by peripheral blood mononuclear cells (PBMCs).

MATERIALS AND METHODS

Patients and controls

Thirty-seven adult patients with active NCC were recruited between 1996 and 1998 in the Neurocysticercosis Clinics of a tertiary care Hospital of the Security System of Mexico. All patients had cystic NCC, with vesicles in the brain parenchyma, subarachnoid space, or ventricles; only 3 presented radiologic enhancement around the cysts. Some cases had a mixed infection, with cysts in 2 or more locations. The patients included 26 males and 11 females, with a mean age (\pm SD) of 41 (\pm 14) yr. Diagnosis and localization of the parasites were confirmed by magnetic resonance (MR) (Teitelbaum, 1990) and computed tomography (CT) (Rodacki et al., 1989), and supported by determination of specific antibodies by enzyme-linked immunosorbent assay and western blot in serum and CSF (Espinoza et al., 1986; Tsang et al., 1989; Wilson et al., 1991). The patients had not received treatment with cestocidal or immunosuppressive drugs before blood samples were obtained. A control group was chosen from healthy volunteers. This group included 24 males and 13 females, with a mean age (\pm SD) of 38 (\pm 14) yr.

Biologicals

A crude antigen of *T. solium* cysticerci (CE) was prepared with parasites removed from infected pigs, using a modified procedure of Espinoza et al. (1986). Cysts were washed and minced in phosphate-buffered saline containing the following protease inhibitors (all from Sigma-Aldrich; St. Louis, Missouri): 0.006% phenylmethylsulfonyl fluoride; 0.04% *p*-hydroxymercuribenzoate; 1 μ g/ml *N*-tosyl-L-phenylalanine-chloromethylketone; 1 μ g/ml *N* α -*p*-tosyl-L-lysine chloromethylketone; 5 mM ethylenediaminetetraacetic acid; 4 μ g/ml leupeptin. Afterward, repeated cycles of freeze-thawing and sonication at 7 Hz were performed until homogenization was complete. Following centrifugation at 20,000 g, the supernatant fraction was stored in aliquots at -20 C. Culture grade Con A was purchased from Sigma-Aldrich.

Isolation of PMBCs

Twenty milliliters of whole blood were collected by venopuncture in sterile heparinized Vacutainer tubes. PBMCs were isolated by centrifugation over ficoll-hypaque density gradients, according to manufacturer's instructions (Sigma-Aldrich). Cells washed with Hank's balanced salt solution (Gibco BRL, Grand Island, New York) were resuspended

Received 19 April 2000; revised 6 October 2000; accepted 6 October 2000.

* Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, México. Av. Cuauhtémoc 330, Col. Doctores, C.P. 06720, México D.F., México.

† Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Interior S/N, Ciudad Universitaria, C.P. 04510, México DF, México.

‡ Centro de Investigación Sobre Enfermedades Infecciosas, Instituto Nacional de Salud Pública, Secretaría de Salud, México. Av. Universidad 655, Col. Sta. María Ahuacatlán, C.P. 62508, Cuernavaca, Morelos, México.

§ Corresponding author.

TABLE I. Response (PI) to mitogen and immunophenotype results.

Variable	Group	Median	Mean	Standard deviation	P
PI	Patients	139.5			0.238*
Con A	Controls	66.1			
CD4	Patients		742.0	289.7	0.20†
(No./ml)	Controls		841.9	325.9	
CD8	Patients		485.7	225.3	0.35†
(No./ml)	Controls		539.6	233.3	
CD4/CD8	Patients		1.7	0.7	0.96†
	Controls		1.8	0.8	
CD4/CD3	Patients		0.6	0.1	0.84†
	Controls		0.6	0.1	
CD8/CD3	Patients		0.4	0.1	0.91†
	Controls		0.4	0.1	

* Mann-Whitney U-test.

† Student's *t*-test.

in RPMI-1640 medium (Gibco), supplemented with 15% heat-inactivated fetal bovine serum (Gibco), 50 mM 2-mercaptoethanol, 200 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 0.1 mM non-essential amino acids, and 1% antimycotic (PPL0)(Gibco). Cell viability was assessed by 0.04% trypan blue exclusion.

Proliferation assays

Cells were cultured (300,000/well) in 96-well flat-bottom plates (Costar, Cambridge, Massachusetts), containing supplemented RPMI-1640 medium. Proliferation was tested with Con A at 5 µg/ml, or CE at 10, 20, or 30 µg/ml. Control wells contained medium alone. Cells were incubated at 37 C in a 95% air-5% CO₂ atmosphere for 72 hr with Con A and 96 hr with the antigen. One µCi/well of ³H-thymidine (Amersham France, Les Ulis Cedex, France) was added to the cultures and incubated for an additional 18 hr. Cells were harvested on glass fiber filters and processed for scintillation counting. The proliferation index (PI) was calculated by dividing the mean cpm of experimental wells (in quintuplicate) by the mean cpm of the cells cultured in medium alone.

Cytokine mRNA detection

The expression of IL-2, IL-10, interferon (IFN)-γ, and IL-4 genes was investigated using the reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). Total RNA was extracted with commercial Trizol (Gibco) from 500,000 PBMCs. Reverse-transcription into cDNA was performed with the First Strand cDNA Synthesis Kit (Gibco), according to manufacturer's instructions. As a positive control, 10% of the resulting cDNA mixture was amplified with forward and reverse primers specific for the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase housekeeping gene (supplied with the kit). Forward and reverse primers specific for IL-2, IL-10, IFN-γ, and IL-4 genes were synthesized based on the sequences reported by Yamamura et al. (1991).

One-tenth of the cDNA mixture of each sample was amplified using 30 pmol of the cytokine-specific primers and 1 U of *Taq* polymerase (Boehringer Mannheim, Indianapolis, Indiana) in a total volume of 25 µl by 40 cycles. Denaturation and extension phases were performed for 1 min at 94 C and 72 C, respectively. Annealing temperature was different for each cytokine, i.e., 68 C for IL-2, 55 C for IL-10, 60 C for IFN-γ (1 min), and 58 C for IL-4 (40 sec). PCR products were analyzed by electrophoresis in 7.5% polyacrylamide gels and visualized by ethidium bromide staining on a UV transilluminator.

Blood and T-cell parameters

Quantitative analysis of blood cell counts was performed by the automated QBC system (Becton Dickinson, San Jose, California). Lymphocyte CD3, CD4, and CD8 markers were quantified by immunofluorescence of whole blood using fluorescence-activated cell sorting count kits and specific monoclonal antibodies following manufacturer's instructions (Becton Dickinson).

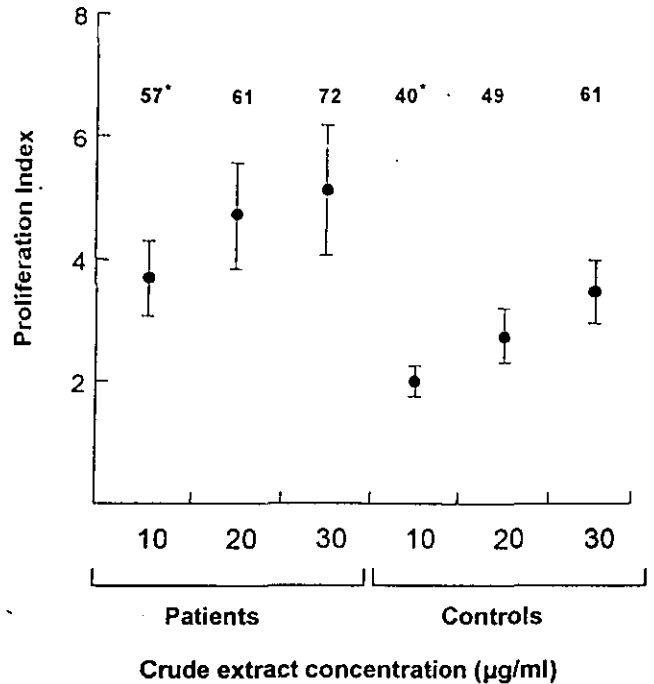


FIGURE 1. Proliferative response against *Taenia solium* crude extract. Dots represent mean of 37 individuals and bar standard error. The numbers above are the percentage of responders, taking a PI = 2.0 as the cutoff point. **P* = 0.057 by Mann-Whitney U-test.

Statistical analysis

Distributions were compared by Student's *t*-test or Mann-Whitney U-test using EPI-INFO software (CDC/WHO-PAHO). Associations among variables or differences in proportions were examined by Fisher's exact test.

RESULTS

The present study was performed to analyze the cellular immune response of 37 patients with active and untreated NCC. Thirty-two patients presented multiple lesions, located in the subarachnoid space (15), the parenchyma (4), the ventricles (7), or multiple sites (11). No patient showed signs of immunosuppression as they did not present recurrent infections. Normal values of absolute and differential white cell counts, CD3⁺, CD4⁺, and CD8⁺ cell numbers, or of proliferative response to Con A were observed (Table I).

When the proliferative response was tested against the CE, both the proportion of positive individuals and the PI were larger in patients than in controls, although there were no statistically significant differences (Fig. 1).

Also investigated were IL-2, IFN-γ, IL-4, and IL-10 mRNA synthesis by PBMCs. As can be seen in Figure 2, a similar frequency of mRNA synthesis was observed in both groups. IFN-γ, IL-4, and IL-10 were expressed in lower proportions: IFN-γ was slightly more prevalent among cases while a larger proportion of controls produced IL-10 and IL-4. Nevertheless, no statistical difference between groups was observed.

All patients with a single parasite and 58% of those with multiple lesions produced IL-2 mRNA. Conversely, IL-10 mRNA was produced only by patients with multiple cysticerci.

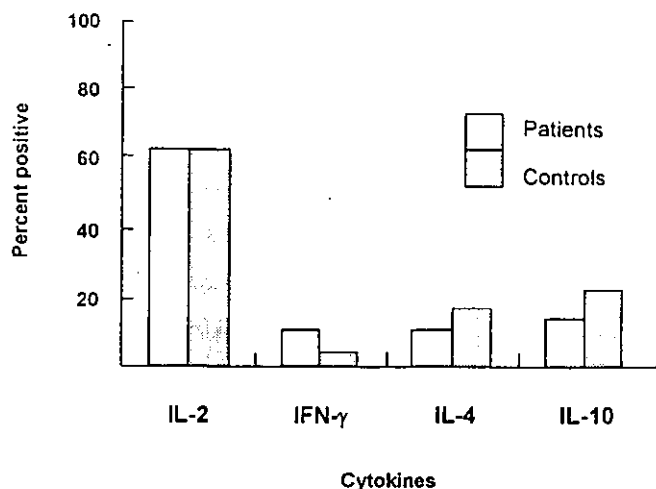


FIGURE 2. Cytokine mRNA synthesis in patients and controls.

IFN- γ mRNA was produced by some of the group patients with subarachnoid cysticercosis.

DISCUSSION

Few studies have been published regarding the cellular response in human cysticercosis. Some early investigations suggested depressed immunity in the patients, because low proliferation of PMBCs to mitogens (phytohemagglutinin and Con A) was observed (Correa et al., 1989). Herein, it is shown that most patients with NCC respond to Con A and parasite antigens, and that their white cell, CD3⁺, CD4⁺, and CD8⁺ counts are not different from those of normal subjects. Thus, a general state of immunodepression was not observed in active, untreated cysticercosis.

The control subjects presented a proliferative response to the CE. This could be due to a mitogenic component present among parasite products, as it has been suggested for different cestodes (Sealy et al., 1981; Rakha et al., 1991). An alternative explanation is that healthy responders had been in contact with this parasite and mounted a protective immune response, or that they have suffered other diseases caused by parasites that cross-react with *T. solium* (Espinoza et al., 1986; Olivo et al., 1988; Larralde et al., 1989).

Most patients were also able to produce IL-2. This is also in contrast to findings in experimental models, because *Taenia taeniaeformis* cyst culture supernatants decrease IL-2 synthesis by rat spleen cells (Burger et al., 1986), and with *T. solium* cysticerci small RNA is proposed to inhibit IL-2 production by murine cells (Tato et al., 1995). When the production of IL-2 by patients was analyzed, all those harboring a single lesion were found to produce this cytokine, whereas a lower proportion of those with multiple cysts did. This suggests that parasite burden may determine the concentration of the IL-2 inhibitory factor mentioned above. Another possible explanation is that the parasites lodged within the brain are in an immunologically privileged site (Barker and Billingham, 1977), thus the parasites are not in direct contact with the systemic immune system.

The role of the Th1/Th2 balance upon resolution of the human disease is not clear. The present data suggest that both Th1

and Th2 cytokines can be found, although IL-2, related to a Th1 response, is predominant in the case of patients with untreated naive neurocysticercosis. Thus, a Th1 type of response would be present when the host-parasite relationship is closer to equilibrium. Th2 cytokines would be more related to destruction of the parasite, because increased levels of IL-6 were found in the CSF of patients with inflammatory NCC (Ostrosky-Zeichner et al., 1996), i.e., during the process of parasite elimination. It is known as well that the cellular events that lead to cysticerci elimination in pigs are related to an eosinophil-driven destruction of the tegument, followed by a macrophage/lymphocyte infiltration (Aluja and Vargas, 1988; Flisser et al., 1990). Moreover, Robinson et al. (1997) found that early granulomas, i.e., when the parasite is intact, are predominantly associated with a Th1 response against *Taenia crassiceps* metacystodes, whereas later granulomas, in which parasite destruction is complete, have a Th1/Th2 mixed profile. In a few cases, Restrepo et al. (1998) also found Th1 and Th2 types of cytokines at the host-parasite interface in human brains with surrounding inflammation, and Evans et al. (1998) found increased levels of IL-5 in serum and CSF, as well as eotaxin, in the sera of NCC patients.

In conclusion, it is suggested that in noninflammatory, active NCC, the patients are not systemically immunodepressed, that a Th1-related cytokine profile prevails, and that a shift to eosinophilic cytokine synthesis would be responsible for inflammation and parasite destruction.

ACKNOWLEDGMENTS

We are thankful to Monica Hernández and Berenice Valenna-Tapia for technical assistance. To Victor Tsang, Patricia Wilkins, Ana Flisser, and Clinton White for critical review of the manuscript and to Molly White for review of English spelling. This project was partially supported by grants 1387-M9507 (D.C.) and L0042-M9607 (J.P.L.) from the National Council of Science and Technology of Mexico (CONACYT).

LITERATURE CITED

- ALUJA, A. S., AND G. VARGAS. 1988. The histopathology of porcine cysticercosis. *Veterinary Parasitology* 28: 65-77.
- BARKER, C. F., AND R. E. BILLINGHAM. 1977. Immunologically privileged sites. In *Advances in immunology*, H. G. Kunkel and F. J. Dixon (eds.), Academic Press, New York, New York, p. 1-54.
- BURGER, C. J., Y. RIKIHISA, AND Y. C. LIN. 1986. *Taenia taeniaeformis* inhibition of mitogen induced proliferation and interleukin-2 production in rat splenocytes by larval *in vitro* products. *Experimental Parasitology* 62: 216-222.
- CORREA, D., A. TOVAR, B. ESPINOZA, A. PLANCARTE, AND A. FLISSER. 1989. Cisticercosis humana: Relación inmunológica huésped-parásito. In *Cisticercosis humana y porcina, su conocimiento e investigación en México*, A. Flisser and F. Malagon (eds.), Limusa-Noriega, México D.F., México, p. 31-43.
- DEL BRUTO, O. H., N. H. WADIA, M. DUMAS, M. CRUZ, V. C. TSANG, AND P. M. SCHANTZ. 1996. Diagnostic criteria for human cysticercosis. In *Teniasis/cysticercosis por T. solium*, H. H. García and S. M. Martínez (eds.), Editorial Universo, S.A. Lima, Perú, p. 133-138.
- ESPINOZA, B., G. RUIZ-PALACIOS, A. TOVAR, M. SANDOVAL, A. PLANCARTE, AND A. FLISSER. 1986. Characterization by enzyme linked immunosorbent assay of the humoral immune response in patients with neurocysticercosis and its application in immunodiagnosis. *Journal of Clinical Microbiology* 24: 536-541.
- EVANS, C. A. W., H. H. GARCÍA, A. HARTNELL, R. H. GILMAN, P. J. JOSE, M. MARTÍNEZ, D. G. REMICK, T. J. WILLIAMS, AND J. S. FRIEDLAND.

1998. Elevated concentration of cotaxin and interleukin-5 in human neurocysticercosis. *Infection and Immunity* **66**: 4522-4525.
- FLISSER, A., D. GONZALEZ, M. SKUROVICH, I. MADRAZO, D. CORREA, J. RODRIGUEZ-CARBAJAL, S. COHEN, E. RODRIGUEZ-DEL ROSAL, M. COLLADO, B. FERNÁNDEZ, F. FERNÁNDEZ, AND A. S. ALUJA. 1990. Praziquantel treatment of porcine brain and muscle *Taenia solium* cysticercosis. I. Radiological, physiological and histopathological studies. *Parasitology Research* **76**: 263-269.
- . I. MADRAZO, AND H. DELGADO. 1997. *Cisticercosis humana*, 1st ed. El Manual Moderno, México D.F., México, 176 p.
- . E. WOODHOUSE, AND C. LARRALDE. 1980. Human cysticercosis: Antigens, antibodies and non-responders. *Clinical and Experimental Immunology* **39**: 27-37.
- JUDSON, D. G., J. B. DIXON, AND G. C. SKERRITT. 1987. Occurrence and biochemical characterization of cestode lymphocyte mitogens. *Parasitology* **94**: 151-160.
- LARRALDE, C., R. M. MONTOYA, E. SCIUTTO, M. L. DÍAZ, T. GOVEZENSKY, AND E. COLTORTI. 1989. Deciphering western blots of tapeworm antigens (*Taenia solium*, *Echinococcus granulosus* and *Taenia crassiceps*) reacting with sera from neurocysticercosis and hydatid disease patients. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **40**: 282-290.
- MOLINARI, J. L., P. TATO, AND Y. VALLES. 1987. Inmunodepresión de linfocitos T en cerdos modulado por *Cysticercus cellulosae*. *Revista Latinoamericana de Microbiología* **29**: 293-300.
- OLIVO, A., A. PLANÇARTE, AND A. FLISSER. 1988. Presence of antigen B from *Taenia solium* cysticercus in other platyhelminthes. *International Journal for Parasitology* **18**: 543-545.
- OSTROSKY-ZEICHNER, L., E. GARCÍA-MENDOZA, C. RÍOS, AND J. SOTELO. 1996. Humoral and cellular immune response within the subarachnoid space of patients with neurocysticercosis. *Archives of Medical Research* **27**: 513-517.
- RAKHA, N. K., J. B. DIXON, P. JENKINS, S. D. CARTER, G. C. SKERRITT, AND S. MARSHALL-CLARKE. 1991. Modification of cellular immunity by *Taenia multiceps* (Cestoda): Accessory macrophage and CD4+ lymphocytes are affected by 2 different coenurus factors. *Parasitology* **103**: 139-147.
- RESTREPO, B., P. LLAGUNO, M. A. SANDOVAL, J. A. ENCISO, AND J. M. TEALE. 1998. Analysis of immune lesions in neurocysticercosis patients: Central nervous system response to helminth appears Th1-like instead of Th2. *Journal of Neuroimmunology* **89**: 64-72.
- ROBINSON, P., R. ATMAR, D. LEWIS, AND A. C. WHITE, JR. 1997. Granuloma cytokines in murine cysticercosis. *Infection and Immunity* **65**: 2925-2931.
- RODACKI, M. A., X. A. DETONI, W. R. TEIXEIRA, V. H. BOER, AND G. G. OLIVEIRA. 1989. CT features of Cellulosae and Racemosus neurocysticercosis. *Journal of Computer Assisted Tomography* **13**: 1013-1016.
- SEALY, M., C. RAMOS, K. WILLMS, AND L. ORTIZ-ORTIZ. 1981. *Taenia solium*: Mitogenic effect of larval extracts on murine B lymphocytes. *Parasite Immunology* **3**: 299-307.
- TATO, P., A. M. CASTRO, D. RODRIGUEZ, R. SOTO, F. ARECHAVALETA, AND J. L. MOLINARI. 1995. Suppression of murine lymphocyte proliferation induced by a small RNA purified from the *Taenia solium* metacestode. *Parasitology Research* **81**: 181-187.
- TEITELBAUM, G. P. 1990. Metallic ballistic fragments: MR imaging safety and artifacts. *Radiology* **177**: 883.
- TSANG, V. C. W., J. A. BRAND, AND A. E. BOYER. 1989. An enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay and glycoprotein antigens for diagnosis of human cysticercosis (*Taenia solium*). *Journal of Infectious Diseases* **159**: 50-59.
- WILSON, M. R. T., J. A. BRYAN, D. A. FRIED, P. WARE, J. B. SCHANTZ, V. PILCHER, AND C. W. TSANG. 1991. Clinical evaluation of the cysticercosis enzyme-linked immunoelectrotransfer blot in patients with neurocysticercosis. *Journal of Infectious Diseases* **164**: 1007-1009.
- YAMAMURA, M., K. UYEMURA, R. J. DEANS, K. WEINBERG, T. H. REA, B. R. BLOOM, AND R. L. MODLIN. 1991. Defining protective responses to pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions. *Science* **254**: 277-279.