

11281

27



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS

FACULTAD DE MEDICINA

Taenia solium: evaluación de las enzimas
Triosa Fosfato Isomerasa y Gliceraldehído
3-Fosfato Deshidrogenasa recombinantes en
protección

TESIS

Que para obtener el grado de
DOCTORA EN CIENCIAS

p r e s e n t a

LUCIA JIMENEZ GARCIA

Director de Tesis: Dr. Abraham Landa Piedra

Cd. Universitaria D. F. México 2002



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.

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis fue realizada bajo la asesoría del Dr. Abraham Landa en el Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina de la UNAM. El proyecto fue apoyado mediante un donativo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología México con número de contrato 35333M, un donativo otorgado por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (PAPIIT-UNAM IN218198), además se otorgó una beca completa para estudios de doctorado y dos apoyos para estudios de doctorado (PAEP 12301 y 102338) por parte de la Dirección General de Estudios de Posgrado de la UNAM.

Agradezco especialmente al Dr. Alejandro Fernández Velasco, profesor del departamento de bioquímica de la Facultad de Medicina de la UNAM por su asesoría en los ensayos de purificación y actividad enzimática de la triosa fosfato isomerasa.

INDICE GENERAL

Resumen	1
Abstract	2
Abreviaturas	3
I. Introducción	5
Ciclo de vida	5
Generalidades del parásito	6
Importancia	6
Diagnóstico y Tratamiento	7
Prevención y Vacunas	9
II. Características de la TPI y la GAPDH	12
Glicólisis	12
Triosa fosfato isomerasa	12
Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa	13
III. Hipótesis	15
IV. Objetivo	15
Objetivos particulares	15
V. Materiales y métodos	16
Materiales	16
Métodos	17
a) Obtención de RNA y cDNA de cisticercos de <i>T. solium</i>	17
b) Amplificación de DNA, reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	18
c) Marcaje de sondas radiactivas de DNA	18
d) Tamizaje de la biblioteca y aislamiento de clonas	18
e) Preparación de DNA de clonas positivas	19
f) Preparación de DNA genómico	20
g) Reacciones de digestión con endonucleasas	20
h) Reacción de ligado	20

i)Transformación	21
j)Reacción de secuencia	21
k)Southern y Northern blot	22
l)Clonación en el vector de expresión y producción de las enzimas recombinantes	22
m)Caracterización bioquímica	23
n)Producción de anticuerpos policlonales e inmunoelctrotransferencia	24
ñ)Ensayos de vacunación	24
o)Determinación de los isotipos de anticuerpos	25
VI. Resultados	26
Obtención de las sondas	26
Obtención de clonas	26
Mapa de restricción de los fragmentos de cDNA	26
Caracterización de los cDNAs	26
Caracterización de fragmentos genómicos	27
Comparación basada en la secuencia de la TPI y la GAPDH	28
Análisis tipo Southern y Northern blot	28
Expresión y purificación de las enzimas recombinantes	29
Actividad enzimática de las enzimas recombinantes	29
Estabilidad a la dilución	30
Inhibición por anticuerpos	30
Ensayos de vacunación	30
Respuesta inmune humoral en los animales vacunados	31
VII. Discusión	32
VIII. Conclusiones	38
IX. Apéndices	39
X. Referencias	43

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue evaluar si enzimas que participan en la glicólisis de *Taenia solium*, confieren protección en contra de la cisticercosis murina (*Taenia crassiceps*-ratón). Los cDNAs que codifican para la triosa fosfato isomerasa y la gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa fueron aislados y expresados en un sistema bacteriano. El análisis de su secuencia mostró que los cDNAs que codifican para estas enzimas son homólogos a los reportados para otros organismos, y que los sitios catalíticos y aminoácidos que participan en la actividad, se mantienen conservados.

Análisis tipo Southern y Northern blot sugieren genes de copia única para la TPI y la GAPDH y análisis de la secuencia nucleotídica de fragmentos amplificados a partir de DNA genómico, mostraron que estos genes están interrumpidos por intrones.

Se produjeron las enzimas recombinantes del tipo silvestre y fusionadas a histidinas en *E. coli*, las cuales fueron purificadas por cromatografías combinadas de filtración e intercambio iónico. Los análisis bioquímicos mostraron una proteína de 27 kDa para la TPI y una de 37 kDa para la GAPDH, además ensayos enzimáticos demostraron que la TPI es funcionalmente activa en sus dos formas (tipo silvestre y fusionada a histidinas), pero la tipo silvestre presentó el doble de actividad. La actividad de la enzima es inhibida en un 75% por anticuerpos policlonales de manera dependiente de concentración. Desafortunadamente la GAPDH no presentó actividad enzimática.

Ensayos previos de vacunación en un modelo murino de cisticercosis fueron realizados para establecer el dosis de enzima y adyuvantes. Una vez establecidos estos parámetros se realizaron ensayos de vacunación que muestran que la TPI es capaz de reducir la carga parasitaria en los animales vacunados en un 50% cuando son sacrificados un mes después de la infección. En contraste cuando los ratones se sacrifican a los dos meses de infección la protección disminuye. En el caso de la GAPDH, la enzima no fue capaz de conferir protección en los ratones vacunados. En ambos casos los ratones vacunados montaron respuesta inmune humoral del tipo IgG. Este trabajo es el primero en caracterizar enzimas glicolíticas de un céstodo.

ABSTRACT

Our goal was to evaluate the capacity of *Taenia solium* glycolytic enzymes to confer protection against murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*-mouse). In order to test it, full-length cDNA clones encoding for triosephosphate isomerase and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase were isolated, cloned and expressed in a bacterial expression system.

The recombinant enzymes were used for biochemical characterisation and vaccination assays. Analysis of the clones showed that the recombinant enzymes are homologues to other TPI and GAPDH, likewise the amino acids involved in the catalytic site are well conserved. Southern and Northern blot analysis suggest that the genes encoding for this enzymes are presented as single copy in the genome of *T. solium*. Moreover, analysis of the nucleotide sequence of the PCR fragments obtained using genomic DNA, indicates that these genes are interrupted by intrones. Two forms of recombinant enzymes were produced (Wild type and histidinas-fused form) and purified by filtration and ion-exchange chromatography. The biochemical analysis show a 27 kDa protein to TPI and a 37 kDa protein to GAPDH. The two forms of recombinant TPI were functional, however the wild type recombinant enzyme has twice the activity of the histidinas-fused form. Polyclonal antibodies against the TPI can reduce the catalytic activity 75% in a concentration dependent manner. Unfortunately, the recombinant GAPDH was not functional.

Different vaccination assays in a murine cysticercosis model were carried out in order to establish the doses and adjuvant. Vaccination assays in the murine model using the TPI with saponine as adjuvant were able to reduce the parasitic burden 50% in the vaccinated mice after one month infection. In contrast, the enzyme lost the capability to reduce parasite burden in similar assays two months after infection. The GAPDH is does not protect against the infection. Both enzymes induce humoral immune response of IgG type.

This is the first characterisation of glycolytic enzymes in a cestode.

ABREVIATURAS

μ l	microlitros
μ g	microgramos
μ J	microjules
μ m	micromolar
cm	centímetros
mM	milimolar
mg	miligramos
ml	mililitros
mm	milímetros
min	minutos
ng	nanogramos
nm	nanomolar
h	horas
pM	picomolar
pb	pares de bases
seg	segundos
kDa	kilodaltons
km	constante de Michaelis Menten
kb	kilobases
UV	ultravioleta
cdNA	ácido desoxirribonucleico complementario
ATP	adenosín trifosfato
RNA _m	ácido ribonucleico mensajero
BSA	albúmina sérica bovina
C1, 2	carbono 1, 2
°C	grados centígrados
DTT	ditiotreitól
DO	densidad óptica

EDTA	ácido etilendiamino tetracético
ELISA	ensayo inmunoenzimático
IET	inmunolectrotransferencia
Fig	figura
IgG	inmunoglobulina G
IPTG	isopropil tio- β -D-galactosidasa
L	litro
M	molar
Mabs	anticuerpo monoclonales
MAPS	múltiples péptidos antigénicos
NAD	nicotinamida adenín dinucleótido
NCC	neurocisticercosis
PBS	amortiguados de fosfatos salino
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
RM	resonancia magnética
SDS	dodecil sulfato de sodio
Tc	tomografía computarizada
Th	linfocitos T cooperadores
U	unidades
V max	velocidad máxima

I. INTRODUCCION

La cisticercosis es una enfermedad provocada por el establecimiento de la forma larvaria del céstodo *Taenia solium* en los tejidos de sus hospederos intermediarios. Esta parasitosis es una de las más importantes desde el punto de vista de salud pública y económico. Cuando se localiza en el sistema nervioso central puede ocasionar severas manifestaciones clínicas y algunas veces resulta mortal. (Damonte y col., 1983). Actualmente, se está considerando a la zoonosis como una enfermedad emergente a nivel mundial (Sciutto y col., 2000). El hospedero intermediario natural de *T. solium* es el cerdo, pero también puede infectar accidentalmente al hombre en quien se han reportado cisticercos localizados en tejido subcutáneo, músculo esquelético, corazón, retina y en el cerebro donde constituyen la entidad clínica más importante de esta enfermedad por la severidad de las manifestaciones que provoca (Davis y col., 1991).

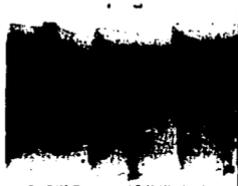
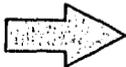
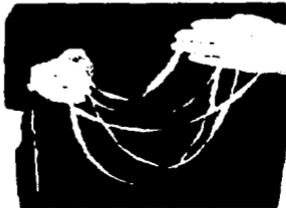
I.2.-CICLO DE VIDA

Cuando el hombre ingiere carne de cerdo mal cocida infectada con cisticercos, puede desarrollar teniosis. Al entrar la larva al tracto digestivo, las enzimas proteolíticas y sales biliares activan al parásito, el cual evagina y se adhiere a la pared del intestino delgado en donde aproximadamente en 4 meses se desarrolla hasta un gusano adulto hermafrodita, capaz de producir miles de huevos infectivos por cada proglótido. Los proglótidos grávidos en los que se encuentran los huevos infectivos se desprenden del gusano adulto y son expulsados al ambiente a través de la materia fecal donde se descomponen y liberan a los huevos. Los huevos pueden contaminar los alimentos, el aire o el agua y por esta vía se infectan los hospederos intermediarios, o bien por autoinfección en donde el individuo con teniosis sin hábitos higiénicos adecuados ingiere los huevos directamente de sus manos contaminadas. El cerdo es contaminado también debido a sus hábitos coprofágicos (Sarti y col., 1992). Cuando cerdos o humanos ingieren los huevos, los jugos gástricos y biliares degradan el embrióforo activando a la oncosfera, la cual penetra la mucosa intestinal y es transportada a diversos órganos a través del torrente sanguíneo. En 60 a 70 días la oncosfera se transforma en un cisticerco que corresponde al estadio larvario del parásito (Davis y col., 1991) (Fig 1).

S-A

Adulto en intestino humano

Proglótido grávido en el ambiente



DEFECACION



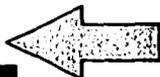
INGESTION DE CARNE CON CISTICERCOS



INGESTION DE HUEVOS



Cisticercos en cerdos y humanos



Liberación de la oncosfera

Fig 1. Ciclo de vida de *Taenia solium*.

I.3.- GENERALIDADES DEL PARASITO

El parásito presenta tres estadios de vida: el huevo, la larva o cisticerco y la tenia o adulto. Los huevos son esféricos, miden de 30 a 45 μm de diámetro y dentro se encuentra la oncosfera o embrión hexacanto (llamado así por poseer 3 pares de ganchos) envuelta en un embrióforo (**Fig 2A**).

El cisticerco tiene una pared semitransparente excepto en el área donde se encuentra el escólex, y su interior se encuentra lleno de un fluido claro denominado fluido vesicular. La pared vesicular consta de: 1.- Un tegumento externo que presenta estructuras digitiformes llamadas microtricas que probablemente amplían el área de absorción y una zona vacuolar. 2.- Una membrana basal y una capa reticular o fibrilar interna, compuesta de una red de células (musculares de tipo liso, células subsegmentales, flama y otras células que forman canales y cuerpos calcáreos). El área del parénquima del cisticerco contiene un canal espiral en cuya parte final se encuentra el escólex invaginado (**Fig 2B**).

El adulto es un gusano plano segmentado compuesto de: a) El escólex de aproximadamente 1 mm de diámetro con 4 ventosas y un rostelo armado con una doble corona de ganchos. b) El cuello corto y sin segmentaciones, y c) El estróbilo que consta de proglótidos fusionados. Los proglótidos cercanos al cuello son jóvenes e indiferenciados, en la región media son maduros, cortos y contienen los órganos reproductores y al final se encuentran los proglótidos grávidos llenos de huevos (**Fig 2C**) (Davis y col., 1991; White y col., 1992).

I.4.-IMPORTANCIA

Cuando los cisticercos se localizan en el sistema nervioso central donde la enfermedad es conocida como neurocisticercosis (NCC) se pueden presentar patologías que varían en intensidad y gravedad dependiendo del número de parásitos y de su localización y en algunas ocasiones derivan en muerte. Se considera la enfermedad neurológica por parásitos más importante y una causa común de epilepsia en países de África, Asia y Latinoamérica (Roman y col., 2000).

Se estima que en México el rango de infección puede llegar hasta el 3% de la población en general (Larralde y col., 1992). Entre el 2 y 3% de las autopsias practicadas en el Hospital General de México entre 1953 y 1984 presentaron cisticercosis (Villagrán-Urbe, 1989).

La migración masiva de personas de zonas endémicas a países no afectados por la enfermedad, ha causado la aparición de casos de cisticercosis en ciudadanos locales que han tenido contacto con portadores de tenia (del Brutto. 1999, Antoniuk. 1999).

6-17

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

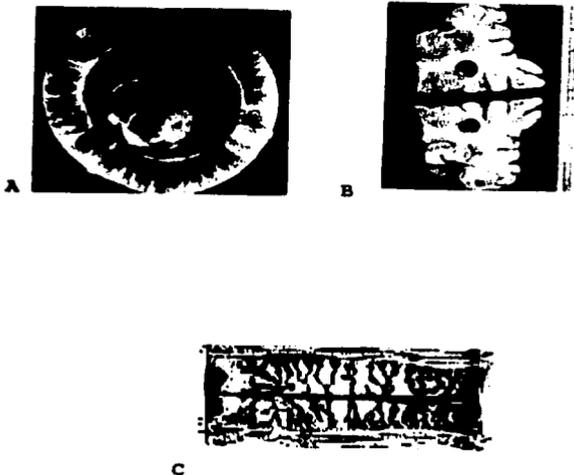


Fig. 2. A.- Microscopía de barrido de huevo donde se observan el embrioforo (EC), y la oncosfera (O) con las flechas se señalan los ganchos. B.- Cisticercos en parénquima cerebral. C.- Proglótido grávido de tenia. Imágenes tomadas de: Botero y Restrepo, 1998, Lacleite y col., 1982, Faust y col 1981.

En el caso de la cisticercosis porcina, los cerdos infectados generalmente pertenecen a comunidades de escasos recursos, son mantenidos en condiciones de poca higiene e inspección y sacrificados en casa o rastros clandestinos. Esto es una fuente importante para la adquisición de la teniosis, que por ser generalmente asintomática pasa desapercibida en la mayoría de los casos, lo que contribuye a mantener el ciclo de vida del parásito. (Acevedo, 1989).

La cisticercosis humana es una enfermedad de notificación obligatoria desde 1979 (Darmonte, 1983). En 1984 se estableció el Programa Prioritario para el Control y Erradicación de la teniosis-cisticercosis causada por *T. solium* (Secretaría de Salud, Diario Oficial de la Federación, 1984).

La NCC se clasifica en NCC activa (si los cisticercos están vivos) o NCC inactiva (si están calcificados) (Sotelo y col., 1985). En la forma activa, los cisticercos pueden causar aracnoiditis, hidrocefalia obstructiva, compresión del cordón espinal, hipertensión endocraneana y ependimitis. En los casos de NCC inactiva, hay inflamación granulomatosa e hidrocefalia como resultado de la respuesta inmune causada por la muerte del cisticerco. Es común encontrar estos 2 tipos de NCC en un paciente y cuando se encuentran localizadas en el parénquima el síntoma más común es la epilepsia (Botero, 1993). Un estudio reciente (Herrera y col., 2000) propone la asociación de cisticercosis y cáncer, ya que se determinó que en pacientes infectados con cisticercos, las aberraciones cromosómicas y la formación de micronúcleos en linfocitos periféricos fue mayor en comparación con muestras de pacientes sanos.

I.6.-DIAGNOSTICO Y TRATAMIENTO

a) Diagnóstico

La confirmación definitiva de la infección se realiza aislando al parásito del órgano afectado por medio de cirugía. Sin embargo, se cuenta con un gran avance en métodos diagnósticos como los de imagen y los inmunológicos. Los de imagen como la tomografía computarizada y la resonancia magnética, tienen alta resolución y sensibilidad, pero no son 100% específicos (García col., 1994, Creasy y col., 1994). Estos métodos son costosos y sólo están disponibles en algunos centros hospitalarios, resultando inaccesibles para la mayoría de los pacientes de los países más afectados (Davis y col 1991; Botero y col., 1993).

Entre los métodos inmunológicos más usados se encuentran el ensayo inmunoenzimático (ELISA) (Larralde y col., 1986; Lee y col., 1993; Yong y col., 1993), y la inmunoelectrotransferencia IET (Gottstein y col., 1986; Tsang y col., 1989; Larralde y col., 1989; Wilson y col., 1991). Estas técnicas varían en sensibilidad y especificidad de acuerdo al material biológico usado (suero, líquido cefalorraquídeo) y al antígeno empleado. Entre los antígenos se encuentran: extractos crudos de cisticercos completos (Rosas y col., 1986), homogeneizados de

membranas o de escólex (Feldman, 1990), fluido vesicular del cisticerco (Larraide y col., 1994; Kong y col., 1992), antígenos aislados (Groggl y col 1985, Gottstein, y col., 1986, Greene y col., 1999, Plancarte y col., 1999, Greene y col., 2000), péptidos inmunodominantes (Hernández y col., 2000). Antígenos fraccionados por isolectroenfoque (Ito y col., 1998).

Sin embargo, un estudio reciente demuestra que en los casos de cisticercosis en cerdos rurales con baja carga parasitaria, los métodos de ELISA con anticuerpos o con antígenos, así como la IET y la inspección de lenguas tienen baja sensibilidad y especificidad (Sciutto y col., 1998)

b) Tratamiento

Como el humano es el único hospedero definitivo del parásito, la quimioterapia se considera una buena opción para su erradicación. Actualmente se cuenta con drogas capaces de destruir a los parásitos (Allan y col., 1997).

Comúnmente se utiliza albendazol o praziquantel cuando los cisticercos son viables y se localizan en el parénquima. Sin embargo, este tipo de fármacos provocan efectos secundarios, la sintomatología clínica se exagera, por lo que deben administrarse con corticoesteroides (White y Garcia 1999). Estos medicamentos son caros, además helmintos como el *Schistosoma* han comenzado a adquirir resistencia al praziquantel (Liang y col., 2001). Algunos estudios muestran que aunque este medicamento disminuye el número de parásitos, no destruye a todos y los que permanecen muestran el mismo grado de viabilidad antes y después del tratamiento, y no se genera inmunidad en contra de la reinfección (Lightowlers, 1999). Los efectos secundarios de los fármacos a largo plazo no han sido estudiados, pero se ha observado que el praziquantel ocasiona la pérdida de material genético en una línea celular, mientras que el albendazol induce el retraso de la cinética de proliferación de linfocitos de sangre periférica en humanos (Herrera y col., 2000). Se están probando nuevos fármacos como el Oxfendazol que ha mostrado ser 100% efectivo y con este fármaco no se observaron efectos secundarios visibles en los cerdos tratados (González y col., 1996).

En algunos países se ha elegido la ruta del tratamiento en contra de la teniosis. En Ecuador y Guatemala las personas fueron tratadas con una dosis de praziquantel o niclosamida, disminuyendo la prevalencia de teniosis y por consiguiente la de cisticercosis tanto en cerdos como en humanos (Botero y col., 1993, Allan y col., 1997). De igual manera, el tratamiento masivo con praziquantel en contra de la teniosis en una comunidad mexicana, redujo en un 42% la prevalencia de la parasitosis hasta 42 meses después del tratamiento (Sarti y col., 2000). También se ha propuesto a la inmunoterapia para curar la cisticercosis porcina y se ha observado que la administración de antígenos de cisticerco a cerdos infectados reduce la viabilidad de los parásitos (Evans y col., 1997).

1.8.-PREVENCIÓN Y VACUNAS

a) Prevención

La aplicación de medidas preventivas ha resultado ser una tarea difícil debido a la falta de higiene y medidas sanitarias que imperan en muchas zonas rurales endémicas de los países afectados por la enfermedad. Algunas medidas recomendadas para evitar la infección por *T. solium* son:

- a) Campañas educativas a nivel nacional que informen sobre la enfermedad, sus riesgos y la manera de prevenirla
- b) Establecimiento de la infraestructura necesaria para la eliminación correcta de las excretas humanas
- c) Inspección rigurosa de los cerdos en los rastros para evitar introducir carne infectada al mercado.
- d) Congelar varios días la carne y cocinarla bien antes de comerla.
- d) Evitar regar frutas y verduras con aguas negras (Antoniuk, 1999).

Estas medidas necesitan de una gran inversión que los países de escasos recursos no han podido costear. Como alternativa se ha propuesto la búsqueda de una vacuna en contra de la cisticercosis, el desarrollo de métodos diagnósticos eficaces para ambos estadios en el control de la enfermedad y el desarrollo de fármacos específicos. Además se ha propuesto declarar a la NCC una enfermedad de notificación internacional para implementar la intervención epidemiológica en las zonas donde se reporten los casos nuevos (Roman y col., 2000).

b) Vacunación

La vacunación en cerdos se ha considerado como uno de los métodos factibles para la erradicación de la cisticercosis. Se ha observado que es posible conferir protección contra helmintos por infecciones previas o por inmunización con extractos parasitarios (de Aluja y col., 1999; Molinari y col., 1997). Se han utilizado tanto extractos crudos como antígenos nativos y recombinantes de los diferentes estadios biológicos del parásito. Por ejemplo, al inmunizar con un extracto completo de cisticerco de *T. solium*, se ha obtenido inmunidad en contra de la cisticercosis experimental murina por *T. crassiceps* gracias a la elevada reacción cruzada entre los antígenos de ambos parásitos, lo que ha llevado a establecer un modelo de protección murino (Sciutto y col., 1990). En este modelo se ha probado la eficacia de algunos antígenos de *T. crassiceps* de reacción cruzada con *T. solium* como el KETc7 y el GK-1 (Toledo y col, 1999). A su vez, se ha tratado de inducir inmunidad a cisticercosis en cerdos inyectando extractos crudos de cisticercos completos, así como extractos de escólex de *T. solium*. Los resultados mostraron que es posible conferir protección hasta en un 75% (Molinari y cols., 1983, 1997; Nascimento y col., 1995). Además, la vacunación de cerdos con péptidos sintéticos reduce la

prevalencia de cisticercosis en un 52% y disminuye considerablemente la carga parasitaria; estos cerdos fueron criados en condiciones rurales en una zona endémica para cisticercosis (Huerta y col., 2001)

Aunque existen antígenos estadio específico (oncosfera, cisticerco, adulto), los antígenos oncosferales han sido los mejores candidatos para conferir protección en contra de las cisticercosis (Rickard y cols., 1977; Rajasekariah y cols., 1980; Osborn y cols., 1981; Lightowlers y cols., 1984; Plancarte y col., 1999). También se ha logrado expresar un antígeno recombinante preparado a partir de oncosferas de *T. ovis* que ha mostrado conferir un 94% de protección en ovejas (Smith y Johnson, 1988). Este antígeno también se ha utilizado en modelos de diferentes cisticercosis y en cerdos contra *T. solium*, además se ha empleado como sonda para aislar antígenos homólogos de este parásito. Los resultados en cerdo muestran que se logra una alta reducción de parásitos (Plancarte y col. 1999).

Diversos autores han propuesto a los antígenos altamente inmunogénicos como candidatos a vacunas, como es el caso de la paramiosina de *T. solium* que logra reducir en un 52% la carga parasitaria en ratones vacunados e infectados con *T. crassiceps* (Vazquez-Talavera y col., 2001). También se ha explorado la posibilidad de emplear enzimas importantes para el metabolismo de los parásitos como antígenos para vacunación. Por ejemplo, se han encontrado antígenos candidatos en dos importantes vías: la vía de detoxificación de radicales libres de oxígeno y la vía glicolítica. Entre los candidatos se encuentra la enzima detoxificante glutatión S-transferasa, utilizada con éxito en experimentos de vacunación contra *Schistosoma mansoni*, *S. japonicum* y *Fasciola hepática* (Smith y col., 1986, Balloul y col., 1987., Sexton y col., 1990. Panaccio y col., 1992). La glutatión S-transferasa de *T. solium* disminuye la carga parasitaria en la cisticercosis murina por *T. crassiceps* (Vibanco-Pérez y cols, 1999, 2002).

En helmintos el metabolismo de los carbohidratos es de gran importancia. El ATP que se forma en las vías catabólicas como la glicólisis, sostiene el trabajo osmótico, mecánico y sintético. Cuando los carbohidratos son degradados por la glicólisis, dos enzimas determinan el destino del fosfoenolpiruvato y la cantidad y tipo de los productos finales, la fosfoenolpiruvato carboxinas (PEPCK) y la piruvato cinasa. La PEPCK carboxila al PEP a oxaloacetato, lo que resulta en la producción de ATP y mantiene el nivel citosólico de malato, el principal sustrato mitocondrial en los helmintos. La piruvato cinasa interviene en la formación de piruvato y ATP con la subsecuente conversión de piruvato a lactato (Smith y McManus 1989).

Una de las enzimas consideradas como blanco para vacunas es la triosa fosfato isomerasa, utilizada como antígeno en contra de enfermedades parasitarias. Se ha observado que la transferencia pasiva de anticuerpos monoclonales (M.1 anti-TPI), así como la inmunización con TPI recombinante inducen un grado de protección entre el 41-49% en contra de la infección causada por los trematodos *S. mansoni* y *S. japonicum* en ratones. Asimismo, se ha demostrado que la enzima participa en la respuesta inmune de tipo Th1 en la esquistosomiasis induciendo la producción de Interleucina 2 (IL-2) e interferón gamma (IFN- γ) (Harn, y col., 1992).

En estas enzimas se han encontrado epítopes inmunogénicos que han sido probados en ensayos de generación de respuesta inmune, estos epítopes pertenecen a regiones poco conservadas entre diferentes especies y estimulan tanto respuestas inmunes T como B. También han sido utilizados para sintetizar un péptido antigénico múltiple de 4 brazos que fue empleado para inmunizar ratones de diferentes cepas, encontrándose que son capaces de generar respuestas inmunes de tipo Th1. Estos epítopes se usaron para construir un péptido antigénico múltiple en combinación con otro péptido derivado de la glutatión S-transferasa de *S. mansoni*, y fueron empleados en ensayos de protección en ratones. Ninguna de estas construcciones protegió en contra de la parasitosis a pesar de que se generaron respuestas inmunes en contra de ellos (Shoemaker, y col., 1992; Reynolds y col., 1994, Ferru y col., 1997, Yang , 2001).

La gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa se ha relacionado con resistencia a la infección. En poblaciones brasileñas y egipcias se encontró que los individuos resistentes a la infección con *S. mansoni*, *S. japonicum* y *S. hematobium*, habían generado altos títulos de anticuerpos contra esta enzima, mientras que individuos susceptibles no presentaban estos anticuerpos (Dessein y col, 1988, Goudot-Crozel y col., 1989 Waive y col., 1993, El Ridi y col, 1998). De hecho se ha identificado un determinante antigénico para células B altamente reactivo con sueros de pacientes resistentes a la infección y en ensayos de vacunación contra la esquistosomiasis en ratones, este péptido induce hasta 38% de reducción en la carga parasitaria (Argiro y col., 2000). Este péptido en forma de péptido antigénico múltiple, asociado con otro importante péptido obtenido de un antígeno de esquistosomula, favorece la respuesta de tipo T e induce protección significativa en contra de la infección cuando se administra con el factor de estimulación de colonias de granulocitos-macrófagos, usando alumina como adyuvante (Argiro 1999, 2000).

II.- CARACTERISTICAS DE LA TPI Y LA GAPDH

II.1.-GLICOLISIS

En la glicólisis la oxidación de la glucosa a piruvato puede dividirse en 2 etapas. En la primera de ellas la molécula de glucosa es fosforilada, a expensas de 2 moléculas de ATP. La fructosa 6-bisfosfato formada se divide en 2 triosas que se procesan para producir piruvato con una ganancia neta de 2 moléculas de ATP por cada molécula de glucosa procesada (**Fig 3**), aunque se forman 4 moléculas de ATP 2 son utilizadas en los procesos de fosforilación de la glucosa y de la fructosa 6-fosfato. El destino del piruvato varía con la capacidad enzimática de la especie y la cantidad de oxígeno molecular. Los productos finales de las reacciones anaeróbicas son el lactato o el alcohol etílico, pero en presencia de oxígeno molecular el piruvato es descarboxilado y se forma Acetil- coenzima A (Avers, 1991).

II.2.- TRIOSA FOSFATO ISOMERASA

El papel de la triosa fosfato isomerasa (TPI) consiste en interconvertir a los productos generados a partir de la escisión de la fructosa 1,6-difosfato, la dihidroxiacetona fosfato (DHAP) y a su isomero D-gliceraldehído 3-fosfato (D-GAP). La DHAP no se metaboliza directamente en la glicólisis. La triosa fosfato isomerasa, cataliza la transferencia del hidrógeno pro-R del C1 de DHAP al C2 de D-GAP. Ambos compuestos existen en solución como una mezcla de especies hidratadas y libres, pero la TPI sólo utiliza las formas libres como sustrato. El mecanismo de reacción ha sido muy estudiado por diferentes técnicas tales como mutagénesis dirigida y cristalografía (Wierenga y cols., 1992). Esta enzima ha sido ampliamente caracterizada en diversos organismos en cuanto a su estructura y propiedades enzimáticas. Se trata de una enzima homodimérica cuyo monómeros pesan aproximadamente 27 kDa cada uno. Presenta ocho segmentos asa-beta-asa-hélice plegados α/β .

La TPI no utiliza cofactores o iones metálicos, los 2 sitios activos, uno en cada subunidad parecen ser cinéticamente independientes. Sin embargo, por medio de ensayos de renaturalización y de mutagénesis se ha encontrado que la actividad catalítica requiere de la asociación de los monómeros. Mientras el dímero presenta una V_{max} elevada ($3000-10000 \mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}^{-1}$) (Borchert y col., 1993, Landa y col., 1997), los monómeros separados no presentan actividad.

El ácido glutámico 165 es central en la reacción catalizada por la TPI, pues es el responsable de la extracción del protón pro-R del DHAP y la inserción del mismo en el carbono 2 en la formación de D-GAP (Alber, y col., 1981). Se ha estudiado el papel que juega la TPI en el desarrollo de diferentes organismos; se ha observado que la deficiencia de TPI en organismos heterocigotos con un alelo no

12-A

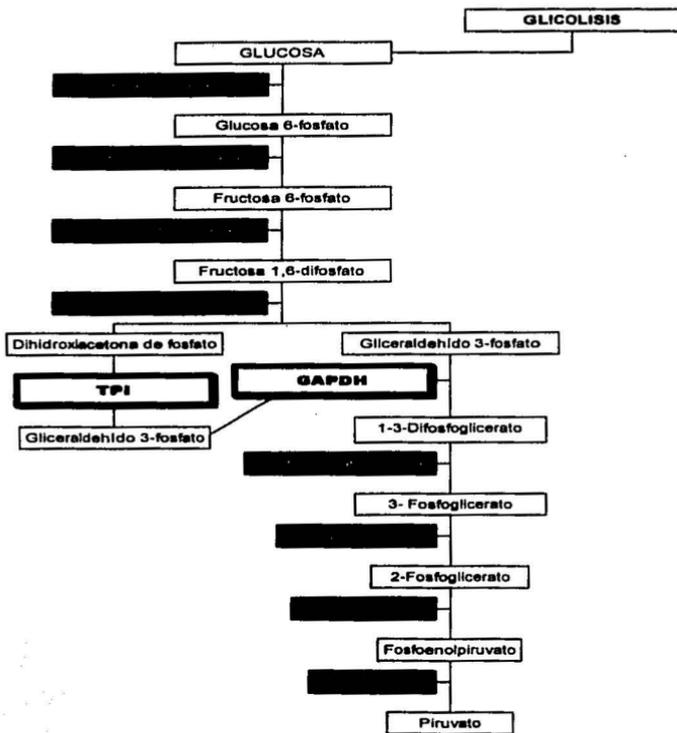


Fig 3. Vía metabólica de la glicólisis donde se muestran las enzimas (cuadros negros) y sus productos (cuadros blancos). Los cuadros blancos con bordes gruesos muestran las enzimas triosa fosfato isomerasa (TPI) y gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

funcional (menos de un 50% de lo normal) provoca complicaciones en el desarrollo, las cuales derivan finalmente en la muerte ya que la acumulación de dihidroxiacetona fosfato es tóxica (Maquat y cols., 1985). Además las alteraciones en su estructura parecen estar implicadas en enfermedades autoinmunes en humanos, relacionándose como posible causa de hemólisis por anticuerpos anti-TPI (Ritter, y col 1990, 1994; Hollan y col, 1993).

Por otro lado, las TPIs de tripanosomas y leishmania tienen diferencias importantes, con respecto a la de humano, en el área de la interfase que se forma entre los monómeros al unirse, por lo que esta región ha sido considerada como un candidato para la acción de inhibidores selectivos contra estos parásitos (Wierenga y cols., 1991; Hol y col., 1992), tal es el caso de la cisteína de interfase presente en posición 14. Por medio de varias técnicas se ha demostrado que la estabilidad de esta cisteína es importante para la estructura de la TPI de varios protozoarios como tripanosomas, leishmanias, y *Entamoeba histolytica* (Gómez-Puyou y col., 1995; Wierenga y Hol., 1987; Landa y col., 1997). La TPI de mamíferos no presenta cisteína en esta posición. La cisteína de interfase es susceptible de derivatizarse con agentes que reaccionan con grupos sulfidrílo, como el MMTS (metil metano tiosulfonato) y el DTNB. Estos agentes no son específicos para TPI, sin embargo son altamente selectivos ya que inhiben las TPIs de los parásitos pero no la de humano, lo que demuestra que la hipótesis de inhibición selectiva de aminoácidos importantes no pertenecientes propiamente al sitio activo, es válida (Gómez-Puyou y col., 1995).

Se ha observado que la TPI de *Plasmodium falciparum* tiene una leucina en la posición 183, mientras que la TPI de humano tiene un glutamato, esto resulta en una región hidrofóbica cerca del sitio activo en la enzima del parásito, por lo que es considerado un sitio potencial para inhibición específica mediante el diseño de moléculas aniónicas hidrofóbicas (Velanker y col., 1997).

II.3.- GLICERALDEHIDO 3-FOSFATO DESHIDROGENASA

La gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) lleva al gliceraldehído 3-fosfato (GAP) a oxidarse a un compuesto de alta energía, el 1,3 difosfoglicerato. En esta reacción el NAD⁺ actúa como cofactor. Este paso de la glicólisis es crucial debido a que la adición de un segundo grupo fosfato a la GAP conserva la energía, que de otra forma se perdería por la oxidación del grupo aldehído, además da lugar al sustrato del siguiente paso donde el ADP es fosforilado directamente a ATP (Eckert y col., 1992). Se ha observado que la deficiencia de GAPDH lleva a una muerte celular progresiva (Sheline y Choi, 1998).

La GAPDH es homo-tetramérica y tiene un peso aproximado de 38 kDa por monómero. Se han reportado isoformas y se han encontrado diversas funciones además de la glicolítica. En mamíferos la enzima actúa como fosfotransferasa cinasa, es capaz de fosforilarse a sí misma y a otras proteínas; se ha propuesto como un posible transportador de RNA nuclear y presenta actividad similar a la uracil DNA glicosilasa, por lo que podría participar en el proceso de reparación de

DNA. Se ha sugerido que participa en el proceso de apoptosis, pues al encontrarse a la enzima en el núcleo celular hay ausencia de actividad enzimática para GAPDH, y un estudio de inhibición de esta enzima en células neuronales, llevó a la fragmentación de DNA y a la apoptosis, además, se demostró que un fármaco empleado para tratar la enfermedad de Parkinson y que inhibe la apoptosis, se une específicamente a la GAPDH (Sirover M. 1999).

Esta enzima es considerada como blanco para inhibidores selectivos en contra de *T. brucei*. Estos inhibidores se diseñaron a partir de una región cerca del sitio de unión al NAD que tiene diferencias estructurales con la enzima del humano. En estos ensayos se han obtenido valores de 10 a 170 veces más de inhibición de la actividad enzimática en la GAPDH del parásito, con respecto a la de humano, además estos compuestos inhibieron la enzima de parásitos relacionados como es el caso de *Leishmania mexicana* (Verlinda y col., 1994). Estudios de cristalografía han demostrado que este tipo de inhibidores deforma considerablemente el sitio de unión a adenina (Suresh y col., 2001).

III. HIPOTESIS

Los céstodos dependen de los carbohidratos para obtener energía . Por lo que si se inhiben enzimas importantes para el metabolismo energético del parásito, es posible interferir en el desarrollo y potencial infectivo del mismo, lo que generaría una reducción en el riesgo de adquirir la parasitosis. Esta inhibición puede darse por medio de la respuesta inmune.

IV. OBJETIVO

El objetivo de este trabajo es evaluar si dos enzimas glicolíticas de *T. solium*, la triosa fosfato isomerasa y la gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa, son capaces de conferir protección en contra de la cisticercosis en un modelo murino de *Taenia crassiceps*-ratón.

IV.1.- OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.-Aislar y caracterizar los cDNAs que codifican para la TPI y la GAPDH de *T. solium*.
- 2.-Producir las enzimas recombinantes en un sistema bacteriano.
- 3.-Caracterizar bioquímicamente a las enzimas recombinantes.
- 4.-Determinar si las enzimas son capaces de conferir protección contra la cisticercosis murina y evaluar la respuesta inmune generada.

V. MATERIALES Y METODOS

V.1.- MATERIALES

a) REACTIVOS.

Las endonucleasas de restricción, la RNasa, la DNasa I, la transcriptasa reversa, así como otras enzimas utilizadas fueron adquiridas de la compañía Gibco BRL. Los vectores pUC18 fueron obtenidos de New England Biolabs. Los estuches para la realización de la secuencia (Sequenase Versión 2.1 DNA Sequencing) y de marcaje (Random primer DNA Labeling) fueron obtenidos de Unites States Biochemical Corp y de Amersham Co., respectivamente. El estuche para la amplificación de DNA (PCR) fue de la casa BIOTECESA. La albúmina sérica bovina fracción V, el DNA de esperma de salmón tipo III, el IPTG y los reactivos para medir actividad enzimática (glicerol fosfato, gliceraldehido 3-fosfato NADH⁺, DTT, trietanolamina, y los adyuvantes saponina, hidróxido de aluminio y adyuvante completo de Freund fueron obtenidos de la casa Sigma Chemical Co. El ficoll tipo 400 y la polivinilpirrolidona de Pharmacia Inc. Las membranas de nitrocelulosa (NC) de Millipore Corp. Los isotopos α -³⁵S-dATP y α -³²P-dCTP de Amersham Co. El vector de expresión pRSETb fue adquirido en la compañía Invitrogene. Los anticuerpos anti-ratón conjugados a peroxidasa IgG, IgG1, IgG2a, IgE son de la casa Control Técnico y Representaciones S.A de C.V. Las columnas de resina acoplada a metales-níquel y la superdex 75 HR 10/30 fueron de la casa Pharmacia Biotech. Los demás reactivos fueron de la mejor calidad disponible comercialmente.

b) MATERIALES BIOLÓGICOS.

Los cisticercos de *Taenia solium* fueron aislados por disección del músculo esquelético de cerdos infectados. Estos cisticercos fueron utilizados para preparar extracto antigénico total que fue empleado como control positivo del esquema de vacunación y como control positivo para los ensayos de detección de anticuerpos. Los cisticercos de *T. crassiceps* fueron obtenidos de la cavidad peritoneal de ratones infectados previamente con 10 cisticercos y con un periodo de infección de tres a cuatro meses. Los ratones hembras de 4 semanas son de la cepa Balb/c Ann y fueron proporcionados gentilmente por el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM. Conejos de la cepa Nueva Zelanda fueron proporcionados por el bioterio de la Facultad de Medicina de la UNAM.

Se utilizó una biblioteca de cDNA total del cisticerco de *T. solium* construida en el vector λ gt10. Las cepas de *E. coli* utilizadas fueron la **C₆₀₀hfl^r** (SupE44, thi¹, leuB6, lacY1, tonA21, L-(r_k,m_k,+)mcrA-, hfl-), la **TG1** (SupE, hsd 5, thi, -(lac-proAB), F'[traD36, proAB, lacI^s, lacZ-M15], y la **JM105** (supE, endA, sbcB15, hsdR4, rpsL, thi Δ (lac-proAB) F'(traD36, pro AB+ lacI^s lacZ Δ M15).

c) SINTESIS DE OLIGONUCLEOTIDOS.

Las secuencias 5' **FVGGNWK** y 3' **YEPVWAI** para la enzima TPI, así como las secuencias 5' **NASCTTN** y 3' **WYDNECG** para la GAPDH que son muy conservadas en estas enzimas, fueron utilizadas para diseñar oligonucleótidos degenerados para TPI (TPI 5' y TPI 3') y GAPDH (GAPDH 5' y GAPDH 3'). Los oligonucleótidos fueron preparados en un sintetizador de DNA (Biosearch modelo 8750 de Pharmacia Inc.).

V.2.- METODOS

a) OBTENCION DE RNA Y cDNA DE CISTICERCO DE *T. solium*.

El RNA fue aislado de cisticercos, oncosferas y adultos por extracción con Trizol. El tejido del parásito (100 mg) fue homogeneizado en un ml de Trizol en un Politron (Brinkmann Instruments) a máxima velocidad durante 15 seg tres veces. Se incubó la suspensión durante 5 min a temperatura ambiente y se le adicionó 0.2 ml de cloroformo por cada ml de Trizol. La suspensión se agitó y se incubó 3 min a temperatura ambiente, posteriormente fue centrifugada a 11000 Xg por 15 min a 4°C. La fase acuosa fue recuperada y se precipitó con 0.5 ml de isopropanol por cada ml de Trizol, se incubó a temperatura ambiente 10 min y se repitió el paso de centrifugación. La pastilla se lavó con 1 ml de etanol al 75% y se centrifugó a 7500 Xg durante 5 min. El RNA se disolvió en agua y fue incubado a 60°C durante 10

min. El RNA mensajero (RNAm), se obtuvo pasando al RNA total por una columna de oligo-dT Sefarosa (Sambrook y cols, 1989). La cantidad de RNA se determinó por $DO_{260/280}$ nm y su integridad se verificó por electroforesis en un gel de agarosa.

Parte del RNA total y del RNAm obtenido de cisticerco (5 y 0.5 μ g) fueron convertidos a cDNA por medio de la enzima Transcriptasa reversa (200 unidades). La reacción se llevo a cabo a 42°C en 20 μ l de amortiguador para transcriptasa reversa incluido en el estuche SuperScript Preamplification System for First Strand cDNA Synthesis Kit (Gibco/BRL).

b) AMPLIFICACION DE DNA, REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).

Las PCR se llevaron a cabo en 100 μ l de reacción, conteniendo además de cada templado de interés, 50 pmol de cada oligonucleótido, amortiguador de PCR y 2.5 U de Vent polimerasa. Las condiciones utilizadas fueron: un ciclo a 95°C, 3 min; 50°C, 2 min; 72°C, 3 min; 29 ciclos a 95°C, 1 min; 50°C, 2 min; 72°C, 3 min, un paso de extensión a 72°C, 10 min (Sambrook y cols., 1989).

c) MARCAJE RADIOACTIVO DE SONDAS DE DNA.

Los fragmentos amplificados utilizando como templado el cDNA de cisticerco (sondas) fueron clonadas en el vector pUC18 y secuenciadas para verificar su homología con las secuencias de las enzimas reportadas en GenBank para otros organismos. Se cargaron en un gel de agarosa al 1% en Tris-acetato (TAE 1X), se cortaron y purificaron por el método de "perlas de vidrio" (Vogelstein y Gillespie, 1979). El marcaje con 32 P se llevó a cabo por el método de Random Primer. Alrededor de 25 ng de cada fragmento fue diluido hasta 20 μ l con agua y desnaturalizado a 95°C durante 10 min. El fragmento fue enfriado en hielo y se le adicionó el amortiguador de marcaje incluido en el estuche, conteniendo 1 mM de los dideoxinucleótidos (A, G, T), 50 μ Ci del radioisótopo α - 32 P-dCTP, oligonucleótidos al azar (random primers) y 1 U de la enzima Klenow e incubado a 30°C por 30 min. La sonda marcada fue pasada a través de una columna de Sefarosa-4B y eluida con amortiguador de TE.

d) TAMIZAJE DE LA BIBLIOTECA Y AISLAMIENTO DE CLONAS

Una colonia de la bacteria huésped (*C₆₀₀ hfl'*) fue inoculada en 50 ml de medio SOB e incubada a 37°C toda la noche. Las bacterias fueron centrifugadas 10 min. a 600 Xg y resuspendidas en MgSO₄, 10 mM a una densidad de $DO_{600} = 0.5$. Aproximadamente 600 μ l de bacterias fueron infectadas con 45,000 fagos de la biblioteca e incubados durante 15 min a 37° C. Posteriormente, 6 ml de medio topagar fundido a una temperatura de 48°C fueron mezclados con las bacterias

infectadas y sembradas en 3 cajas de petri conteniendo medio SOB e incubadas a 37°C toda la noche (Huynh y cols., 1985; Sambrook y cols., 1989).

Las cajas con placas líticas fueron enfriadas y cubiertas con membranas de nitrocelulosa por 2 min y orientadas con tinta china. A cada caja se le hizo un duplicado colocando otra membrana durante 5 min después de quitar la primera. El fago adherido a las membranas fue desnaturalizado con una solución de NaOH 0.5M, NaCl 1.5M durante 5 min y neutralizado con una solución de Tris-HCl 1M y NaCl 1.5M, pH 8 por 5 min. Las membranas fueron secadas a temperatura ambiente y el DNA fue fijado con luz ultravioleta en un UV Spectrolinker (Spectronics Corp.), por 1200 seg x 100 μj x cm^2 . Las membranas fueron prehibridadas a 50°C por 3-6 h con agitación en una solución conteniendo: amortiguador de citratos-salina SSC 6X, Denhart's 5X, formamida 50%, SDS 0.5% y 100 $\mu\text{g/ml}$ de DNA de esperma de salmón previamente desnaturalizado a 100°C/5 min. Transcurrido ese tiempo se añadió la sonda marcada y las membranas fueron incubadas a 50°C toda la noche. Las membranas se lavaron 3 veces con una solución de SSC 2X y SDS 0.1% a 50°C durante 10 min, mas un lavado final de 55°C por 10 min. Se secaron a temperatura ambiente y fueron expuestas sobre películas de rayos X (X OMAT Kodak) durante 24 h.

Las clonas positivas del primer tamizaje fueron recuperadas de las cajas y resuspendidas en 1 ml de medio SM. Posteriormente, se realizó un segundo tamizaje en donde se sembraron alrededor de 1000 fagos de cada una de las clonas positivas, bajo las mismas condiciones que el primario. Finalmente, las clonas que volvieron a ser positivas fueron aisladas en un tercer tamizaje en el que se sembraron aproximadamente 100 fagos de cada una de las clonas. Nuevamente las clonas positivas fueron aisladas y puestas en 1 ml de SM.

e) PREPARACION DE DNA DE CLONAS POSITIVAS.

Se infectaron 200 μl de las bacterias crecidas toda la noche con 5×10^8 fagos de cada clona positiva. Se sembraron en SOB-agarosa sólido hasta la lisis total y los fagos fueron recuperados adicionando 5 ml de medio SM en agitación lenta durante 1 h y vaciados a un tubo. Para la obtención del DNA de los fagos de $\lambda\text{gt}10$, 700 μl de la suspensión fueron tratados con polietilenglicol al 20% v/v e incubados a 4°C durante 1 h. La suspensión fue centrifugada a 10000 Xg durante 15 min. El precipitado se resuspendió en 200 μl de SM y fue incubado con 2 μl de RNAsa A (1 mg/ml) y 2 μl de DNAsa I (100 $\mu\text{g/ml}$) durante 30 min a 37°C. Al término de esta reacción fueron adicionados 2 μl de SDS al 10% y 2 μl de EDTA 0.5M, pH 8.0 e incubada durante 15 min a 68°C. La mezcla anterior fue limpiada con un volumen igual de fenol/cloroformo (1:1), 2 veces con volumen igual de cloroformo y precipitado con isopropanol frío. La mezcla fue centrifugada a 10000 Xg durante 10 min a 4°C y el precipitado lavado con 100 μl de etanol frío al 70%. Finalmente el precipitado fue secado y resuspendido en 30 μl de TE.

Para establecer los tamaños de los insertos, el DNA de cada una de las clonas de interés fue utilizado como templado en PCR con oligonucleótidos

específicos que flanquean las regiones alrededor del sitio de clonación de los vectores utilizados. La reacción de PCR se llevó a cabo utilizando 10 ng del DNA purificado y 50 pmol de cada oligonucleótido. Los fragmentos fueron analizados en un gel de agarosa al 1.5%.

f) PREPARACION DE DNA GENOMICO.

El DNA genómico de cisticercos fue extraído por el método recomendado por Sambrook y cols. (1989). Cinco gramos de cisticercos de *T. solium* fueron congelados en nitrógeno líquido y pulverizados con un mortero, se resuspendieron con 10 volúmenes de amortiguador de lisis (50 mM de Tris pH 8, 0.1 M EDTA, 0.5% Sarcosil), 20 µg/ml de RNasa A y la suspensión se incubó una h a 37°C. Posteriormente se le adicionó proteinasa K a una concentración de 100 µg/ml y se incubó por tres h a 55°C y una h más a 65°C. Se agregó NaCl a una concentración final de 2 M y se incubó 2 min con agitación suave. Esta solución se centrifugó a 3000 Xg durante 10 min. El DNA de la fase acuosa fue limpiado mediante extracción con fenol/cloroformo y precipitado con un volumen igual de isopropanol. El DNA fue resuspendido en TE, cuantificado a DO₂₆₀ nm y 1 µg fue usado como template para amplificar una región del gen que codifica para cada enzima por medio de la PCR empleando oligonucleótidos del inicio y el término de la región codificadora de cada enzima.

g) REACCIONES DE DIGESTION CON ENDONUCLEASAS.

Todas las reacciones de digestión fueron realizadas a 37°C hasta digestión total, en un volumen de 100 µl siguiendo los procedimientos recomendados por la casa comercial para cada enzima. Los productos de la reacción fueron concentrados por precipitación con 1/10 del volumen de reacción de acetato de sodio 3M, pH 5.3, 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío y congeladas a -70°C durante 30 min. El precipitado fue obtenido por centrifugación a 10000 Xg durante 10 min y secado a 37°C por 5 min., resuspendido y corrido en geles de agarosa. Las bandas de DNA fueron recuperadas del gel y purificadas por la técnica de Vogelstein y Gillespie (1979). El DNA fue eluido durante 30 min a 37°C con TE.

h) REACCION DE LIGADO.

Aproximadamente 10 ng del DNA del vector de clonación (pUC18 o pRSETb) y 100 ng de cada inserto seleccionado digerido y purificado fueron ligados por medio de la enzima T4 DNA ligasa. Esta reacción se llevó a cabo incubando al vector con el inserto en amortiguador de ligasa (comercial) y 1 unidad de DNA ligasa. La reacción total (20 µl) fue incubada a 16°C durante 14 h y terminada incubando la mezcla a 65°C durante 10 min.

i) TRANSFORMACION

Los insertos ligados a pUC 18 (7 μ l) fueron incubados a 4°C durante una hora con 200 μ l de JM105, se sometieron a un choque térmico de 42°C durante 1 min. Las bacterias fueron sembradas en LB más 100 μ g/ml de ampicilina de cultivo y 12.5 μ g/ml de estreptomina e incubadas durante toda la noche a 37°C. Los insertos ligados al vector de expresión fueron transformados en la célula TG1 en LB más 100 μ g/ml de ampicilina

j) REACCION DE SECUENCIA

La preparación de los templados (plásmidos) se llevó a cabo creciendo las colonias resistentes al antibiótico en medio líquido y extrayendo el DNA por medio de lisis alcalina como ya se describió. La secuencia se llevó a cabo por el método de Sanger modificado para doble cadena de DNA (Ku-chuan H., 1991). Este método lleva un paso previo de desnaturalización alcalina y un paso posterior de neutralización. El DNA (0.5 μ g) del templado es incubado con 3 pmol del oligonucleótido iniciador y 0.5 μ l de NaOH 1 N durante 10 min a 37°C, después se adiciona el amortiguador de reacción diluido en agua y 0.5 μ l de HCl 1 N, se incuban otros 5 min. Entonces se le adicionaron 2 μ l de la mezcla de marcaje diluida en agua, 0.5 μ l del α -dATP-³²S y 2 μ l de la enzima Sequenase diluida 1:8 en su amortiguador de dilución. Todo fue mezclado e incubado a temperatura ambiente durante 5 min. Al término, 3.5 μ l de la mezcla fueron adicionados a 4 tubos de 0.5 ml conteniendo 2.5 μ l de un dideoxinucleótido específico (ddA, ddC, ddG, ddT) e incubados por 5 min a 45°C. Finalmente la reacción fue terminada adicionando 4 μ l del amortiguador de término, el cual lleva los colorantes azul de bromofenol y cianol xileno de color verde como marcadores de corrida.

Las reacciones fueron corridas en geles de acrilamida al 6%: 3 μ l de las muestras fueron previamente desnaturalizadas a 70°C y se cargaron en el gel. Las condiciones de la corrida fueron 55 Watts a 2500 Volts. Después de la corrida los geles fueron fijados en ácido acético al 10% durante 20 min, secados a 70°C durante 1 h y expuestos sobre placas de rayos-X durante 12 h. Las secuencias de ácidos nucleicos fueron analizadas por medio de programas computacionales (Predict 7 y PCGENE de Intelligenetic Inc). Así mismo se realizó un alineamiento con secuencias de las enzimas reportadas para el humano (*Homo sapiens*), *Leishmania mexicana*, *Caenorabditis elegans*, *Schistosoma mansoni*, y el cerdo (*Sus scrofa*), en el caso de la TPI y con *H. sapiens*, *S. scrofa*, *S. mansoni*, y *L. mexicana* en el caso de la GAPDH. Fue necesario producir diversos oligonucleótidos internos que se fueron diseñando conforme avanzaba la secuencia de los diferentes templados.

k) SOUTHERN Y NORTHERN BLOT

Para el Southern, aproximadamente 10 µg de DNA genómico de cisticerco por reacción, fueron digeridos con las enzimas de restricción: Bam HI, Bgl II, Eco RI, y Hind III. El DNA digerido fue corrido en un gel de agarosa al 1%. Al término de la corrida el gel fue desnaturalizado durante 1 h y neutralizado por 1 h, utilizando las mismas soluciones empleadas para los tamizajes. El DNA separado en el gel fue transferido a una membrana de Nylon por difusión durante 24 h en amortiguador SSC 5X. La membrana fue lavada con una solución de SSC 5X durante 5 min a temperatura ambiente y el DNA fijado a la membrana con luz UV, siguiendo las mismas condiciones usadas para el tamizaje. Esta membrana se hibridó con la sonda de TPI (región codificante del cDNA amplificado por PCR). La misma cantidad de DNA fue digerida con Bam HI, Eco RI, Hind III, Nco I y Bgl II y la membrana fue hibridada con una sonda de GAPDH obtenida igual que la de TPI..

Para el ensayo Northern se emplearon 10 µg RNA total de adulto y oncosfera y 1 µg de RNA mensajero de cisticerco. El RNA se preparó para la corrida adicionándole 2.2 M de formaldehído, 50% de formamida y 0.5X de amortiguador MOPS a 55°C por 15 min. La corrida en gel de agarosa se realizó en amortiguador MOPS 1X. El gel se lavó con agua durante 15 min y con SSC 10X dos veces por 15 min y se transfirió igual que el Southern blot (Sambrook y cols, 1989). Finalmente, las membranas fueron hibridadas utilizando las mismas sondas usadas para el Southern blot.

l) CLONACION EN EL VECTOR DE EXPRESION Y PRODUCCION DE LAS ENZIMAS RECOMBINANTES.

La región codificante del cDNA para cada enzima fue ligada al vector pRSET. Estas regiones fueron amplificadas empleando oligonucleótidos diseñados a partir de los 6 primeros y 6 últimos aminoácidos de la secuencias de proteínas deducida de la secuencia de nucleótidos obtenida para cada enzima. A estos oligonucleótidos se les añadió sitios de restricción para facilitar su inserción en el del vector de expresión pRSET. En el caso de la TPI se realizaron dos construcciones, una en los sitios Nhe I/Hind III que permite la fusión del inserto a la cola de histidinas del vector y otra en los sitios Nde I/Hind III que produce una proteína recombinante tipo silvestre. Para el caso de la GAPDH se realizó la inserción en los sitios Nhe I/Bam HI que permite la fusión a las histidinas. Las construcciones fueron usadas para transformar células TG1 y se verificó la clonación por secuencia. Las células transformadas fueron crecidas hasta una a DO_{600} nm. De 0.3. Se les adicionó IPTG (1 mM) y se crecieron una h más. Después se les adicionó el fago cooperador M13/T7 a una MOI de 5 pfu/célula y se crecieron durante 6 h más. Las células se centrifugaron a 3000 Xg y se lavaron con un amortiguador de trietanolamina 10 mM, se volvieron a centrifugar y se resuspendieron en amortiguador de trietanolamina 10 mM, se lisaron mediante presión en una Prensa French (SLM Instruments) a 11000 psi a 4°C. El sobrenadante fue centrifugado a 20000 Xg y pasado a través de una

columna de cromatografía de afinidad con níquel. La proteína unida a la matriz de la columna fue eluida con un amortiguador de trietanolamina 10 mM, EDTA 50 mM, DTT 1 mM, se dializó en trietanolamina 10 mM, EDTA 1mM, DTT 1 mM. Para la purificación de la enzima tipo silvestre, el sobrenadante obtenido después de lisar a las bacterias, fue precipitado con sulfato de amonio al 50%, resuspendido en 5 ml y centrifugado a 15000 Xg durante 15 min. El precipitado se dializó con amortiguador de trietanolamina 10 mM, EDTA 1 mM y DTT 1 mM pH 7.6. Se centrifugó nuevamente y se cargó en una columna sephacryl S-300. La corrida se realizó en un FPLC System (Pharmacia Inc) con un flujo de 0.2 ml/min y en el amortiguador de trietanolamina, las fracciones obtenidas fueron seguidas por actividad y SDS-PAGE. Las fracciones con mayor actividad específica se juntaron y se cargaron a una columna de intercambio iónico mono Q (Pharmacia Inc) equilibrada con el mismo amortiguador de trietanolamina a un flujo de 1.5 ml/min. Se realizó un gradiente salino de 0-500 mM de NaCl. Las fracciones obtenidas no unidas y las eluidas se analizaron mediante SDS-PAGE.

m) CARACTERIZACION BIOQUIMICA.

Las determinaciones de concentración de proteína fueron realizadas por espectroscopia a DO_{280} nm diluyendo las proteínas 1:100 en amortiguador de TED (100 mM de trietanolamina con 10 mM de EDTA y 1 mM de DTT). El ajuste de la concentración se hizo mediante la fórmula:

$$\Sigma(280)(m^{-1} cm^{-1}) = \#Trp (5500) + \#Tyr (1490). \text{ (Pace y col., 1995)}$$

Se realizó una cromatografía de filtración utilizando una columna de superdex 75 (HR 10/30 Pharmacia, Inc) para determinar el peso molecular y estado de asociación de las proteínas en su estado nativo. La condiciones de corrida fueron: Flujo= 0.5 ml/min., amortiguador de TED y se colectaron fracciones de 1 ml. La columna fue calibrada con BSA (67 kDa), Ovoalbúmina (45 kDa), Anhidrasa carbónica (29 kDa), y Ribonucleasa A (12 kDa) bajo idénticas condiciones.

La determinación de la actividad enzimática de la TPI, se llevó a cabo a 25°C con 2 ng de la enzima en 1 ml de amortiguador TED, conteniendo NADH 0.2 mM, glicerol 3 fosfato deshidrogenasa 20 μ g/ml y diferentes concentraciones de gliceraldehido 3- fosfato. El decremento en absorbancia fue leído a DO_{340} nm. El sustrato fue calibrado para ajustar la concentración lo más exacto posible. Los experimentos fueron realizados por duplicado

Ensayos de estabilidad a la dilución fueron realizados por medición de la actividad enzimática, Para el ensayo se hicieron diluciones de 10, 5 y 1 μ g y de 500, 100, 50, 10, 5, 2 y 1.2 ng de enzima. Se incubaron a 25°C y la medición se realizó a las 24 h, a las 72 h, a los 7 días y a los 15 días de incubación.

Además, la enzima fue incubada una h a 25°C con un suero policlonal adsorbido producido en conejo en cont^{ra} de la TPI recombinante con histidinas: 500 ng de enzima fueron puestos a interactuar con el suero a diluciones de 1:100, 1:1000 y 1:5000. Como control positivo de actividad se incubaron 500 ng de enzima

en condiciones similares pero sin suero y como control negativo de inhibición se incubó a la enzima con un suero de conejo no inmunizado.

La determinación de la actividad de GAPDH se llevó a cabo de manera similar usando 1 μg de enzima en amortiguador de trietanolamina [(40 mM), Na_2HPO_4 (50 mM), EDTA (0.2 Mm)] pH 8.9, G3P 10 mM (0.2 ml), y NAD 10 mM (0.2 ml).

n) PRODUCCION DE ANTICUERPOS POLICLONALES E INMUNOELECTROTRANSFERENCIA

La enzima TPI fue utilizada para inmunizar un conejo con el propósito de producir anticuerpos policlonaes para los ensayos de inhibición por anticuerpos. El conejo fue inmunizado con 100 μg de la proteína, 3 veces con intervalo de 15 días. Una semana después de la tercera inmunización el conejo fue sangrado y el suero fue separado por centrifugación a 2000 Xg. Este suero fue empleado en ensayos de inmunoelectrotransferencia para verificar su especificidad a la TPI recombinante. Para el ensayo, se preparó un gel de poliacrilamida con SDS al 10% y se realizó la corrida utilizando 10 μg de los extractos de *E. coli* sin inducir y del inducido y 1 μg de proteína purificada por cada carril del gel, después de la electroforesis el gel fue transferido a membrana de nitrocelulosa. La membrana fue incubada con el suero a dilución 1:1000 por una h a 37° C. Se lavó tres veces con PBS-Tween al 1% y se incubó durante una h con un segundo anticuerpo anti-conejo acoplado a peroxidasa. La membrana se lavó como en el paso anterior y fue revelada con una solución de diaminobencidina (4 ng/10 ml) en PBS con 10 μl de peróxido de hidrógeno. Suero de conejo no inmunizado fue usado como control negativo

ñ) ENSAYOS DE VACUNACION.

Las proteínas recombinantes fueron empleadas como antígeno en ensayos de vacunación en un modelo murino de cisticercosis (*T. crassiceps*-ratón). Grupos de 7 ratones fueron inmunizados subcutáneamente 2 veces con intervalos de 15 días con PBS, diferentes dosis de enzimas recombinantes y adyuvantes: Adyuvante Completo de Freund (ACF), Hidróxido de Aluminio (Alúmina) y Saponina. Un mes después de la segunda inmunización los ratones fueron inoculados en el peritoneo con 10 cisticercos de *T. crassiceps* y un mes después fueron sacrificados. Se contó el número de cisticercos encontrados en el peritoneo y la reducción en carga parasitaria fue determinada mediante la fórmula:

$$\mathbf{100 \times \frac{N \text{ Control} - N \text{ experimental}}{N \text{ Control}}}$$

N Control

N Control = media del número de parásitos en los ratones vacunados con el adyuvante

N Experimental = media del número de parásitos en los ratones vacunados con las enzimas

Estos experimentos fueron repetidos dos veces para evaluar las dosis óptimas de antígeno y el mejor adyuvante. La dosis y el adyuvante que resultó mejor fue repetido cuatro veces más y se realizaron otros dos experimentos alargando el tiempo de infección a dos meses. Previamente se realizaron experimentos para comprobar que estas histidinas no generaban respuesta inmune humoral.

Las enzimas que se utilizaron en estos experimentos fueron las fusionadas a histidinas. Se obtuvo el suero de todos los animales antes de iniciar el experimento, después de la segunda inmunización, una semana después de la inoculación, al mes de la inoculación y al sacrificio. Los datos fueron analizados estadísticamente por la prueba de T student para dos grupos, tomando como grupos controles a los animales que fueron inmunizados con PBS mas los diferentes adyuvantes. Con una confianza estadística de $P=0.01$ o menor.

o) DETERMINACION DE LOS ISOTIPOS DE ANTICUERPOS

El suero de los animales de los grupos controles e inmunizados fue analizado por la técnica de ELISA empleando como antígeno de captura a la enzima recombinante correspondiente. Un μg por pozo fue pegado a placas de 96 pozos en un amortiguador de carbonatos a 37°C durante dos h. Los pozos fueron lavados con PBS Tween al 0.05% tres veces y se les adicionó una solución de Albúmina Sérica Bovina al 1% en PBS Tween 0.05%. Se incubó por 30 min más y se repitió el lavado antes mencionado. El suero de los animales inmunizados fue diluido 1:100 y 1:1000 y se agregó 100 μl a cada pozo. Se incubó por una h y se repitió el lavado. Anticuerpos anti- ratón para determinar isotipos IgG, IgG1, IgG2a, e IgE acoplados a peroxidasa fueron adicionados a los pozos a una dilución de 1: 2000 en PBS Tween y fueron incubados durante una h. Finalmente, se lavaron y se revelaron con una solución de fosfatos citrato de sodio, peróxido de hidrógeno y .ortofenilendiamina. Las placas se leyeron a una DO_{490} nm.

VI. RESULTADOS

VI.1.- OBTENCION DE LAS SONDAS.

Un fragmento de 450pb fue amplificado por PCR a partir de un cDNA del cisticerco de *Taenia solium*, empleando como iniciadores los oligonucleótidos TPI 5' y el TPI 3'. Asimismo, un fragmento de 500 pb fue amplificado con los iniciadores GAPDH 5' y GAPDH 3'. Su secuencia y la comparación de las mismas en la base de datos del GenBank, nos confirmó que los fragmentos obtenidos presentaban homología con varias TPI y GAPDH respectivamente.

VI.2.- OBTENCION DE CLONAS .

Los fragmentos purificados por el método de las perlas de vidrio fueron utilizados como sondas para tamizar la biblioteca de cDNA del cisticerco. De los 45000 fagos tamizados (Fig 4), se obtuvieron 5 clonas positivas para TPI y 6 clonas positivas para GAPDH, lo que da un porcentaje de representación del 0.011% y del 0.013% respectivamente. El tamaño de los insertos de cDNA de las clonas fue determinado por PCR utilizando oligonucleótidos de λ gt10 que flanquean la región de sitio de clonación del vector y como templado el DNA de la clona de interés. Las clonas de TPI presentaron tamaños de 1.1 kb y una clona presentó un inserto de 0.7 kb (Fig 5A), mientras que todos los insertos de las clonas obtenidas de esta misma biblioteca para la GAPDH, presentaron un tamaño de 1.3 Kb (Fig 5B).

VI.3.- MAPA DE RESTRICCIÓN DE LOS FRAGMENTOS DE cDNA.

Al digerir los fragmentos de las clonas de TPI con tamaño de 1.1 kb con las enzimas Bam HI, Eco RI, Hind III, Pst I y Alu I presentaron el mismo patrón de restricción: EcoRI (1 corte), Bam H1 (1 corte) y Alu I (3 cortes) (Fig 6A) . La clona de 0.7 kb también presentó un patrón de restricción similar a las clonas de 1.1 kb en su parte 3', mostrando que la clona es incompleta y que le falta una parte de la región en 5'. Las clonas de GAPDH fueron digeridos con las enzimas Eco RI, Hind III, Nde I, Nco I, y Bam HI. La enzimas Hind III, Nde I y Nco I cortan una vez a las clonas de cisticerco. Todas las clonas tuvieron el mismo patrón (Fig 6B).

VI.4.- CARACTERIZACION DE LOS cDNAs AISLADOS.

El análisis de la secuencia nucleotídica de tres clonas de cDNA de 1.1 kb de TPI, mostró un marco abierto de lectura que comienza con el codón ATG en la posición 21 y que continua hasta la posición 772, donde se encuentra el codón de termino TAA, el tamaño real de esta clona es de 1068 pares de bases incluyendo los

26-A

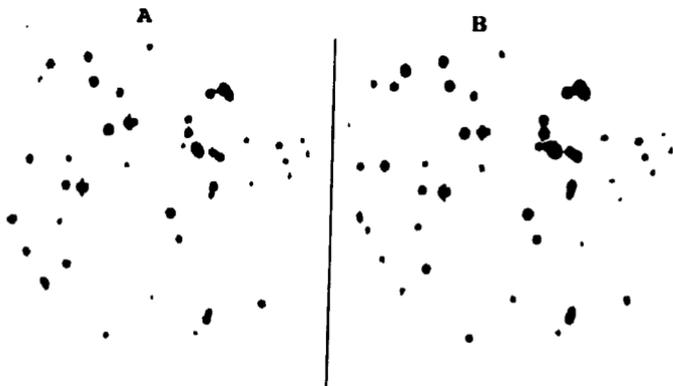


Fig. 4. Tamizaje secundario de la biblioteca de cDNA de cisticerco con la sonda de TPI. A) filtro original y B) filtro duplicado. Los puntos oscuros muestran las colonias líticas que hibridaron con la sonda (clonas positivas). Las flechas indican dos de las colonias que se aislaron para su caracterización molecular.

26-13

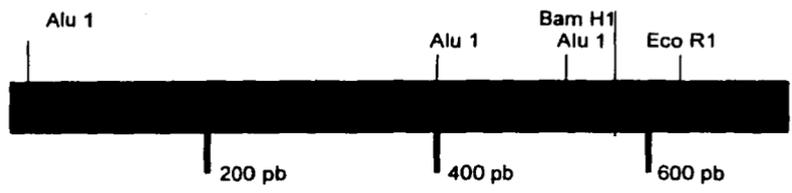
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



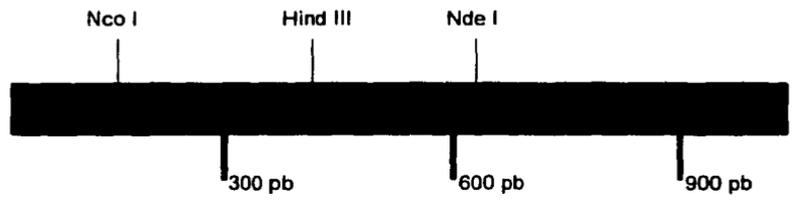
Fig. 5. A) Geles de agarosa al 1.5% que muestran los productos de PCR obtenidos de las clonas aisladas del tercer tamizaje de la biblioteca de cDNA de cisticerco, amplificados con los oligonucleótidos que flanquean los sitios de clonación del vector λ gt10. A) clonas TPI. B) Clonas GAPDH.

26-c

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



A. CLONA TPI (Nhe I, Nde I, Hind III no cortan la clona)



B. CLONA GAPDH (Nhe, Bam HI no cortaron la clona)

Fig 6. Mapas de restricción de las clonas de TPI y GAPDH obtenidas de los tamizajes.

extremos 5' y 3' que no codifican. No se encontró señal de poliadenilación típica, sin embargo la clona presenta una cola de polyA de 19 adeninas.

La estructura primaria deducida a partir de la secuencia nucleotídica indicó que la proteína tiene 250 aminoácidos con un peso molecular (PM) estimado de 27167 Da y un punto isoelectrico (pI) teórico de 6.66. Los residuos de aminoácidos que conforman la región del sitio activo 165-AYEPVWAIGTG (región que forma un capuchón que cubre al sustrato) se mantienen conservados, así como otros aminoácidos que participan en el sitio activo: K14, H94 y E167. La secuencia de la región codificante tiene una composición de bases de: A = 26.2%; T = 25.6%; G = 25.3% y C = 22.9%. No se observaron diferencias entre las diferentes clonas.

La predicción de estructura secundaria, sugiere que alrededor del 54% de los aminoácidos, toman una conformación α -hélice, 31.2% β -plegada, 7.6% vuelta (turn) en y 11.2% en conformación no repetitiva (coil), compatible con la estructura de barril ($\alpha\beta$)₈, característica de las TPis. No se observaron dominios hidrofóbicos pero sí se observaron tres dominios hidrofílicos: residuos 132 EREAGK, 93 GHSERR, 51 QDKAPK y se encontró un posible sitio de glicosilación en el residuo 14 (GNWKM N GSYSH) (Fig 7). Sin embargo, no se ha reportado glicosilación en estas enzimas.

En cuanto a las clonas de GAPDH se encontró que el cDNA consta de 1202 residuos de nucleótidos. Presenta 41 nucleótidos antes de codón de inicio ATG y un codón de termino en la posición 1048. La región codificante tiene la siguiente composición de bases: A= 22.5%, C= 27%, G= 23.5% y T= 27% (Fig 8). El cDNA codifica para una enzima de 335 aminoácidos con un PM de 37391 Da y un pI teórico de 8.3. Para este caso se encontró una señal típica de poliadenilación (AATAAA), 13 nucleótidos antes de la cola de poly A (29 adeninas). Se encontraron tres regiones hidrofílicas: 187 DGPSKK, 191 KKAWRD y 195 RDGRTA, y cinco sitios posibles de fosforilación a proteína cinasa C: 142 DKYDP S MKVVS, 182 HSYTA T QKVVD, 180 VVDGP S KKAWR, 244 SVVDL T CKLAK, 320 NECGY S WRVVD.

Además, se encontraron los residuos del sitio activo característico de las GAPDHs (149 ASCTTNCNL), los aminoácidos que participan en la transferencia de carga (C-151, Y-319), aminoácidos nucleofílicos (C-151, H-177), aminoácidos que unen al NAD (N-315, D-34), aminoácidos que unen al fosfato inorgánico (T-152, R-195, T-209), y a los aminoácidos que unen al Gliceraldehído 3-fosfato (T-182, R-233). Una predicción computacional de la estructura secundaria de la proteína revela que un 34.3% de los residuos adoptan una conformación hélicoidal, un 48.3% una conformación β -plegada, el 7.1% en vuelta y el 10.1% en no repetitiva.

VI.5.- CARACTERIZACION DE FRAGMENTOS GENOMICOS

Para establecer si las regiones codificantes de ambas enzimas eran interrumpidas por intrones, una PCR fue realizada utilizando como templado DNA genómico de cisticerco y los oligonucleótidos utilizados para amplificar solo la región codificante de cada enzima. En el caso de TPI se obtuvo un fragmento de 989 pares de bases cuya secuencia de aminoácidos es idéntica a la de las clonas de cDNA, sin embargo, se encontraron 4 intrones en una posición similar a la observada en otros

27-A

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CGTATTTGTTGGTATCCAGTC MTRKLFVGGNWKMNGSYSHINTFFDTLQK
ADTDPN gaatg^{tttt}gtcctatagcaactgaaatccctcag DIVIGVPACYLK^YAQDKAP
KGKIAAENCYKVGSGAFTGEI gtaag^{taatt}gtggagctt^{taata}caagcaatt^{tag}tagt^{gt}gttagc
ggctg^{taana}atgcag^{ttttt}taaac^{tttt}tag STEMIKDCGCEWVILGHSERRHIFGESNE gttt
gcctacccttgcatt^{ttta}accaa^{aaata}aatcgctcatctag LIGEKVKHALDSG LNVIPIGELLS
EREAGKTNDVCF^QMDAIA gtcag^{taatt}tcttcaccatcttctctgctcttcagcagactcatataa
tgtgcatt^{ttatt}gcag K^NVPSKEA WDKV^{VIA}YEPV^WAI^GTGKTATPAQAQEVHK
VVRDWIRKHVDAGIADKVRILYGGSVTASNAKDLGTQPDVDGFLVGGAS
LKP^DFIT^IINARR TAA^GAAGGACGCAGTTTGGCGGTTACCGATTGAGTTCTATCTAC
TTCTCTTCTTTTCCTTCTTCATTTTGTCTCCTCGTTCITTTCTGAAC^TCCTGCTCTGTA
CCTGAGCGAATTAGTGTATTCCCTGTCTTTAACTCCTTTTCCTGTTTTCTCTATGA
ATGTTGGCATTTCGCTTGGAGGCTATGAGAACTGCTTGTCTATTTTCG /// AAAAAAAA
AAAAA

Fig 7. Secuencia de la región codificante del gen de la enzima TPI de *Taenia solium*. La metionina de inicio, el codón de término y los sitios de corte y empalme en los intrones se muestran subrayados. Los aminoácidos catalíticos se resaltan en letras negras. Las secuencia nucleotídica no codificante de los extremos 5' y 3' que flanquean la secuencia de aminoácidos se muestran en mayúsculas pequeñas y la de los intrones en minúsculas.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

GGTTAAAAAGCAAAGAATTCCGGCCCGCGCTCGTGTGGT MKPQVGINGFGRI
 GRLVLRAAVASNTVDVVAVNDPFIDLEYMVMYFKYDSTHGRFKGVVKEGGK
 LIIDNHKITVFQEMNANAIPWSQAGAEYIVESTGINTTIEKAS gaagattacat
 ttctgtctcacctcactcgttcag AHFHGGAKKVIISAPSADAPMFVVGNQDKYDP
 SMKVVSN**ASCTTNCL**APLAKVINDNFGIAEGLHTTVHSYATQKVVDPGSKK
 AWRDGRATAAQNIIPASTGAAKAVGKVIPELNGKLTGMAFRVPTPNVSVVDLT
 CKLAKPATYEQIKAAVKTASESPRLKGILEYTEDQVVSTDFLSTTCSSTFDA
 SAGIALNDTFVKLIAW glaagcttgggggctgtctcatcacaacgacaattcactgattggtactgg
 gataaatcctacttttttcccttttag YDNECG**Y**SWRVVDLINHMFKKDH TAAGGCCCTTCG
 CTGGAGAGGGTGAAACAATTCCTAACTGCTAGTTGTTTGTGCAATACAATCCATGT
 CAAGTAATCACTGCTTGACGCGAACCACCCACTATCATAGCAATAAAGTTAAAAGTC
 TC /// AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

Fig 8. Secuencia de la enzima GAPDH de *Taenia solium*. los aminoácidos catalíticos se resaltan en letras negras, la metionina de inicio, el codón de término, los sitios de corte y empalme de los intrones y la señal de poliadenilación se muestran subrayados. A los extremos 5' y 3' de la secuencia de aminoácidos se muestra la secuencia nucleotídica de los extremos no codificantes. Los intrones se señalan en letras minúsculas.

organismos como *Schistosoma mansoni*. A diferencia de los intrones encontrados en la TPI de *S. mansoni*, los intrones de la TPI de *T. solium* son cortos (36, 77, 46 y 67 pb). Los intrones están constituidos en su mayor parte por pirimidinas, excepto en el segundo intrón, donde el porcentaje es igual para purinas y pirimidinas, los otros tienen un porcentaje de pirimidinas del 58.3%, 63% y 64% (Fig 7).

Para GAPDH, se obtuvo un fragmento de DNA genómico que presentó un tamaño de 1.5 kb, su secuencia presentó dos intrones. El primero de 41 pb (65.8% de pirimidinas) y el segundo de 78 pb (60% de pirimidinas) (Fig 8). Estos intrones están en la misma posición que los encontrados en la GAPDH de *S. mansoni*. En ambos genes la región donador / aceptor para el corte y empalme para la remoción de los intrones fue la secuencia (5'-GT.....AC-3').

VI.6.- COMPARACION BASADA EN LA SECUENCIA DE LA TPI Y LA GAPDH DE *Taenia solium* CON OTROS ORGANISMOS.

La secuencia de aminoácidos traducida de la secuencia nucleotídica de la TPI fue comparada con las secuencias de TPI de otros organismos como *Homo sapiens*, *L. mexicana*, *Caenorabditis elegans*, y *Schistosoma mansoni* (Maquat y cols., 1985, Shoemaker y cols., 1992, Alber y cols., 1982, Furth y cols, 1974, Kohl y cols., 1993, Pichersky y cols, 1984). El alineamiento se hizo con base a la estructura secundaria de la TPI de humano (Fig 9). La TPI tiene una identidad del 59.6% con la TPI de humano 58.8% con *S. mansoni*, un 44.8% con *L. mexicana* y un 59.6% con *C. elegans*. La región formada por los primeros 60 aminoácidos es la región menos conservada, los aminoácidos 11-16 y 43-46 conforman las asas C terminales 1 y 2 de interfase de la molécula. La secuencia de aminoácidos de la GAPDH de *T. solium*, tiene un porcentaje de identidad del 75% con el humano, de 75.59% con el cerdo, 72.95% con *S. mansoni*, y del 47.06% con *L. Mexicana* (Ercolani y col., 1998, Charrier-Ferrara y col., 1992, Hannaert y col., 1992) (Fig 10). Asimismo, no se observaron regiones extensas claramente variables.

VI.7.- ANALISIS TIPO SOUTHERN Y NORTHERN BLOT.

Los resultados del análisis tipo Southern, mostraron que el DNA genómico digerido con las enzimas de restricción, presentó un patrón de bandas muy simple. Para la TPI, con la enzima Bam HI se observó una banda de 4.3 kb, con la enzima Bgl II la banda es de aproximadamente 9.4 kb, con las enzimas Eco RI y Hind III las bandas son de 4.5 y 5 kb respectivamente. El análisis tipo northern mostró una sola banda que corresponde a un transcrito de 1.1 kb, en los tres estadios del parásito (Fig 11). Para el caso de la GAPDH los tamaños encontrados fueron de 3 kb con Bgl II, 3.5 kb con Hind III, 5 kb con Eco RI. Con Bam HI y Nco I, las bandas son mayores a 10 kb. En el caso de Nco I, se aprecian dos bandas. Asimismo, el análisis tipo northern mostró la presencia de un solo transcrito de 1.5 kb en el RNA de cisticerco (Fig 12).

28-A

	Botón	Beta	asa	Hélice
T.s	MTRLK	FVGGN	WMNGS	YSHINTFFDTLQK
H.s	MAFSRKF	*****	*****R	QBSLGLGIG**NA
L.m	MSAKPQP	IAAAN	**C**T	TAS*EKLVQVFNH
C.e	****F	*****	*****D	*ASVUGIVTF*NA
S.m	HSGS**F	*****	*****	RDDNKKLLK*SE
T.s	ADTDENA	DIVIGV	PACY	LKYAQDK
H.s	*KVPADT	EV*CAP	*TA*	IDF*RQ*
L.m	HTISHDV	QC*VAP	TFVH	IPLV*A*
C.e	SADNSSV	*V*VAP	**P*	*A**KS*
S.m	*HF*D*T	EVL*AP	*SVF	*HEIRKS
S.s			S	IDF*RQ*
T.s	AFPG	IKIAA	ENCYKVGSGGAPTGEIS	TEMIKD
H.s	LDPK	*AV**	Q*****TN*****	PG****
L.m	LRNP	KYVIS	AENATAK*****V*	MPIL**
C.e	LKA*	VLV**	Q*****PK*****	PA****
S.m	LK*E	*HV**	Q*****SK*****	PA**R*
S.s	LDPK	*AV**	Q*****AN*****	PG**R*
T.s	CGCK	WVIL	GHSERRHFGES	NELIGEKVKHALD
H.s	**AT	****	*****V****	D*****Q**A****
L.m	I*VH	****	*****TY**T	D*IVAQ**SE*CK
C.e	L*L*	****	*****HV****	DA**A*TV**E
S.m	I*D	****	*****N****	D**A**Q****
S.s	L*AT	**V*	*****V****	D
T.s	SGL	NVIPCI	GELLSEREAGK	TNDVCFMQMDAIK
H.s	***	G**A**	**K*D*****I	*EK*V*E*TKV**D
L.m	Q*F	H**A**	**T*OQ***NQ	*AK*VLS*TS***A
C.e	A*I	K*V*F**	**K*E*****H	*K*N*R*LQ**VD
S.m	***	S*A*A**	*T*****SN*	*EE*VR*LK**VN
T.s	NVPEKAMDK	VVIAY	EPVWAIQTGKTAT	PAQAEVHKVVRDMIRKH
H.s	**K***D*S*	**L**	*****	*Q*****EKL*G*LSKN
L.m	KLTK*D*NO	**L**	*****	*E*****LLL*K*VSEN
C.e	KGV*****EN	I****	*****	GE*****EMI*AFKKEK
S.m	KIK*ADE*KR	**V**	*****	*Q*****NFL*K*FKTN
T.s	VDAGIADKA	RILY	GGSVT	ASNARDLG
H.s	*SDAV*QST	**I*	*****	GATC*E*A
L.m	IGTDV*A*L	***	***N	*A**AT*Y
C.e	*SNAV*AT	**I*	*****	*D**A*Y*
S.m	APN*VDE*I	**I*	*****	*A*C*E*A
T.s	AQPDVD	GFLV	GGASLKP	DFITIIIN
H.s	S*****	****	*****	E*VD***
L.m	*K**IN	****	*****	E*RD**D
C.e	**K**I*	****	*****	**VK***
S.m	Q*H**	****	*****	E*TE*CK
T.s	ARR			
H.s	*CK			
L.m	T*			
C.e	**S			
S.m	**QR			

Fig 9. Alineamiento en arreglo de estructura secundaria de la TPI de *T. solium* (T.s) con otras TPIs conocidas: Humano (H.s), *Leishmania mexicana* (L.m), *Caenorhabditis elegans* (C.e), *Schistosoma mansoni* (S.m) y *Sus scrofa* (S.s). Los asteriscos indican identidad entre los aminoácidos con respecto a *T. solium*.

28-B

<p style="text-align: center;">TESIS CON FALLA DE ORIGEN</p>
--

T.s MKPQVGINGFGRIGRLVLRRAAVASNTVDVVAVNDPFIDLEYMVMFKYDSTHGR
H.s MG*VK**V*****T**FN*GK**I**I*****N*****Q*****K
S.s VK**VD*****T**FN*GK**I**I*****H*****Q*****K
S.m MSRAK*****FLK*****S*****I*R*****T

T.s FKGVVKVEGGKLIIDNHKITVFOEMNANAIPWSQAGA EYIVESTGINTTIEKAS
H.s *H**T**A*N***V*NGNP**I***RDPSK*K*GD***V***VF**M**G
S.s *H**T**A*DC**V**GKA*TI***RDPAN*K*GD**TA*V***VF**M**G
S.m *P*E*ST*N**KVNGKL*S*HC*RDPAN**DKD***V***VF**M**D**Q

T.s AHFHGGAKKVIISAPSADAPMFVVGVDQDKYDPSMKVVSNASCTTNCLAPLAKV
H.s **LQ***R*****M**HE**N*L*I*****
S.s **LK***R*****M**HE**N*L*I*****
S.m **IKNNRA*K*****ENS*EK**S*****

T.s INDNFGIAEGLMTTVHSYTATQKVVGDGPKKAWRDGRTAQNIIPASTGAAKAV
H.s *H***V*****AI***T***G*L***G*L*****
S.s *H**H**V*****AI***T***G*L***G*L*****
S.m *H*K*E*V*****F*****S*L***G*M*****

T.s GKVIPELNGKLTGMAFRVPTPNVSVVDLTCKLAKPATYEQIKAAVKTASEPRL
H.s *****A*****R*E**K*DD**KV**Q**G*-
S.s *****D*****R*E**K*DD**KV**Q**G*-
S.m *****A*****R*G*G*S**E*****A*AS**--

T.s KGILEYTEDQVVDLSTFCSSSTFDASAGIALNDTFVKLIAYDNECGYSWRV
H.s ****C**H***S*N*D*H*****G*****H*****S*****F**N**
S.s ****G*****C**NDS*H*****G*****H*****S*****F**N**
S.m *****E**V**S**VGS*S**I**K**S**NN*****VS*****F**C**

T.s VDLINHMFKKDH
H.s **MA**AS*E
S.s **MV**AS*E
S.m **T**H*V**A

Fig 10. Alineamiento múltiple de la enzima GAPDH. *Taenia solium* (T.s), Humano (H.s), *Schistosoma mansoni* (S.m), *Sus scrofa* (S.s). Los asteriscos representan identidad de aminoácidos con respecto a *T. solium* y el gap (-) indica que en esa posición no hay aminoácido.

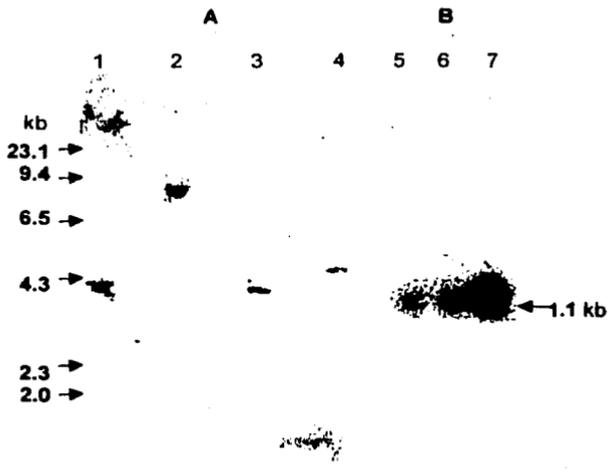


Fig 11.- A) Southern que muestran el patrón simple de una sola banda de hibridación obtenido al digerir DNA genómico con diferentes enzimas de restricción: 1) BamHI 2) EcoRI 3) BglII 4) HindIII. B) Northern que muestra un solo transcrito en los diferentes estadios de *Taenia solium*: Carril 5) RNA total de oncosfera, 6) RNA total de adulto, y 7) RNA poly A de cisticerco. Las membranas se hibridaron con el DNA de la región codificante de TPI. Los tamaños moleculares utilizados (λ H3) y el tamaño del transcrito se muestran a los lados del gel.

28-D

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

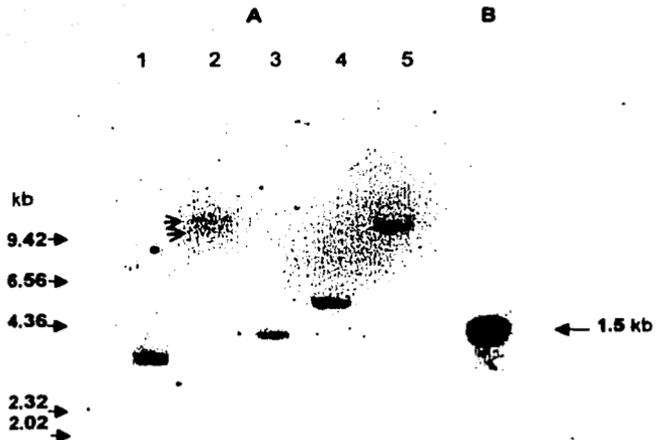


Fig 12.- A) Southern para GAPDH que muestra el patrón que se obtiene al hibridar DNA de cisticerco digerido con diversas enzimas: 1) Bgl II, 2) Nco I, (las flechas indican la posición de las dos bandas que hibridaron) 3) Hind III, 4) Eco RI, 5) Bam HI. B) Northern blot preparado con RNA polyA de cisticerco hibridado con la sonda de GAPDH. A la derecha del southern blot se muestra los tamaños moleculares del marcador λ H3 y a la izquierda del northern blot se muestra el tamaño del transcrito.

VI.8.- EXPRESION Y PURIFICACION DE LAS ENZIMAS RECOMBINANTES.

La región del cDNA que codifica para cada enzima fue clonado en el vector de expresión pRSET, el cual tiene el promotor de T7 que permite obtener un elevado grado de expresión. Para el caso de la TPI, se produjeron dos enzimas recombinantes, una con colas de histidinas y otra de tipo nativo. Para la GAPDH se produjo la enzima recombinante con colas de histidinas. Se obtuvieron rendimientos de aproximadamente 15 mg/L de cultivo bacteriano. Las proteínas de fusión contienen al péptido de histidinas, lo que permite su purificación por medio de cromatografía de afinidad a columnas conteniendo níquel. La purificación por este método dio como resultado enzimas recombinantes cuyo PM son de aproximadamente 27 kDa (TPI) y 37 kDa (GAPDH) con una pureza de más del 95%. Estas determinaciones se hicieron mediante análisis por densitometría y electroforesis en gel de acrilamida con SDS teñidos con azul de Coomassie. Un gel similar fue transferido a nitrocelulosa para verificar la especificidad de los anticuerpos producidos en conejo. (Fig 13).

La TPI tipo silvestre fue purificada mediante una precipitación con sulfato de amonio al 50% y dos cromatografías, una de filtración en sefacyl S-300 y otra de intercambio iónico (Mono Q) que dieron como resultado una enzima con más del 95% de pureza y un peso molecular de 27 kDa que concuerda con el tamaño deducido en base a la secuencia de aminoácidos. Sin embargo, el rendimiento mediante esta técnica de purificación fue 50% menor que el de la purificación con la columna unida a níquel (Fig 14).

El tamaño molecular de la TPI en su forma silvestre fue determinado por una columna de filtración en superdex 75. La proteína eluye en el peso correspondiente a los 50 kDa, de acuerdo a los marcadores de PM utilizados para calibrar la columna. Este PM es de aproximadamente el doble del observado para cada monómero en SDS-PAGE, indicando que esta enzima es dimérica, al igual que la TPI de otros organismos reportados (Fig 15).

VI.9.-ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LAS ENZIMAS RECOMBINANTES.

Las TPI recombinantes con histidinas y tipo silvestre fueron empleadas en ensayos de actividad enzimática utilizando como sustrato diferentes concentraciones de gliceraldehído 3- fosfato. Para la enzima con cola de histidinas, la V_{max} obtenida fue de $2793 \mu\text{mol}(\text{min}.\text{mg})^{-1}$ y la K_m de 0.368 mM (Fig 16A), mientras que la enzima sin histidinas presentó una V_{max} de $5683 \mu\text{mol}(\text{min}.\text{mg})^{-1}$ una K_m de 0.758 mM (Fig 16B). En el caso de la GAPDH, la enzima purificada no tuvo actividad enzimática con el sustrato gliceraldehído 3-fosfato.

29-A

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

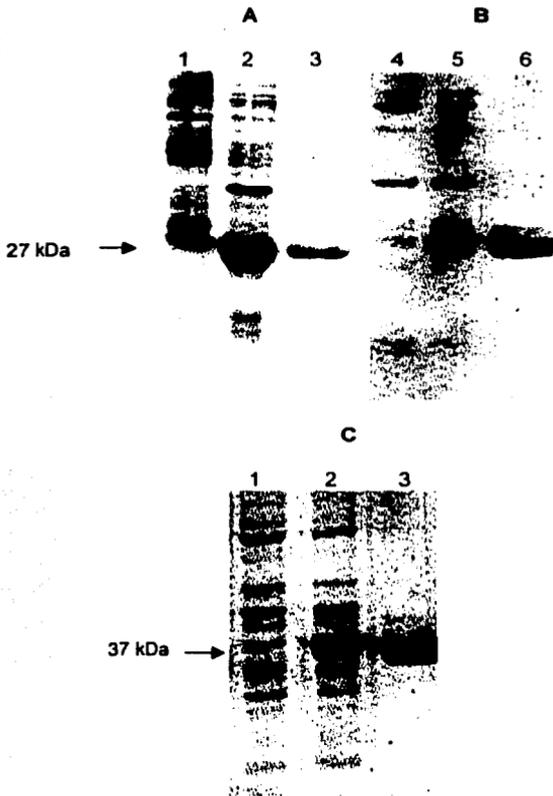


Fig 13. Purificación de la TPI y GAPDH recombinantes de *T. solium* fusionadas a histidinas. A) muestra un gel de acrilamida al 10% teñido con azul de Coomassie: 1) *E. coli* sin expresar, 2) *E. coli*, expresando la TPI, 3) TPI purificada por columnas de Hitrap. B) Inmunoelctrotransferencia de un gel similar al A, enfrentado con el suero anti-TPI (1:1000). C) Expresión y purificación de la GAPDH recombinante: 1) *E. coli* sin inducir, 2) *E. coli* expresando la GAPDH, y 3) GAPDH purificada.

29-B

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

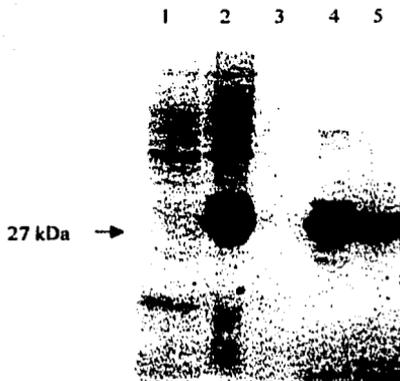


Fig 14. Purificación de la TPI de tipo silvestre de *T. solium*. Gel de acrilamida al 10% teñido con azul Coomassie. 1) Extracto de *E. coli* sin inducir, 2) Precipitado al 50% con sulfato de amonio del extracto de *E. coli* expresando la TPI, 3) Sobrenadante de la precipitación al 50%, 4) fracción obtenida mediante cromatografía de filtración (sephacryl S-300) y 5) TPI pura obtenida por cromatografía de intercambio iónico (Mono Q).

29-C

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

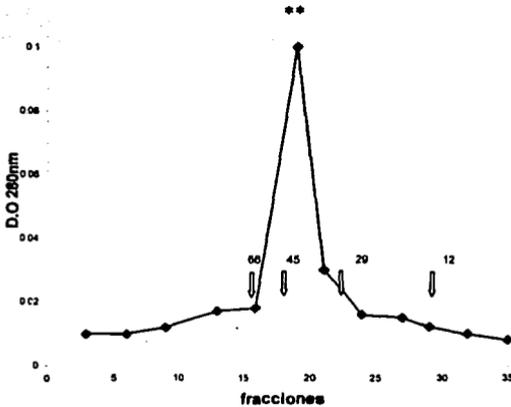


Fig 15. Determinación del peso molecular nativo de la triosa fosfato isomerasa de *T. solium*. La figura muestra el perfil de la elución de TPI recombinante filtrada en una columna de Superdex 75. La línea continua representa la absorbancia de la proteína a DO_{280} nm. Los asteriscos indican las fracciones con actividad enzimática. Las flechas indican la posición de la elución de los marcadores: BSA, Ovoalbúmina, Anhidrasa Carbónica y Ribonucleasa A. Los números indican el peso molecular de estas moléculas en kDa.

29-D

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

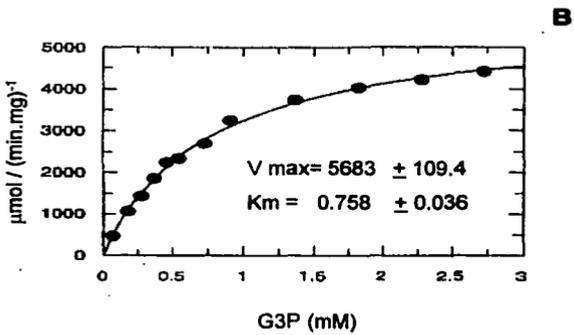
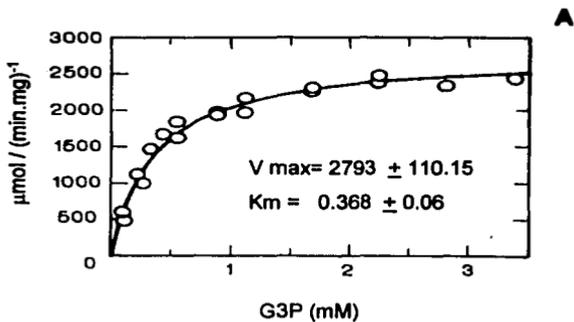


Fig 16. Actividad enzimática de las enzimas recombinantes: A) TPI con histidinas, B) TPI tipo silvestre.

VI.10.- ESTABILIDAD A LA DILUCION.

La TPI sin histidinas se incubó a diferentes concentraciones a 25°C, y se le determinó actividad a diferentes intervalos de tiempo. La actividad de la enzima sin diluir (500 ug/ml) fue considerada como el 100% y esta muestra perdió solo el 10% de actividad a lo largo del experimento (1). Las diluciones correspondientes a 10 µg/ml y 5 µg/ml (2 y 3) perdieron un 20% de actividad a los 3 días de incubación, un 50% a los 7 días y un 55% a los 15 días, las concentraciones de 1 µg y de 500 ng/ml perdieron el 20% de actividad a las 24 horas de incubación, un 40% a los 3 días y un 55% entre los 7 y 15 días. La reducción en las concentraciones menores a 100 ng fue del 30% después de un día de incubación, del 50% a los 3 días y a los 7 y 15 días habían perdido entre un 60 y 70% de actividad (Fig 17).

VI.11.- INHIBICION POR ANTICUERPOS

La TPI fue incubada una hora a 25°C con diferentes diluciones del suero anti-TPI producido en conejo. La actividad fue medida con 4 ng de enzima tomada de cada dilución bajo las mismas condiciones utilizadas para la cinética enzimática. Cuando 500 ng de enzima fueron incubadas con el suero a una dilución 1:10 se observó un 73.5% de inhibición de la actividad de la enzima, en la dilución 1:100 se observó una inhibición del 50% y en la dilución 1:1000 la inhibición fue del 30%. En la dilución 1:5000 no hay efecto significativo en la reducción de actividad. Cuando se incubó a la enzima con suero normal de conejo 1:100 no se observó efecto en la actividad enzimática, sin embargo la dilución 1:10 redujo un 19 % la actividad enzimática (Fig 18).

VI.12.- ENSAYOS DE VACUNACION.

Los ratones vacunados con dosis de TPI de 0.5, 1 y 5 µg/ratón con saponina, fueron sacrificados un mes después de la infección. Se obtuvo una reducción en la carga parasitaria del 50% con respecto al grupo control el cual fue inyectado sólo con adyuvante. Si se utiliza una dosis de 10 µg no se obtiene reducción estadísticamente significativa. Con hidróxido de aluminio se obtienen resultados similares, pero al usar el adyuvante completo de Freund se observó que la dosis de 1 µg no reduce significativamente el número de parásitos mientras que la dosis de 10 µg los reduce a menos del 50%, estos experimentos se realizaron por duplicado. Se decidió trabajar con saponina. Experimentos posteriores con dosis de 1 µg de TPI mostraron consistentemente el mismo resultado cuando los animales son sacrificados al mes de la infección (Tabla 1). Sin embargo, cuando los animales son sacrificados dos meses después no se observó protección. Al inmunizar con GAPDH, no se observaron diferencias entre los animales vacunados y los animales control. Cabe mencionar que la GAPDH sólo fue evaluada con el protocolo donde se sacrifican los animales 2 meses después de la infección (Tabla 2). Como ambas

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

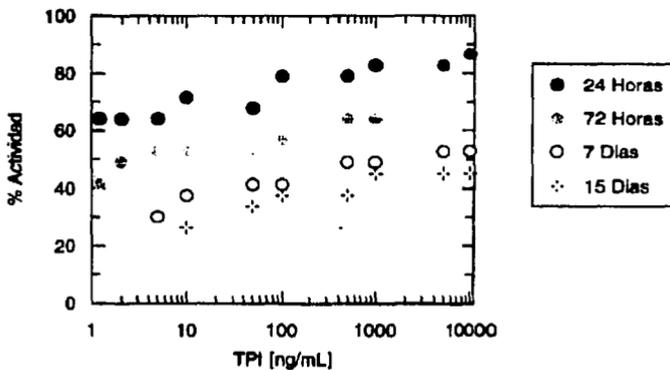


Fig 17. Estabilidad de la TPI a la desnaturalización por dilución. La gráfica presenta el porcentaje de actividad obtenido para cada muestra contra las diferentes concentraciones por ml de enzima, a diferentes tiempos de incubación. (enzima sin diluir [500 μ g], 10 μ g/ml, 5 μ g/ml, 1 μ g/ml, 500 ng/ml, 100 ng/ml, 50 ng/ml, 10 ng/ml, 5ng/ml, 2 ng/ml, 1.2 ng/ml).

36-B

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

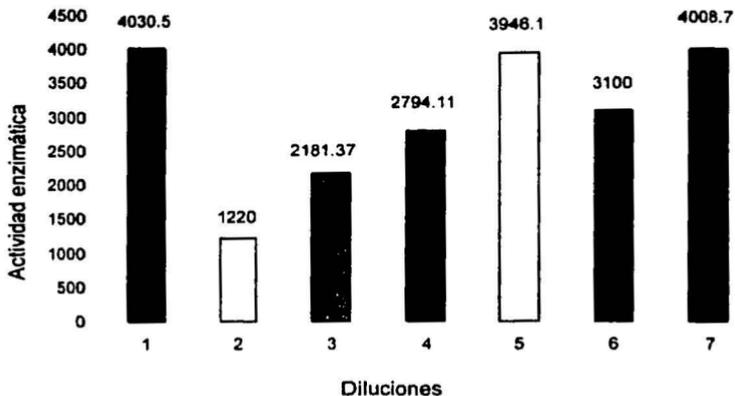


Fig 18. Inhibición por anticuerpos de la actividad enzimática (eje Y) de la TPI. La enzima fue incubada en solución con suero de conejo anti-TPI de *Taenia solium* a diferentes diluciones: 1) sin suero. 2) dilución 1:10. 3) 1:100. 4) 1: 1000. 5) 1: 5000, 6) enzima con un suero preinmune de conejo 1:10 y 7) 1:100.

Tabla 1. Determinación de la carga parasitaria después de la vacunación con TPI. Se muestran los resultados obtenidos con diferentes adyuvantes y diferentes dosis de antígeno en ratones sacrificados un mes después de la infección. Los valores son representativos de al menos dos repeticiones de cada experimento. Los asteriscos indican que el valor fue estadísticamente significativo ($P < 0.01$)

ADYUVANTE	ANTIGENO	No. PARASITOS	% REDUCCIÓN DE PARASITOS
SAPONINA	PBS	143±53	—
SAPONINA	TTPI 10 µg	117±39	18.2
SAPONINA	TTPI 5 µg	79±46	44.7*
SAPONINA	TTPI 1 µg	69±46	51.7*
SAPONINA	TTPI 0.5 µg	79±46	44.7*
SAPONINA	ROP 10 µg	154±61	—
SAPONINA	EC 10 µg	20±32	86.*
HIDROXIDO DE ALUMINIO	PBS	105±50	—
HIDROXIDO DE ALUMINIO	TTPI 10 µg	98±51	6.7
HIDROXIDO DE ALUMINIO	TTPI 1 µg	53±31	49.5 *
ACF	PBS	137±65	—
ACF	TTPI 10 µg	76±28	44.3 *
ACF	TTPI 1 µg	111±53	19.2

30-D

Tabla 2. Carga parasitaria en ratones sacrificados dos meses después de la infección. La tabla muestra los resultados de al menos dos repeticiones para cada experimento.

ADYUVANTE	ANTIGENO	No. PARASITOS	% REDUCCIÓN DE PARASITOS
SAPONINA	PBS	721±178	-----
SAPONINA	TTPI 1 µg	560±297	22.3
SAPONINA	TGAPDH 100 µg	858±213	-----
SAPONINA	TGAPDH 10 µg	791±277	-----
SAPONINA	TGAPDH 1 µg	709±198	-----
SAPONINA	ROP 10 µg	696±217	3

enzimas están unidas a un péptido de histidinas, se inmunizó otro grupo de ratones con una proteína no relacionada fusionada a este péptido (ROP2 de *T. gondii*), purificada igual que la TPI para verificar que las histidinas introducidas al sistema no tuvieran relación con la cantidad de parásitos o con la respuesta inmune del ratón. El número de parásitos que se encontró en los animales de este grupo no fue diferente al del grupo control. Además, se usó extracto crudo de cisticerco en otro grupo de ratones como control positivo de protección, y se observó una reducción del 86% en el número de parásitos que concuerda con reportes previos utilizando este extracto (Vibanco y col., 1999).

VI.13.-RESPUESTA INMUNE HUMORAL EN LOS ANIMALES VACUNADOS.

Los animales vacunados con la TPI generaron una respuesta humoral en contra de la enzima, que se determinó por medio de un ensayo inmunoenzimático (ELISA) usando como antígeno de captura a la enzima recombinante. Se observó la presencia de los isotipos IgG1 e IgG2a en los animales inmunizados. Sin embargo, en el caso de los ratones inmunizados con 10 µg de enzima, hubo mayor cantidad de IgG1 y menor cantidad de IgG2a con respecto a los otros grupos. En este grupo no se observó reducción significativa en el número de parásitos. Los anticuerpos no disminuyeron a lo largo del experimento, y a los dos meses presentaron una absorbancia en ELISA similar a la que observa un mes después de la infección. No se observó presencia de IgE en ninguno de los grupos. (Fig 19).

Los animales vacunados contra GAPDH también generaron una respuesta humoral de tipo IgG contra la enzima, sin embargo en este caso esta respuesta no fue suficiente para proteger a los ratones de la infección. (Fig 20). En este caso no se determinaron isotipos, además, no se observó reacción cruzada de los sueros de los ratones inmunizados con la proteína no relacionada (ROP) con las enzimas utilizadas, lo que indica que los anticuerpos producidos no están dirigidos hacia el péptido de histidinas, sino hacia las enzimas recombinantes.

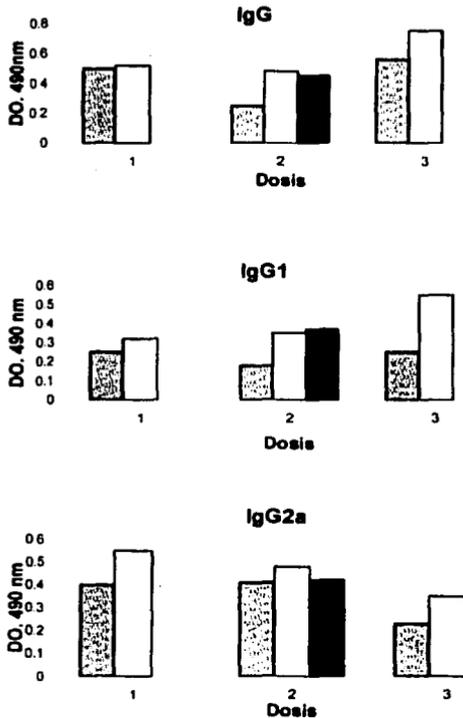


Fig 19. Inmunoglobulinas presentes en los ratones vacunados con la TPI de *T. solium*. 1) dosis de 0.5 μ g, 2) dosis de 1 μ g, 3) dosis de 10 μ g. Las barras grises corresponden al sangrado de la primera semana después de la segunda inmunización. Las barras blancas al sangrado del sacrificio a un mes y las barras negras corresponden al sangrado del sacrificio a los dos meses de la infección.

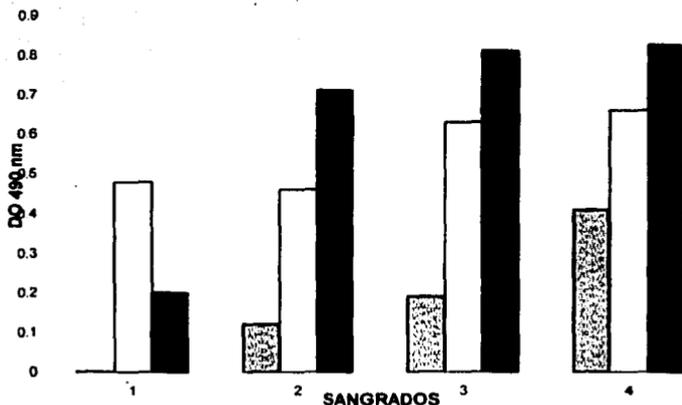


Fig 20. Anticuerpos IgG anti-GAPDH presentes en los ratones inmunizados con esta enzima. La gráfica muestra el valor de DO_{490 nm} de los anticuerpos de los ratones inmunizados con diferentes concentraciones de enzima: 1 µg (barras grises), 10 µg (barras blancas) y 100 µg (barras negras) que reconocen a la GAPDH de *T. solium*. Sangrados: 1) Una semana después de la 2ª inmunización. 2) Una semana después del reto. 3) Un mes después de la infección. 4) 2 meses después de la infección.

VII. DISCUSION

La cisticercosis en humanos, tiene importantes repercusiones en el ámbito socio-económico y en la salud humana (Flisser, 1990). En algunas zonas del país se han reportado prevalencias de seropositividad a la cisticercosis en cerdos hasta del 29% (Widdowson y col., 2000). Se ha observado que los factores epidemiológicos de la enfermedad (condiciones inapropiadas para la crianza del cerdo, inadecuadas instalaciones sanitarias, fecalismo al aire libre, falta de higiene personal), constituyen un serio riesgo de infección para la población general (Schantz y cols., 1993). Los tratamientos para la cisticercosis no siempre resultan efectivos ya que los daños provocados por los parásitos en el cerebro, a veces son permanentes y las drogas no resultan efectivas en todas las manifestaciones clínicas, además, su uso indebido podría generar la resistencia a estos fármacos en los parásitos, como ya ha sucedido en otras parasitosis (Liang y col., 2001).

Las campañas educativas han mostrado ser muy efectivas en el control de la enfermedad, como lo demuestra un estudio realizado en una comunidad rural de México para evaluar una campaña de educación sanitaria y conocimiento acerca de la transmisión de la cisticercosis. En este estudio se redujo considerablemente la transmisión de esta enfermedad en cerdos (Sarti y col., 1997). Sin embargo, estas campañas deben ser llevadas a cabo de manera constante por personal entrenado y conocedor de la parasitosis y complementadas con la identificación y desparasitación de portadores de tenias (Flisser y col., 2001). Por otro lado, la mayoría de los países afectados no cuentan con recursos para adquirir infraestructura y materiales adecuados para el tratamiento de aguas negras, así como para la crianza controlada del ganado porcino.

Resulta importante contar con métodos alternativos de protección que reduzcan el riesgo de contraer la infección. Actualmente se han identificado importantes inmunógenos en contra de la cisticercosis, y otras parasitosis causadas por helmintos (Smith y Jonson 1988, Plancarte y col., 1999, Vivanco-Pérez y col., 1999, Huerta y col., 2001). Entre estos inmunógenos se encuentran las enzimas glicolíticas triosa fosfato isomerasa y gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (Ferru y col., 1997, Argiro y col., 2000). Estas enzimas tienen un importante papel en el metabolismo de todos los organismos. La TPI está involucrada en la conversión de la dihidroxiacetona fosfato en gliceraldehído 3-fosfato, lo que permite la ganancia neta de 2 ATP en la glicólisis. Esta enzima es importante en el desarrollo, y en humanos se ha observado que su deficiencia (menos del 50%) genera graves complicaciones neuromusculares que derivan en la muerte por la acumulación de la dihidroxiacetona fosfato (Maquat y cols., 1985). La actividad de la TPI es muy alta y adopta un patrón de plegamiento $(\alpha/\beta)_8$ común en varias enzimas que catalizan reacciones muy diversas (Brändén 1991; Sun y cols., 1992). Por otro lado, la GAPDH ha sido asociada a diversas funciones y ha sido considerada como un marcador de resistencia a la esquistosomiosis, pues se encontró que los individuos de una zona endémica que presentaban altos títulos de anticuerpos en contra de la enzima, no desarrollaban la enfermedad (Dessein y col, 1988).

No hay evidencia de otras enzimas que realicen una función catalítica similar a estas enzimas, lo que sugiere que su inhibición podría llevar a la destrucción del parásito. Dado que esta teoría está siendo contrastada para otras parasitosis, la presente tesis ha sido enfocada a evaluar si estas enzimas pueden generar protección en contra de la cisticercosis.

La TPI se encuentra en baja concentración en varios organismos, por ejemplo, en el caso de *Leishmania mexicana* se reporta que a partir de 10 litros de cultivo de promastigotes se obtiene alrededor de 200 µg de enzima con un 60% de pureza (Kohl y cols., 1994). En el caso de *T. solium*, nosotros logramos purificar solo 10 µg a partir de 10 gramos de cisticercos, lo que nos habla de que la cantidad que se produce también es mínima. En base a esto, se diseñaron sondas específicas para aislar los cDNAs que codifican para estas enzimas, aprovechando la homología de las secuencias de aminoácidos de las TPIs descritas en otros organismos. Con estas sondas se tamizó una biblioteca de cDNA del cisticercos de la cual se aislaron clonas que codificaban para TPI y GAPDH. El patrón de restricción de las clonas para cada enzima es semejante, lo que sugiere que las respectivas clonas son derivadas de un mismo mRNA. Esta apreciación concuerda con algunos reportes sobre la presencia de un gen de copia única para cada enzima (Kohl y cols., 1994; Charrier-Ferrara y col., 1992).

El análisis de las secuencias nucleotídicas de los cDNAs que codifican para las enzimas TPI y GAPDH, presentó un marco abierto de lectura que codifica para una proteína de 27167 Da en el caso de la TPI y de 37391 Da para la GAPDH. Las secuencias de aminoácidos presentaron una homología que va del 50 al 75% con respecto a otras enzimas ya reportadas (Shoemaker y col., 1992, Maquat y col., 1985, Tso y col., 1985, Charrier-Ferrara y col., 1992). Este punto es muy importante, ya que a pesar de la alta homología que existe entre las enzimas de diferentes organismos, hasta la fecha no se han encontrado reacciones adversas al emplear este tipo de proteínas en ensayos de vacunación, como podría ser el caso de reacciones autoinmunes al generarse anticuerpos que no discriminen a la enzima del huésped. Nuestros resultados muestran que los aminoácidos involucrados en la actividad catalítica de las enzimas son idénticos a los de otras especies ya reportadas, como los aminoácidos de TPI K-13, H-95, la región que forma el capuchón que cubre al sustrato YEPVWAIGTG y los aminoácidos D-15 y N-71 que son sitios posiblemente involucrados en la formación del dímero (Maquat y cols., 1985). En la GAPDH se encontraron los aminoácidos ASCTTNCL que corresponden al sitio activo y los aminoácidos T-182, R-233 que unen al sustrato. No hay claros dominios hidrofóbicos característicos de membranas pero sí bastantes dominios hidrofílicos a lo largo de las moléculas, reforzando la idea que se trata de enzimas solubles.

Existe un posible sitio de glicosilación del tipo N-glicosílico en la TPI y 5 sitios del mismo tipo en la GAPDH, sin embargo no se han reportado a estas enzimas como glicosiladas. El punto isoeléctrico estimado fue de 6.6 en el caso de la TPI y de 8.3 para GAPDH, lo cual resultó importante para su purificación (Hannaert y col., 1992). La GAPDH esta considerada como la enzima glicolítica más conservada entre las

especies, lo que corroboramos al encontrar hasta un 75% de identidad entre la enzima de cisticerco y otras reportadas (Tso y col., 1985, Charrier-Ferrara y col., 1992, Waive y col., 1993).

Los análisis de hibridación con DNA genómico y RNA, apoyan la sugerencia de que solo hay un gen codificante y un solo transcrito para estas enzimas en el cisticerco de *Taenia solium*, en contraste con lo reportado en humanos, donde si bien hay un solo gen funcional, hay varios pseudogenes detectados por medio de análisis tipo Southern (Tso y col., 1985).

Por otro lado los análisis de secuencia de los fragmentos genómicos mostraron la presencia de intrones que interrumpen a las regiones codificantes. En el caso de la TPI, encontramos 4 intrones, en el caso de la GAPDH se encontraron 2 intrones, la posición de los intrones de ambas enzimas concuerda con los intrones reportados en *S. mansoni* (dos Reis y col., 1993, Charrier-Ferrara y col., 1992). Estos intrones son ricos en pirimidinas y los puntos de corte y empalme presentan la secuencia consenso (5'-GT....AG-3'), típica de los genes eucariontes. En el caso de organismos más evolucionados, existen más intrones dentro del gen de GAPDH. En el pollo se encuentran 11 y en el humano 8 (Stone y col., 1985, Ercolani y col., 1988). En el caso de la TPI, el número de intrones varía entre las especies.

Las regiones codificantes de los cDNAs fueron clonadas en un vector de expresión. Se obtuvieron rendimientos de 15 mg de enzima pura por litro de cultivo, cuando se transformaron las construcciones con cola de histidinas y del 7.5 mg por litro cuando se transformó la construcción tipo silvestre, de esta manera logramos obtener suficiente enzima para los ensayos de caracterización y vacunación. Las enzimas recombinantes fueron purificadas a más del 95% y caracterizadas bioquímicamente. Los resultados de actividad que se realizaron con las TPIs recombinantes, demuestran que esta enzima es funcional y que los valores obtenidos de Km y Vmax se encuentran dentro del rango que se ha reportado para las TPIs de otros organismos (Landa y col., 1997, Borchert y col., 1993). Sin embargo, se observan diferencias en cuanto a la velocidad máxima y la Km entre ambas, indicando que la cola de histidinas reduce la actividad. En un reporte previo se observó que una construcción con histidinas genera una enzima con menor estabilidad a la dilución que una tipo silvestre, empleando al mismo cDNA (Landa y col., 1997). Por este motivo, los siguientes ensayos de caracterización bioquímica se realizaron con la enzima tipo silvestre. Las TPIs en general son diméricas y la disminución que se observa en la actividad catalítica en las muestras diluidas a bajas concentraciones, es debido a la disociación del dímero a monómeros inactivos. La inactivación de la enzima de *T. solium* se da de manera gradual, ya que se requieren varios días para que se lleve a cabo. Los reportes que existen para otras TPIs, muestran que algunas son muy inestables, por ejemplo la TPI de humano, así como algunas mutantes producidas a partir de ella (Mainfroid y col., 1996), mientras que otras son sumamente estables y continúan teniendo la misma actividad a muy bajas diluciones, como es el caso de la TPI de *Entamoeba histolytica* y *Leishmania mexicana*, las cuales son estables a dilución de 10 ng por mililitro durante varias semanas (Kohl y col., 1994, Landa y col., 1997). Desafortunadamente la GAPDH de

T. solium no presentó actividad enzimática por lo que no pudimos realizar una caracterización enzimática similar a la realizamos para la TPI. Una explicación factible del por qué nuestra enzima recombinante no tiene actividad podría ser que el sistema bacteriano utilizado para producirla no la pliegue correctamente dado que se trata de un tetrámero, o bien que la cola de histidinas afecte completamente la actividad. Existen reportes previos para esta enzima donde demuestran que en un organismo, existen dos clases, una que es activa y otra no activa a pesar de ser codificada por el mismo gen (Ercolani y col., 1988), quizás en el cisticerco también exista este fenómeno. Por supuesto, experimentos a futuro comprenden la identificación de más clonas en la biblioteca para tratar de obtener una recombinante activa y realizar la caracterización bioquímica de la enzima o bien utilizar otros sistemas de expresión en levadura o mosquito. Sin embargo sí se pudo utilizar para los ensayos de protección, donde no se requiere la actividad.

Dado que nuestro objetivo principal es evaluar si las enzimas confieren protección en contra de la cisticercosis, resulta importante determinar si generan una respuesta inmune específica y si esta es capaz de inactivarlas. Para esto se generó un suero específico en conejo en contra de la TPI y se realizó un ensayo de inhibición de la actividad por la unión de estos anticuerpos. Los resultados muestran que estos anticuerpos se unen a la enzima y que inhiben su actividad en una manera dependiente y directamente proporcional a la cantidad de anticuerpos utilizados. Así confirmamos que la enzima es capaz de inducir una respuesta inmune que puede bloquear la función catalítica.

Tanto la TPI como la GAPDH son consideradas antígenos protectores en la esquistosomiasis causada por *S. mansoni* y *S. japonicum* ya que confieren una protección de alrededor del 40% en ratones y se perfilan junto con otras proteínas (glutación S-transferasa) como uno de los antígenos candidatos para la realización de una vacuna contra la esquistosomiasis (Harn y cols., 1992, Argiro y col., 2000). Nosotros decidimos realizar la evaluación de estas enzimas empleando un modelo de cisticercosis murina- *T. crassiceps*. Este modelo ha sido implementado en los laboratorios de tal manera que los cisticercos se reproducen por gemación en el peritoneo del ratón, lo que hace innecesaria la presencia del hospedero definitivo, facilitando la obtención de los cisticercos. La efectividad de este modelo ya ha sido probado con algunos antígenos de *T. solium* que tienen reacción cruzada con los antígenos de *T. crassiceps* y generan protección (Sciutto y col., 1990, Vibanco-Pérez y col., 1999, 2002). Cuando utilizamos la enzima recombinante TPI para inmunizar ratones, observamos que al emplear el adyuvante Completo de Freund, la respuesta es directamente proporcional a la dosis empleada, es decir mientras mayor dosis, mayor protección, mientras que cuando usamos como adyuvante a la alúmina o a la saponina se observa un efecto inverso. Por tal motivo descartamos en principio el uso del adyuvante de Freund, además de que este compuesto se ha ido descontinuando en su uso por los efectos secundarios negativos que provoca. Cuando usamos los adyuvantes alúmina y saponina observamos que dosis de 1 µg generan reducción de aproximadamente 50% en el número de parásitos

encontrados en el peritoneo un mes después de la infección. Por lo que se decidió utilizar únicamente la dosis de 1 μg para los siguientes experimentos con saponina como adyuvante dado que este compuesto estimula la respuesta inmune tanto humoral como celular, y se ha observado que tiene la capacidad de llevar a los antígenos directamente al citosol de la células presentadoras de antígeno para estimular respuestas inmunes por linfocitos T citotóxicos (Kampstrup y col., 2000, Vogel 2000). Consistentemente hubo 50% de reducción en la carga parasitaria al sacrificar a los animales un mes después de la infección, es decir, el experimento era altamente reproducible.

Con el objetivo de determinar si la inmunidad generada por la vacunación era capaz de mantener el porcentaje de reducción en la carga parasitaria por más tiempo, aumentamos el periodo de infección, sacrificando a los animales dos meses después de inocularlos con los parásitos. Aunque la respuesta inmune que genera la enzima se mantiene elevada durante los dos meses de infección, no es suficiente, en este modelo, para mantener el nivel de reducción de parásitos observado al mes de infección. En nuestro grupo se ha probado en el mismo modelo otra enzima (Glutatión S-transferasa) que reduce considerablemente la carga parasitaria durante por lo menos dos meses (Vivanco-Pérez y col, 2002). En el caso de la GAPDH no logramos obtener reducciones en el número de parásitos, resultado que nos lleva a sugerir que esta enzima no puede ser considerada como candidata a vacuna, a pesar de que la respuesta humoral que genera es alta. Este resultado va en contra de lo encontrado en la esquistosomiosis donde a la GAPDH la han relacionado con protección (Dessein y col., 1988, Goudot-Crozel y col., 1989). Para hacer más específica la respuesta inmune y aumentar la capacidad protectora, se ha sugerido el diseño de péptidos o regiones poco conservadas de las enzimas que contengan determinantes antigénicos para vacunación. Hasta la fecha, se ha logrado generar respuestas inmunes fuertes contra estos antígenos y niveles de protección similares a las obtenidas con las enzimas completas (Argiro y col., 2000, Yang y col., 2001).

Nosotros hemos identificado regiones de las TPI de *T. solium* que tienen diferencias importantes con respecto a las de sus hospederos, por ejemplo el primer tercio de la región codificante y dos secuencias peptídicas en la región COOH-terminal que podrían servir para estos propósitos.

Mucho se ha especulado acerca de las características que deben cumplir las respuestas inmunes para ser protectoras, entre ellas, el tipo celular que se estimula. En la cisticercosis, algunos autores han sugerido que una respuesta protectora tiene un sesgo hacia Th1 que está caracterizada por la presencia de interleucina 2, e Interferón-gamma que favorecen la producción de IgG2a (Villa y Jun, 1996, Terrazas y col., 1999), mientras que otros opinan que una respuesta protectora se asocia a una mezcla Th1/Th2 (Toejense y col., 1999). Nosotros encontramos una respuesta humoral mixta no protectora, dado que encontramos tanto IgG1 como IgG2a en el suero de los ratones vacunados, que se mantuvo durante los 2 meses de la infección.

En otras parasitosis se ha logrado un avance muy importante en el diseño de drogas utilizando a estas enzimas como blanco y si bien no es posible atacar directamente las regiones que son conservadas, se han identificado aminoácidos no conservados que son importantes para mantener la estructura o bien la actividad de la enzima. Algunos de estos aminoácidos podrían ser blanco para drogas especie-específicas que bloqueen la actividad al alterar la estructura de la enzima sin perturbar a las enzimas homólogas de otras especies que tengan residuos diferentes en esa posición (Gómez-Poyou y cols., 1995, Velanker y col., 1997 Suresh y col., 2001). Experimentos a futuro con las enzimas de *T. solium* contemplan su caracterización estructural para un posible diseño racional de inhibidores que no tengan efecto sobre las enzimas de los hospederos.

El trabajo aquí presentado, es el primero en caracterizar enzimas del ciclo glicolítico de un céstodo. Por otro lado, para el caso de la TPI, se podría mejorar la respuesta inmune utilizando péptidos (MAPS) o fusiones con otras proteínas, vías y formas de inmunización para aumentar su antigenicidad. También es importante mencionar que la información aquí contenida puede ser la base de tratamientos farmacológicos y/o inmunológicos en contra de este parásito en el que se exploten las diferencias moleculares entre los organismos.

VIII. CONCLUSIONES

- 1) Se aislaron los cDNAs que codifican para las enzimas glicolíticas TPI y GAPDH de *Taenia solium*.
- 2) El análisis de las secuencias nucleotídicas de los cDNAs reveló que ambas tienen identidades del 50 al 75% con enzimas de otras especies reportados y que los aminoácidos involucrados en la actividad catalítica se mantienen conservados.
- 3) Los genes (TPI y GAPDH) son copia única y presentan intrones con sitios de corte y empalme idénticos a los de los eucariontes.
- 4) En el RNA de *Taenia solium* se encontró un solo transcrito para TPI y GAPDH.
- 5) Se produjo una TPI recombinante funcional:
actividad específica de 5683 $\mu\text{mol (min.mg)}^{-1}$.
estable a una dilución de 500 ng/ml.
- 6) Ambas enzimas inducen una respuesta inmune humoral.
- 7) La actividad enzimática de la TPI es inhibida por anticuerpos específicos.
- 8) La GAPDH recombinante de *T. solium*, no presentó actividad catalítica.
- 9) Este trabajo abre la posibilidad de continuar los experimentos de vacunación utilizando regiones no conservadas, diferentes adyuvantes, vías de inmunización y modelos de cisticercosis (*Taenia taeniaeformis*-rata) para aumentar la protección.
- 10) Da la oportunidad de estudiar el tipo de respuesta inmune que se genera contra enzimas o antígenos solubles (Th1 o Th2).
- 11) Mediante análisis estructurales de estas enzimas se puede estudiar el diseño racional de drogas específicas para su inhibición y control de la parasitosis.

IX. APENDICES

1.- MEDIOS DE CULTIVO, SOLUCIONES Y AMORTIGUADORES

MEDIO SOB	
Bacto-triptona	20.0 gr.
Extracto de levadura	5.0 gr.
NaCl	0.5 gr.
MgSO ₄ 7H ₂ O a concentración final de	10.0 mM.
KCl	2.5 mM.

MEDIO LURIA BERTANI	
Bacto-triptona	10.0 gr.
Extracto de levadura	5.0 gr.
NaCl	10.0 gr.

MEDIO SM	
NaCl	5.8 gr.
MgSO ₄ 7H ₂ O	2.0 gr.
Tris-HCl 1M pH 7.5	50.0 ml.
Gelatina al 2%	5.0 ml.

Los componentes se disuelven y se aforan a un litro. El pH de todos los medios se ajusta a 7.0 y se esterilizan en autoclave por 20 min a 15 Lb de presión en ciclo líquido. El Mg⁺⁺ y K⁺ se esterilizan por filtración a través de membranas con poros de 0.22 μ m de diámetro.

Para medios sólidos se les adiciona 1.5% de bacto agar o agarosa y 0.75% para top agar. Para el fago Lambda, se les adiciona 0.02% de maltosa, el cual es un inductor del gen lambB que codifica para el receptor del fago.

SOLUCION SSC 20X 1 L. (solución de citratos salina)	
NaCl	3.0 M.
Citrato de Na 3 H ₂ O	0.3 M.
Ajustar a pH 7.0	

SOLUCION DE DENHARDT'S 50X (0.5 L)	
Ficoll 400	5.0 gr.
Polivinilpirrolidona	5.0 gr.
BSA fracción V	5.0 gr.
La solución se filtra por 0.22 μ m y se guarda a -20°C.	

AMORTIGUADOR TAE 50% (1 L)	
Tris base	242.0 gr.

AMORTIGUADOR TAE 50% (1 L)

Tris base	242.0 gr.
Acido acético glacial	51.7 ml.
EDTA (0.5M, pH 8)	100.0 ml.

AMORTIGUADOR TE pH 8.0

TrisCl pH 8.0	10 mM.
EDTA (pH 8.0)	1 mM.

AMORTIGUADOR DE FOSFATOS SALINO (PBS)

NaCl	137 mM
KCl	2.7 mM
Na ₂ HPO ₄ 7H ₂ O	4.3 mM.
KH ₂ PO ₄	1.4 mM.

AMORTIGUADOR DE CARGADO PARA PROTEINAS

H ₂ O desionizada	3.8 ml
Tris-HCl 0.5M pH 6.8	1.0 ml
SDS 10%	1.6 ml
2-mercaptoetanol	0.4 ml
Azúl de bromofenol	50 µg

AMORTIGUADOR DE ELECTROFORESIS PARA PROTEINAS (5x) 600 ml

Tris base	9.0 g
Glicina	43.2 g
SDS	3.0 g

AMORTIGUADOR NEUTRALIZANTE PARA REACCIONES DE SECUENCIA

Tris-HCl pH 7.5 400 mM / MgCl ₂ 200 mM	8 µl
HCl 1N	4 µl
H ₂ O	44 µl

AMORTIGUADOR DE TRANSFERENCIA PARA PROTEINAS

Metanol	20%
Tris base	25 mM
Glicina	192 mM

2.-GEL DE ACRILAMIDA PARA SECUENCIA DE DNA AL 6%

Urea	45.0 gr.
H ₂ O desionizada	21.0 ml.
Acilamida 40%-BIS 2%	18.0 ml.
Persulfato de amonio al 10%	800.0 ul.
Temed	30.0 ul.

3.-TECNICAS GENERALES

Preparación de células competentes con CaCl₂

Una colonia de células se siembra en 5 ml de SOB y se incuba a 37°C toda la noche. 0.5 ml de este cultivo se siembran en 50 ml de medio hasta una DO₆₀₀ nm de 0.5. El cultivo se centrifuga a 2500 xg durante 10 min y la pastilla se resuspende en una solución fría de CaCl₂ 0.1M (20 ml), incubándose durante 30 min. Las células son nuevamente centrifugadas y resuspendidas en una solución similar, pero conteniendo 20% de glicerol estéril. Las células competentes se almacenan a -70°C en alícuotas pequeñas y se descongelan en hielo antes de usar.

Titulación de Fagos.

Realizar diluciones en SM 1x10², 1x10⁴, 1x10⁶ y 1x10⁸. Se toman 10 ul de cada dilución e incubarlas durante 15 minutos con 250 ul de células TG1 crecidas a D.O a 600 nm=0.5 a 37°C. Sembrarlas en medio SOB sólido con TOP-agar (3 ml) e incubar a 37°C durante 8 horas, contar las placas de lisis y ajustar el número a la dilución correspondiente.

Purificación de DNA por el método de perlas de vidrio.

El DNA se corre en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio, la banda se corta del gel y se incuba con yoduro de sodio a 37°C hasta que la agarosa se disuelva. Al término se le añaden 2 ul de perlas de vidrio, se agita en vórtex y se incuba en hielo durante 2 horas, agitándose de vez en cuando. Posteriormente se centrifugan durante 12 segundos, se desecha el sobrenadante, se resuspende en 500 ul de yoduro, se centrifuga otra vez y se resuspende rápidamente en la solución de lavado. El lavado se realiza 3 veces bajo las mismas condiciones. El DNA se eluye en TE.

Tratamiento alcalino para templados de doble cadena.

Se mezclan 1 pm de primer con 0.5 µl de NaOH 1N y se adicionan al templado de doble cadena. Se incuba a 37° C por 10 minutos para la desnaturalización y la hidrólisis del RNA.

4.- GLOSARIO DE TERMINOS MEDICOS

Aracnoiditis. Inflamación de la aracnoides

Ataxia. Falta o irregularidad de la coordinación, especialmente de los movimientos musculares, sin debilidad o espasmos de éstos.

Edema. Acumulación excesiva de líquido seroalbuminoso en el tejido celular, debido a diversas causas: disminución de la presión osmótica del plasma por disminución de las proteínas; aumento de la presión hidrostática en los capilares por insuficiencia cardíaca; mayor permeabilidad de las paredes capilares u obstrucción de las vías linfáticas.

Ependimitis. Inflamación del epéndimo (membrana que tapiza los ventrículos del cerebro: epéndimo ventricular) y el conducto central de la médula espinal (epéndimo espinal).

Hidrocefalia. Acumulación de líquido en el encéfalo por aumento de su producción en los plexos coroideos de los ventrículos o por disminución de su resorción. La enfermedad se caracteriza por aumento del volumen de la cabeza, con prominencia de la frente, debilidad mental por atrofia del cerebro y convulsiones.

Hipertensión endocraneana. Aumento de la presión vascular o sanguínea.

Pseudohipertrofia. Aumento del volumen de un órgano por desarrollo del tejido conjuntivo o adiposo, quedando invariable o sujeto a regresión el elemento parenquimatoso. La muscular se debe a una proporción excesiva de grasa en el tejido.

X. REFERENCIAS

Acevedo-Hernández A. Epidemiología de la cisticercosis porcina. En: Cisticercosis humana y porcina. Su conocimiento e investigación. Flisser A y Malagón F. (eds). Limusa. México 1989: 251.

Allan J; Velásquez-Tohom M; Fletes C; Torres-Alvarez R; Lopez-Virula G; Yurrita P; Soto de Alfaro H; Rivera A; García-Noval J. Mass chemotherapy for intestinal *Taenia solium* infection: effect on prevalence in humans and pigs. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1997. 91 (5) : 595.

Alber T; Banner DW; Bloomer AC; Petsko GA; Phillips D; Rivers PS; Wilson IA. On the three-dimensional structure and catalytic mechanism of Triose-phosphate isomerase. *Phil Trans R Soc Lond* 1981. B293: 169.

Antonluk S. Epidemiología de la neurocisticercosis. *Rev Neurol* 1999. 29: 331.

Argiro L; Henri S; Dessein H; Dessein A; Burgois A;. Identification of a protective immunity against *Schistosoma mansoni* with ovoalbumin-coupled Sm37-5 coadsorbed with granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) or IL-12 on alum. *Vaccine* 1999. 17: 13.

Argiro L; Kohlstädt S; Henri S; Dessein H; Matabiau V; Paris P; Burgois A; Dessein A. Identification of a candidate vaccine peptide on the 37 kDa *Schistosoma mansoni* GAPDH. *Vaccine* 2000. 18: 2039.

Balloul J; Grzych J; Pierce R; Capron A. A purified 28000 Dalton protein from *Schistosoma mansoni* adult worms protects rat and mice against experimental schistosomiasis. *Journal of Immunology* 1987. 138:3448.

Borchert TV; Pratt K; Zeelen JP; Callens M; Noble MEM; Opperdoes FR; Michels PAM; Wierenga RK. Overexpression of trypanosomal triosephosphate isomerase in *Escherichia coli* and characterization of a dimer-interface mutant. *Eur J Biochem* 1993. 211: 703.

Borchert TV; Abagyan R; Jaenicke R; Wierenga RK. Design, creation, and characterization of a stable, monomeric triosephosphate isomerase. *Proc. Natl. Acad. Sci* 1994. 91: 1515.

Botero D; Tanowitz HB; Weiss LM; Wittner M. Taeniasis and Cysticercosis. *Infect Dis Clin North Am Sep* 1993. 7(3): 683.

Botero D; Restrepo M. Parasitosis humanas 3ª. Ed. Corporación para Investigaciones Biológicas, Medellín Colombia, 1998.

Brändén CI. The TIM barrel – The most frequently occurring folding motif in proteins. *Current Opinion in Structural Biology* 1991. 1: 978-983.

Creasy JL; Alarcon JJ. Magnetic resonance imaging of neurocysticercosis. *Topics in Magnetic Resonance Imaging* 1994. 6(1): 59.

Chang KH; Kim WS; Cho SY; Han MC; Kim CW. Comparative evaluation of brain CT and ELISA in the diagnosis of neurocysticercosis *Am J Neuroradiol* 1988. 9: 125.

Chang-Yuan W; Hong-Hua Z; Ling-Yun G. A Mab-Based ELISA for Detecting Circulating with Neurocysticercosis. *Hybridoma* 1992. 11(6): 825.

ChARRIER-Ferrara S; Caillol D; Goudot-Crozel V. Complete sequence of the *Schistosoma mansoni* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene encoding a major surface antigen. *Mol Biochem Parasitol* 1992. 56: 339.

Damonte V. Desconocimiento de la epidemiología de la cisticercosis en México. *Salud Pública de México* 1983. 25(3): 301.

Davis LE; Kornfeld M; Neurocysticercosis: neurologic, pathogenic, diagnostic and therapeutic aspects. *Eur Neurol* 1991. 31: 229.

De Aluja A; Villalobos AN; Plancarte A; Rodarte LF; Hernandez M; Zamora C; Sciutto E. *Taenia solium* cysticercosis: immunity in pigs induced by primary infection. *Vet Parasitol* 1999. 81 (2): 129

Del Brutto OH. Neurocysticercosis. *Rev Neurol* 1999. 29: 456

Desslein A; Begley C ; Demeure D ; Caillol J ; Fueri M ; dos Reis Z ; Andrade A ; Prata A ; Bina J. Human resistance to *Schistosoma mansoni* is associated with IgG reactivity to a 37 kDa larval surface antigen. *Journal Immunology* 1988. 140: 2727.

Díaz JF; Verastegui M; Gilman RH; Tsang V; Pilcher JB Gallo C; Garcia HH; Torres P; Montenegro T; Miranda E. Immunodiagnosis of human cysticercosis (*T. solium*): a field comparison of an antibody-enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), an antigen-ELISA, and an enzyme-linked immunoelectrotransfer blot (EITB) assay in Peru. *Am J Trop Med Hyg* 1992 46(5): .610.

Dos Reis M; Davis R; Skelly P; Shoemaker C. Characterization of the *Schistosoma mansoni* gene encoding the glycolytic enzyme, triosephosphate isomerase. *Molecular and Biochemical Parasitology* 1993. 59: 235.

Eckert R; Randall D; Augustine G. Fisiología Animal, mecanismos y adaptaciones. Interamericana. McGraw-Hill. 3er. Ed. 1992.

El Ridi R; Farouk F; Sherif M; Al-Sherbiny M; Osman A; El Gengehi N; Shoemaker C. T and B cell reactivity to a 42-kDa protein is associated with human resistance to both schistosomiasis *mansoni* and *haematobium*. *J Infect Dis* 1998. 177: 1364.

Ercolani L ; Florence L ; Denaro M ; Alexander M. Isolation and complete sequence of a functional human glyceraldehyde 3-phospho dehydrogenase gene. *J Biol Chem* 1988. 263: 15335.

Evans CA; Gonzalez AE; Gilman RH; Verastegui M; Garcia HH; Chavera A; Pilcher JB; Tsang VC. Immunotherapy for porcine cysticercosis: implications for

prevention of human disease. Cysticercosis Working Group in Peru. *Am J Trop Med Hyg* 1997. 56 (1): 33.

Faust EC; Russell PF; Jung RC. *Parasitología clínica*. De. Salvat. México 1981. 530.

Feldman M; Plancarte A; Sandoval M; Wilson M; Flisser A. Comparison of two assays (EIA and EITB) and two samples (saliva and serum) for the diagnosis of neurocysticercosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1990.

Ferru I; Georges B; Bossus M; Estaquier J; Delacré M; Harn D; Tartar A; Capron A; Grassmasse H; Auriault C. Analysis of the immune response elicited by a Multiple Antigen Peptide (MAP) composed of two distinct protective antigens derived from the parasite *Schistosoma mansoni*. *Parasite Immunology* 1997. 19: 1.

Flisser A. Cysticercosis. *Parasitology* 1990. 12(3) : 50.

Flisser A; Lightowlers M. Vaccination against *Taenia solium* cysticercosis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2001. 96(3): 353.

García HH; Herrera G; Gilman RH; Tsang V; Pilcher JB; Díaz J; Candy EJ; Miranda E; Naranjo J. Discrepancies between cerebral computed tomography and western blot in the diagnosis of neurocysticercosis. *Am J Trop Med Hyg* 1994. 50(2): 152.

Garnier J; Osguthorpe D; Robson D. Analysis of the accuracy and implications of simple methods for predicting the secondary structure of globular proteins. *J Mol Biol* 1978. 120: 97.

Greene R; Wilkins P; Tsang V. Diagnostic glycoproteins of *Taenia solium* cyst share homologous 14 and 18 kDa subunits. *Mol Biochem Parasitol* 1999. 99: 257.

Greene R; Hancock K; Wilkins P; Tsang V. *Taenia solium*: molecular cloning and serologic evaluation of 14 and 18 kDa related, diagnostic antigens. *J Parasitol* 2000. 86(5): 1001.

Gómez-Poyou A; Saavedra-Lira E; Becker Y; Zubillaga RA; Rojo-Domínguez A; Pérez-Monfort R. Using evolutionary changes to achieve species-specific inhibition of enzyme action - studies with triosephosphate isomerase. *Chemistry & Biology* 1995. 2: 847.

Gonzalez A; García H; Gilman R; Gavidia C; Tsang V; Bernal T; Falcon N; Romero M; López-Urbina M. Effective, single-dose treatment of porcine cysticercosis with oxfendazole. *Am J Trop Med Hyg* 1996. 54(4): 391.

Gottstein B; Tsang V; Shantz PM. Demonstration of species-specific and cross-reactive components of *Taenia solium* metacestode antigens. *Am J Trop Med Hyg* 1986. 35(2): 308.

Goudot-Crozel V; Cailloil D; Djabali M; Dessein A. The major parasite surface antigen associated with human resistance to schistosomiasis is a 37-kD glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *J Exp Med* 1989. 170: 2065.

Grogl M; Estrada J; MacDonald G; Kuhn R. Antigen-antibody analyses in Neurocysticercosis. *J Parasit* 1985. 7(4): 433.

Hannaert V; Blaauw M; Kohl L; Allert S; Opperdoes F; Michels P. Molecular analysis of the cytosolic and glycosomal glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase in *Leishmania mexicana*. *Mol Biochem Parasitol* 1992. 55: 115.

Harn DA; Gu W; Oligino LD; Mitsuyama M; Gebremichael A; Richter D. A protective monoclonal antibody specifically recognizes and alters the catalytic activity of *Schistosoma* Triose-phosphate isomerase. *J Immunol* 1992. 148 (2): 562

Hernandez M; Beltran C; Garcia E; Fragoso G; Gevorkian G; Fleury A; Parkhouse M; Harrison L; Sotelo J; Sciutto E. Cysticercosis: towards the design of a diagnostic kit based on synthetic peptides. *Immunol Lett* 2000. 71 (1): 13.

Herrera L; Ramírez T; Rodríguez U; Corona T; Sotelo J; Lorenzo M; Ramos F; Verdofer I; Gebhart E; Ostrosky-Wegman P. Possible association between *Taenia solium* and cancer: increased frequency of DNA damage in peripheral lymphocytes from neurocysticercosis patients. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2000. 94(1): 61.

Hol WGJ; Wierenga RK. Crystallographic investigations of glycolytic enzymes from *Trypanosoma brucei*: Potential starting points for the design of new sleeping sickness drugs, in The design of drugs to macromolecular targets (Beddell CR., de) 1992: 211.

Hollán S; Fujii H; Hirono A; Hirono K; Karro H; Miwa S; Harsanyi V; Gyodi E; Inzelt-Kovacs M. Hereditary triosephosphate isomerase (TPI) deficiency: two severely affected brothers one with and one without neurological symptoms. *Hum Genet* 1993. 92: 268.

Huynh T; Young R; Davis R. Constructing and screening cDNA libraries in Lambda gt10 and lambda gt11. In DNA cloning. Glover D. (ed). Irl Press, Oxford Vol. 1: 49 1985.

Huerta M; de Aluja AS; Fragoso G; Toledo A; Villalobos N; Hernandez M; Gevorkian G; Acero G; Diaz A; Alvarez I; Avila R; Beltran C; Garcia G; Martinez JJ. Synthetic peptide Vaccine against *Taenia solium* pig cysticercosis: successful vaccination in a controlled field trial in rural Mexico. *Vaccine* 2001. 20 (1-2): 262.

Ito A; Plancarte A; Ma L; Kong Y; Flisser A; Cho SY; Liu YH; Kamhawi S. Novel antigens for neurocysticercosis: simple methods for preparation and evaluation for serodiagnosis. *Am J Trop Med Hyg* 1998. 59 (2): 291.

Kampstrup S., San Martin R., Doberti A., Grande H., Dalsgaard K. Preparation and characterization of quillaja saponin with less heterogeneity than Quil-A. *Vaccine* 2000. 18: 2244.

Kohl L; Callens M; Wierenga RK; Opperdoes FR; Michels PAM. Triose-phosphate isomerase of *Leishmania mexicana mexicana*. Cloning and characterization of the gene, overexpression in *Escherichia coli* and analysis of the protein. *Eur. J. Biochem* 1994. 220: 331.

Kong Y; Kang SY; Cho SY; Min DY. Cross-reacting and specific antigenic components in cystic fluid from metacystodes of *Echinococcus granulosus* and *Taenia solium*. Korean J Parasit 1989. 27: 131.

Kong Y; Cho SY; Kim SI; Kang SY. immunoelectrophoretic analysis of major component proteins in cystic fluid of *Taenia solium* metacystodes. Korean J Parasit 1992. 30(3): 209.

Ku-chuan H. A fast and simple procedure for sequencing double stranded DNA with Sequenase. Nucleic Acids Research 1991. 19: 10.

Laclette J; Ornelas Y; Merchant M; Willms K. Ultrastructure of the surrounding envelopes of *Taenia solium* eggs. En cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives. Flisser A; Willms K; Laclette JP; Larralde C; Ridaura C; Beltrán F. (eds). Academic Press, NY. 375.

Landa A; Rojo-Domínguez A; Jiménez L; Fernández-Velasco A. Sequencing, expresión and properties of triosephosphate isomerase from *Entamoeba histolytica*. Eur. J: Biochem. 1997. 247 : 348.

Larralde C; Laclette JP; Owen CS; Madrazo Y; Sandoval M; Bojalil R; Sciutto E; Contreras L; Arzate J; Díaz ML; Govensky T; Montoya RM; Goodsaid F. Reliable serology of *Taenia solium* cysticercosis with antigens from cyst vesicular fluid: ELISA and Hemagglutination test. Am J Trop Med Hyg 1986. 35(5): 965.

Larralde C; Montoya RM; Sciutto; Díaz ML; Govezensky T; Coltorti E. Deciphering western blots of tapeworms antigens (*Taenia solium*, *Echinococcus granulosus* and *Taenia crassiceps*) reacting with sera from neurocysticercosis and hydatid disease patients. Am J Trop Med Hyg 1989. 40(3): 282.

Larralde C; Padilla A; Hernández M; Govezensky T; Sciutto E; Gutierrez G; Tapia-Conyer R; Salvatierra B; Sepúlveda J. Seroepidemiología de la cisticercosis en México. Salud Pública de México 1992. 34(2): 197.

Larralde C director de tesis; **Padilla A.** Cisticercosis humana: Epidemiología y análisis de antígenos por western blot 1994. Tesis de Maestría en Ciencias (Biología Celular). Facultad de Ciencias UNAM.

Liang YS; Coles G; Doenhoff M; Southgate V. In vitro responses of praziquantel-resistant and -susceptible *Schistosoma mansoni* to praziquantel. Int J Parasitol 2001. 31: 1227

Lee JH; Kong Y; Ryu JY; Cho SY. Applicability of ABC-ELISA and Protein A-ELISA in serological diagnosis of cysticercosis. The Korean Journal Parasitology March 1993. 31(1): 49.

Lightowers M; Mitchell G; Bowtell D; Anders R; Rickard M. Immunization against *Taenia taeniaformis* in mice: studies on the characterization of antigens from oncospheres. Int J Parasitol 1984. 14: 321.

Lightowers M. Cestode infections in animals: immunological diagnosis and vaccination. *Rev Sci Tech* 1990. 9 (2): 463.

Lightowers M. Eradication of *Taenia solium* cysticercosis: a role for vaccination of pigs. *International Journal for Parasitology* 1999. 29: 811.

Maquat LE; Chilcote R; Ryan PM. Human triose-phosphate isomerase cDNA and protein structure. *J. Biol. Chem.* 1985 260: 3748.

Mainfroid V; Terpstra P; Beauregard M; Frere J, mamde S; Hol W; Martial J; Goraj K. Three hTIM mutants that provide new insights on why TIM is a dimmer. *J Mol Biol* 1996. 257: 441.

Molinari J; Meza R; Suárez B; Palacios S; Tato P. *Taenia solium*: Immunity in hogs to the cysticercosis. *Experimental Parasitology.* 1983. 55: 340.

Nascimento E; Costa JO; Guimaraes MP; Tavares CA. Effective immune protection of pigs against cysticercosis. *Vet Immunol Immunopathol* 1995. 45(1-2): 127.

Osborn P; Heat D. Immunisation of lambs against *Echinococcus granulosus* using antigens obtained by incubation of oncospheres in vitro. *Res Vet Sci* 1982. 33 : 132.

Panaccio M ; Wilson L ; Cramer S ; Wijffels G ; Spithill T. Molecular characterisation of cDNA sequences encoding Glutathione S-Transferase of *Fasciola hepatica*. *Experimental Parasitology* 1992. 74: 232.

Plancarte A; Fexas M; Flisser A. Reactivity in ELISA and dot blot of purified GP24, an immunodominant antigen of *Taenia solium*, for the diagnosis of human neurocysticercosis. *Int J Parasitol* 1994. 24: 733.

Plancarte A ; Flisser A ; Gauci C, Lightowers M. Vaccination against *Taenia solium* cysticercosis in pigs using native and recombinant oncosphere antigens. *Int J Parasitol* 1999. 29: 643.

Rajasekariah G; Rickard M; Mitchel G. Immunization of mice against infection with *Taenia taeniaeformis* using various antigen prepared from eggs, oncospheres, developing larvae strobilocerci. *Int J Parasitol* 1980. 10: 315.

Reynolds SR; Dahl CE; Harn DA. T and B determination and analysis of multiple antigenic peptides for the *Schistosoma mansoni* experimental vaccine Triose.phosphate isomerase. *J Immunol* 1994. 152: 193.

Rickard M; Adolf A. Vaccination of lambs against infection with *Taenia ovis* using antigens collected during short-term in vitro incubation of activated *T. ovis* oncosphere. *Parasitology* 1977. 75: 183.

Rickard M; Brumley J. Immunization of calves against *Taenia saginata* infection using antigens collected by in vitro incubation of *Taenia saginata* oncospheres or ultrasonic disintegration of *Taenia saginata* and *Taenia hydatigena* oncospheres. *Research Veterinary Science* 1981. 30: 99.

Ritter K; Brestrich H; Nellen B; Kratzin H; Eiffert H; Thomssen R. Autoantibodies against triosephosphate isomerase – A possible clue to pathogenesis of hemolytic anemia in infectious mononucleosis. *J Exp Med* 1990. 171: 565.

Roman G, Sotelo J; del Brutto O; Flisser A; Dumas M; Wadia N; Botero D; Cruz M; Garcia H; de Bittencourt PR; Trelles L; Arriagada C; Lorenzana P; Nash TE; Spina-Franca A. A proposal to declare neurocysticercosis an international reportable disease. *Bull World Health Organ* 2000. 78:399

Rosas N; Sotelo J; Nieto D. ELISA in the diagnosis of neurocysticercosis. *Archives of Neurology* 1986. 43: 353.

Sambrook J; Fritsch E; Maniatis T. Molecular cloning: a Laboratory Manual 1989. Cold Spring Harbor press USA.

Sheline C; Choi D. Neuronal death in cultured murine cortical cells is induced by inhibition of GAPDH and triosephosphate isomerase. *Neurobiology of Disease* 1998. 5: 47.

Sarti E; Schantz PM; Plancarte A; Wilson M; Gutierrez O ; López S ; Roberts J ; Flisser A. Prevalence and risk factors for *Taenia solium* taeniasis and cysticercosis in humans and pigs in a village in Morelos, Mexico. *Am J Trop Med Hyg* 1992. 46: 685.

Sarti E; Schantz PM ; Avila G ; Ambrosio J ; Medina-Santillan R ; Flisser A. Mass treatment against human taeniasis for the control of cysticercosis: a population-based intervention study. *Transw R Soc Trop Med Hyg* 2000. 94 (1): 85.

Sarti E; Flisser A; Schantz PM; Gleizer M; Loya M; Plancarte A; Avila G; Allan J; Craig F; Bronfman M; Wijeyaratne P. Development and evaluation of a Health education intervention against *Taenia solium* in a rural community in Mexico. *Am J Trop Med Hyg* 1997. 56 (2): 127.

Sciuotto E; Fragoso G; Trueba L; Lemus D; Montoya R, Díaz M; Govezensky T, Lomelí C; Tapia G; Larralde C. 1990. Cysticercosis vaccine: cross protecting immunity with *Taenia solium* antigens against experimental murine *Taenia crassiceps* cysticercosis. *Parasite Immunology*. 12: 687.

Sciuotto E; Martínez JJ; Villalobos NM; Hernandez M; Jose MV; Beltrán C; Rodarte F; Flores I; Bobadilla JR; Fragoso G; Parkhouse ME; Harrison LJ; de Aluja AS. Limitations of current diagnostic procedures for the diagnosis of *Taenia solium* cysticercosis in rural pigs. *Vet Parasitol* 1998. 79 (4): 299

Sciuotto E; Fragoso G, Fleury A; Lacleste J; Sotelo J; Aluja A; Vargas L; Larralde C. *Taenia solium* disease in humans and pigs: an ancient parasitosis disease rooted in developing countries and emerging as a major health problem of global dimensions. *Microbes and Infection* 2000. 2: 1875.

Schantz P; Cruz M; Sarti M; Pawlowski Z. Potential eradication of teniosis and cysticercosis. *Bulletin Panamerican Health Organization* 1993. 27: 397.

Schenone H; Villarroel F; Rojas A; Ramírez R. In: Cysticercosis: Presents State of Knowledge and Perspectives. De Filisser A; Willms K; Laclette JP; Larralde C; Ridaura SC; Beltrán F. Academic Press NY. 1982.

Shoemaker C; Gross A; Gebremichael A; Harn D. CDNA cloning and functional expression of the *Schistosoma mansoni* protective antigen Triose-phosphate isomerase. Proc Natl Acad Sci 1992. 89 p1842.

Sexton J; Milner A; Panaccio M; Waddington J; Wijffels G; Chandler D; Thompson C; Wilson L; Spithill T; Mitchel G; Campbell N. Glutathione S-Transferase. Novel vaccine against *Fasciola hepatica* infection in sheep. Journal of Immunology 1990. 145: 3905.

Sirover M. New insights into an old protein: the functional diversity of mammalian glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. Biochim Biophys Acta 1999. 1432: 159.

Sotelo J; Guerrero V; Rubio F. Neurocysticercosis: A new classification based on active and inactive forms. Arch Intern Med 1985. 145: 442.

Sun W; Liu S; Brindley P; McManus D. Bacterial expression and characterization of functional recombinant triosephosphate isomerase from *Schistosoma japonicum*. Protein Expression and Purification 1999. 17: 410.

Suresh S; Bressi J; Kennedy K; Verlinde C; Gelb M; Hol W. Conformational changes in *Leishmania mexicana* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase induced by designed inhibitors. J Mol Biol 2001. 309: 423.

Terrazas I; Cruz M; Rodríguez-Sosa M; Bojalil R; García-Tamayo F; Larralde C. Th1 cytokines improve resistance to murine cysticercosis caused by *Taenia crassiceps*. Parasitology Research 1999. 85: 135.

Toejenses S; Spolski R; Mooney K; Kuhn R. The systemic immune response of Balb/c mice infected with larval *Taenia crassiceps* is a mixed Th1/Th2 -type response. Parasitology 1999. 118: 623.

Toledo A; Larralde C; Fragoso G; Gevorkian G; Monoutcharian K; Hernández M; Acero G; Rosas G; López-Casillas F; Garfias C; Vazquez R; Terrazas I; Sciutto E. Towards a *Taenia solium* cysticercosis vaccine: an epitope shared by *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* protects mice against experimental cysticercosis. Infection and Immunity 1999. 67(5): 2522.

Tsang V; Brand JA; Boyer AE. An enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay and glycoprotein antigens for diagnosis human cysticercosis (*T. solium*). J Infect Dis Jan 1989. 159(1) p50.

Tso J; Sun X; Kao T; Reece K; Wu R. Isolation and characterization of rat and human glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase cDNAs: genomic complexity and molecular evolution of the gene. Nucleic Acid Res 1985. 13: 2485.

Vazquez-Talavera J; Solis CF; Terrazas LI; Lacleite JP. Characterization and protective potential of the immune response to *Taenia solium* paramyosin in a murine model of cysticercosis. *Infect Immun* 2001. 69 (9): 5412.

Velanker S; Ray S; Gokhale R; Balaram H; Balaram P; Murthy M. Triosephosphate isomerase from *Plasmodium falciparum*: the crystal structure provides insights into antimalarial drug design. *Structure* 1997. 5: 751.

Verlinde C; Merrit E; Van Der Akker F; Kim H; Feil I; Delboni L; Mande S; Sarfaty S, Petra P; Hol W. Protein crystallography and infectious diseases. *Protein Sci* 1994. 3: 1670.

Vibanco-Pérez; Jiménez L; Merchant M; Landa A. Characterisation of Glutathione S-Transferase of *Taenia solium*. *J Parasitol* 1999. 83(3): 448.

Vibanco-Pérez; Jiménez L; Mendoza-Hernández G; Landa A. Characterisation of a recombinant Mu-class Glutathione S-Transferase from *Taenia solium*. *Parasitol Res* 2002. In press.

Vogel F. Improving vaccine performance with adjuvants. *Cin Infect Dis* 2000. 30 (suppl 3) : 5266.

Waine G; Becher M; Yang W; Kallina B; McManus D. Cloning, molecular characterization and functional activity of *Schistosoma japonicum* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, a putative vaccine candidate against schistosomiasis japonica. *Infect Immun* 1993. 61(11): 4716.

Villa O; Kuhn R. Mice infected with the larvae of *Taenia crassiceps* exhibit a Th2 -like immune response with concomitant anergy and downregulation of Th1 - associated phenomena. *Parasitology* 1996. 11: 561

Villagrán-Urbe J; Olvera-Rabiela JE. La cisticercosis en el material de autopsia del Hospital General de México. En: Cisticercosis humana y porcina. Su conocimiento e investigación. Flisser A y Malagón F. (eds). Limusa. México 1989 p97.

Vogelstein B; Gillespie D. Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1979. 76: 615.

White AC; Tato P; Molinari JL. Host-parasite interactions in *Taenia solium* cysticercosis. *Infect Agents Dis* 1992. 1 p185.

White AC, Garcia HH. Recent developments in the epidemiology, diagnosis, treatment, and prevention of neurocysticercosis. *Curr Infect Dis Rep* 1999. 1(5): 434.

Widdowson M; Cook A; Williams J; Argaes F; Rodríguez I; Domínguez J; Rodríguez R. Investigation of risk factors for porcine *Taenia solium* cysticercosis: a multiple regression analysis of a cross-sectional study in the Yucatan Peninsula, Mexico. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 2000. 94: 620.

Wierenga R, Hol W. Common elements on the surface of glycolytic enzymes from *Trypanosoma Brucei* may serve as topogenic signals for import into glycosomes. *EMBO J* 1987; 6: 215-221.

Wierenga R; Noble M, Vriend G; Nauche S; Hol W. Refined 1.83 Å structure of trypanosomal triosephosphate isomerase, crystallized in the presence of 2.4M ammonium sulphate. *J Mol Biol* 1991. 220: 995.

Wierenga R; Noble M. Comparison of the refined crystal structures of liganded and unliganded chicken, yeast and trypanosomal triosephosphate isomerase. *J. Mol. Biol* 1992. 224: 1115.

Wilson M; Bryan RT; Fried JA; Ware DA; Schantz PM; Pilcher JB; Tsang V. Clinical evaluation of the cysticercosis enzyme-linked immunoelectrotransfer blot in patients with neurocysticercosis. *J Infect Dis* 1991. 164: 1007.

Xu ZB; Liu D. Significance of western blot in diagnosis of cysticercosis cellulosae. *Cin Med J Dec* 1992. 105(12): 1004.

Yang W; Jackson C; Zeng Q; McManus D. Multi-epitope vaccine candidates tested for protective immunogenicity in mice. *Vaccine* 2001. 19: 103