

03081
8



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
Unidad Académica de los Ciclos Profesionales y de Posgrado del CCH

**ESTRUCTURA DEL GEN DE LA PARAMIOSINA
DE *Taenia solium***

TESIS

Que para obtener el grado de
DOCTORA EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA

Presenta la

M. en IBB. LAURA DEL CARMEN VARGAS PARADA

Director de Tesis

DR. JUAN PEDRO LACLETTE

México, D.F.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2002



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

... a la Dirección General de Bibliotecas ...
... a difundir en formato electrónico e impres...
... de mi trabajo recepciona...

NOMBRE: LAURA VARGAS
DARADA

FECHA: 07 NOVIEMBRE 2002

FIRMA: [Firma]

“ La ciencia no debe ser un placer egoísta.

**Los que tienen la suerte de dedicarse a las tareas científicas
deben ser los primeros en poner sus conocimientos
al servicio de la humanidad”**

Carlos Marx

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

A mi Patria, porque me ha dado todas las oportunidades

A la UNAM, mi *alma mater*

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

A mis Padres

A Efra

A Ofelia Arceo, *in memoriam*

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Para la realización de esta tesis se contó con apoyo de la Dirección General de Apoyo al Personal Académico y del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Además se recibió apoyo financiero para la realización del trabajo experimental por parte del Programa de Apoyo a las Divisiones de Estudios de Posgrado (PADEP 030359), otorgado por la Coordinación General de Estudios de Postgrado, UNAM.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer al Dr. Juan Pedro Laclette, por permitirme formar parte de su grupo de investigación; a la Dra. Carmen Gómez y los Drs. Juan Pedro Laclette y Abraham Landa (mi comité tutorial) por sus consejos y enseñanzas; a los Drs. Rafael Bojalil, Roberto Hernández, Juan Pedro Laclette, Edmundo Lamoyi, Edda Sciutto, Patricia Tato, y muy especialmente, a la Dra. Ana Flisser por sus comentarios y sugerencias que ayudaron a mejorar la presentación de este trabajo. A los miembros de la UACPyP, del nuevo posgrado, y de la Unidad de Enseñanza, Biol. Francisco Javier Incera, Dr. Jesús Reynaga, Mtro. Néstor Arvizu, Dr. Lino Díaz de León q.e.d., Lic. Jorge de la Mora, Verónica Martínez, Blanca Huerta, Azucena Ayala y Lucía Tapia, por su amabilidad y eficiencia.

A mis maestros, mentores y amigos, Guillermo Alfaro, Jesús Manuel León Cázares, Javier Espinosa, Carmen Gómez, Ma. Eugenia Gonsebatt, Ricardo Rosales, Julieta Rubio

A mis amigos de siempre, Bojalil, Camacho, Caviedes, Chucho, Clemen, Josune, Lucia, Luis, Sonya

A mis compañeros de laboratorio, Abril, Aidé, Ana Rosa, Carlos, Celia, Dayana, Fela, Julio, Mayra, Martín, Maru, Paty, Pavel, Pedro, Pepe, Rimma.

A mis alumnos, que me han hecho descubrir lo gratificante que es la docencia

A todas las personas del Instituto de Investigaciones Biomédicas, que de alguna forma han contribuido en mi trabajo durante todos estos años, brindándome no solo su ayuda sino también su amistad, especialmente, Don Apolinar Olvera, Poncho Martínez, Alfredo López, Amada Villalpando, Don Eleazar Bernardino, Enrique Vázquez, Don Erasto Brito, Evita Reyes, Paco Puente, Irma Márquez, Isabel Reyes, Jorge Hernández, Don Pepe Puente, Don Pepe Avilés, Juanita González, Laura Velásquez, Lucy Brito, Ma. Petra Muñoz, Margarita Salazar, Martha Cariño, Don Mike Páez, Mirna Rios, Moisés Paniagua, Prima Salazar, Doña Soco Salazar, Violeta Aguilar

A las Dras. Ada Nelly Martínez Villalobos y Ana Flisser por regalarme los cisticercos de *T. solium* que se usaron en este trabajo, y a Alejandra Vázquez Lobo, Sergio Solórzano, Jorge Membrillo y Jesús Ramírez por su ayuda con el primer extensión y el 5'RACE

A mi familia, mi tia Ligia y mi tio Homero, porque son como mis segundos padres. A la Sra. Yolanda y Don Efrain. A Edgar y Regina

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	6
LISTA DE ABREVIATURAS	1
PRÓLOGO	2
RESUMEN	3
ABSTRACT	4
INTRODUCCIÓN	5
EPIDEMIOLOGÍA.....	6
MORFOLOGÍA DEL PARÁSITO.....	7
CICLO DE VIDA.....	10
EL ANTÍGENO B ES LA PARAMIOSINA DE TAENIA SOLIUM.....	12
LAS PARAMIOSINAS.....	12
PARAMIOSINA EN CAENORHABDITIS Y DROSOPHILA.....	15
LA PARAMIOSINA DE SCHISTOSOMA.....	17
LA PARAMIOSINA DE T. SOLIUM Y OTROS CÉSTODOS.....	18
ANTECEDENTES	19
ESTRUCTURA DEL GEN EUKARIOTE.....	19
<i>La unidad de transcripción</i>	19
<i>El promotor</i>	20
ESTRUCTURA DE GENES EN CÉSTODOS.....	21
ESTRUCTURA DE GENES EN TAENIA.....	22
<i>El gen de la paramiosina de T. solium</i>	23
HIPÓTESIS	25
OBJETIVOS	25
MATERIAL Y MÉTODOS	26
A. MATERIALES BIOLÓGICOS.....	26

<i>Parásitos</i>	26
<i>Células bacterianas</i>	26
<i>Caracterización del fenotipo Rec⁻</i>	26
<i>Biblioteca genómica</i>	27
<i>cDNA</i>	27
B. ENZIMAS Y OTROS REACTIVOS	27
C. MÉTODOS MOLECULARES	28
<i>Extracción y purificación del DNA de T. solium a partir de cisticercos</i>	28
<i>Purificación del DNA plásmidico</i>	29
<i>Extracción y purificación del RNA total de T. solium</i>	29
<i>Cuantificación del RNA y DNA. Determinación espectrofotométrica de su pureza</i>	30
<i>Electroforesis en agarosa</i>	30
<i>Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)</i>	30
<i>Oligonucleótidos</i>	31
<i>Digestión del DNA con endonucleasas de restricción</i>	31
<i>Análisis por Southern blot</i>	34
<i>Transferencia</i>	34
HIBRIDACIÓN	35
<i>Preparación de la sonda</i>	35
<i>Marcaje radioactivo de las sondas</i>	36
<i>Búsqueda de clones con el gen completo de la paramiosina en la biblioteca genómica de T. solium</i>	36
<i>Titulación de la biblioteca genómica</i>	36
<i>Tamizaje de las bibliotecas de DNA genómico (gDNA) en λ Syrix</i>	37
<i>Purificación del DNA de Fago Lambda</i>	37
<i>Amplificación rápida de extremos 5' de cDNA (5' RACE)</i>	37
<i>Análisis por Extensión del Oligonucleótido (Primer Extension)</i>	39
<i>Secuenciación de DNA</i>	40
<i>Análisis de las secuencias</i>	40
RESULTADOS	41
LOCALIZACIÓN DE LOS INTRONES EN EL GEN DE PARAMIOSINA	41

TAMIZAJE DE LA BIBLIOTECA GENÓMICA	44
ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA DEL GEN DE LA PARAMIOSINAS	45
IDENTIFICACIÓN DEL SITIO DE INICIO DE LA TRANSCRIPCIÓN	50
IDENTIFICACIÓN DE ELEMENTOS DEL PROMOTOR.....	57
COMPARACIÓN DE LA PARAMIOSINA DE T. SOLIUM CON OTRAS PARAMIOSINAS	58
COMPARACIÓN ENTRE GENES DE PARAMIOSINA.....	60
DISCUSIÓN	64
REFERENCIAS.....	69
APÉNDICE 1.....	84
APÉNDICE 2.....	85
ANTECEDENTES.....	86
<i>Respuesta a estrés</i>	86
APÉNDICE 3.....	89
ANTECEDENTES.....	90
<i>El Tegumento</i>	90
<i>Los corpúsculos calcáreos, la regulación del calcio y la calcificación de los cisticercos</i>	91
APÉNDICE 4.....	94
APÉNDICE 5.....	95

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

LISTA DE ABREVIATURAS

aa	aminoácidos
AgB	Antígeno B
Ac	anticuerpo(s)
Anti-AgB	Anticuerpos anti-Antígeno B
BSA	Albúmina sérica bovina
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
gDNA	Ácido desoxirribonucleico genómico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DMSO	Dimetil sulfóxido
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
ELISA	Análisis inmunoenzimático cuantitativo
h	Horas
IET	Inmunoelectrotransferencia
Ig	Inmunoglobulina
kb	kilobases
kDa	kilodaltones
L	Litro
LB	Medio Luria-Bertani
NC	Membrana de nitrocelulosa
nt	Nucleótidos
PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida
pb	Pares de bases
PBS	Solución salina amortiguada de fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pfl	Placas formadoras de lisis
PM	Peso(s) molecular(es)
PMSF	Fenilmetil-sulfonil fluoruro
Pmy	Paramiosina
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	Ácido ribonucleico mensajero
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SNC	Sistema Nervioso Central
SSC	Solución Salina con Citratos
TA	Temperatura ambiente
TAE	Amortiguador de Tris-Acetatos
TBE	Amortiguador de Tris-Boratos
TPmy	Paramiosina de <i>T. solium</i>
TLCK	alfa-p-tosil-L-lisín clorometil cetona
UV	Luz ultravioleta
X-gal	5-Bromo-4-Cloro-3-idolil-β-D-galactósido

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

PRÓLOGO

Esta tesis es el producto del trabajo realizado durante mi estancia en el Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, bajo la dirección del Dr. Juan Pedro Laclette. Durante los poco más de seis años en el laboratorio, tuve la oportunidad de desarrollarme en diversos aspectos de mi vida académica. Fue en este laboratorio que terminé de escribir mi tesis de maestría, y donde decidí quedarme para iniciar un proyecto completamente nuevo y diferente como proyecto doctoral. El trabajo que se presenta en esta tesis comprende los resultados obtenidos en la caracterización de la estructura del gen de la paramiosina de *Taenia solium*. Este es el primer análisis detallado de la estructura de un gen en este parásito, con el cual se identificaron secuencias consenso de escisión de intrones, secuencias reguladoras y de poliadenilación potenciales, además del sitio de inicio de la transcripción (apéndice 1. Vargas-Parada y Laclette (2002) Gene Structure of *Taenia solium* Paramyosin. Parasitol Res, en prensa).

Mientras se desarrollaba este proyecto doctoral, también se estudiaron otros dos problemas vinculados con la relación entre el parásito y su hospedero: la respuesta al estrés por temperatura (apéndice 2. Vargas-Parada et al. (2001) Heat shock and stress response of *Taenia solium* and *T. crassiceps* (Cestoda). Parasitol 122:583-588) y la formación de corpúsculos calcáreos (apéndice 3. Vargas-Parada et al. (1999) Formation of calcareous corpuscles in the lumen of excretory canals of *Taenia solium* cysticerci. Parasitol Res 85:88-92; apéndice 4. Vargas-Parada y Laclette (1999) Role of the Calcareous Corpuscles in Cestode Physiology: A Review. Rev Lat Microbiol 41:303-307). En el primer caso se caracterizó la respuesta al estrés, se identificaron las proteínas inducidas durante este fenómeno y se encontró que la forma larvaria (cisticerco) excreta/secretora dos proteínas cuya función hasta ahora es desconocida. En el segundo caso, se encontró que los corpúsculos calcáreos, a diferencia de otros helmintos, se forman en el espacio extracelular de los canales protonefridiales y se proponen posibles mecanismos que expliquen su papel en la biología de la *Taenia solium*. Se elaboraron además dos artículos sobre la infección por *Taenia solium*, uno de revisión (Apéndice 5. Sciutto et al. (2000). *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 Infect 2:1875-1890) y uno de difusión (Apéndice 6. Vargas-Parada y Laclette (2001) El cerdo no tiene la culpa. ¿Cómo ves? 3(33):10-14). En conjunto, todos estos trabajos forman parte de un esfuerzo por comprender mejor la biología y fisiología de este parásito.

RESUMEN

La paramiosina es una proteína muscular que juega un papel en la supervivencia de la forma larvaria de *Taenia solium* durante su prolongada relación con su hospedero. En este trabajo describimos la estructura del gen de la paramiosina de *T. solium* (TPmy).

La caracterización de dos clonas aisladas de una biblioteca genómica mostraron que el gen completo de la paramiosina comprende 8kb divididas en 14 exones y 13 intrones, estos últimos delimitados por secuencias convencionales para la escisión de genes eucariotas. No se encontró evidencia de escisión alterna de RNA mensajeros, excluyendo la posibilidad de que *T. solium* exprese una miniparamiosina como ocurre en *Drosophila melanogaster*. El análisis de la secuencia genómica permitió identificar dos sitios alternos de inicio de la transcripción, así como regiones reguladoras potenciales del promotor del gen. Aunque el gen de la paramiosina no presenta una señal de poliadenilación consenso se identificó una secuencia que podría desempeñar esta función debido a su semejanza con otras señales alternativas reportadas para *Schistosoma*, y por su localización con respecto al sitio de inicio de la poliadenilación identificado en la secuencia de cDNA.

La comparación de la estructura del gen de la TPmy con los genes de paramiosina de *D. melanogaster* y *Caenorhabditis elegans* no mostró una organización de exones/intrones conservada, en contraste con lo que se observa en otros genes musculares. El número de intrones y su distribución en la estructura de los tres genes sugiere una tendencia a la disminución del número de intrones durante la evolución de la paramiosina.

ABSTRACT

Paramyosin is a muscle protein that plays a role in the survival of the larval stage of *Taenia solium* during its prolonged host-parasite relationship. Here we describe the gene structure of the paramyosin of *T. solium* (Tpmy). The characterization of two clones obtained from a genomic library showed that the complete gene of paramyosin spans in 8kb divided in 14 exons and 13 introns delimited by conventional eukaryotic splice signals. No evidence of alternative splicing sites were found, excluding the possibility that *T. solium* expresses a miniparamyosin as in *Drosophila melanogaster*. Analysis of the genomic sequence allowed the identification of two transcription initiation sites, as well as potential regulatory regions in the promoter of the gene. Although the paramyosin gene does not show a conventional polyadenylation signal, a probable sequence was identified which shows similarity to alternative signals reported for *Schistosoma*, and is located at a suitable distance from the site where polyadenylation occurs in the gene.

Comparison between the paramyosin genes of *D. melanogaster* and *Caenorhabditis elegans* showed a lack of conservation of the exon/intron organization, in contrast to other muscle genes. The number of introns and their position in the structure of these three genes, suggest a tendency towards decreasing the number of introns during the evolution of paramyosin.

INTRODUCCIÓN

La teniosis y la cisticercosis, causadas por *Taenia solium*, son un serio problema de salud pública en países de Latinoamérica, Asia y África (Figura 1). La cisticercosis es causa de importantes pérdidas económicas en la industria de alimentos elaborados con carne de cerdo, y en su forma de neurocisticercosis, es la más importante enfermedad neurológica parasitaria y causa común de epilepsia. Ambas enfermedades están estrechamente relacionadas con la pobreza y las malas condiciones sanitarias e higiénicas.

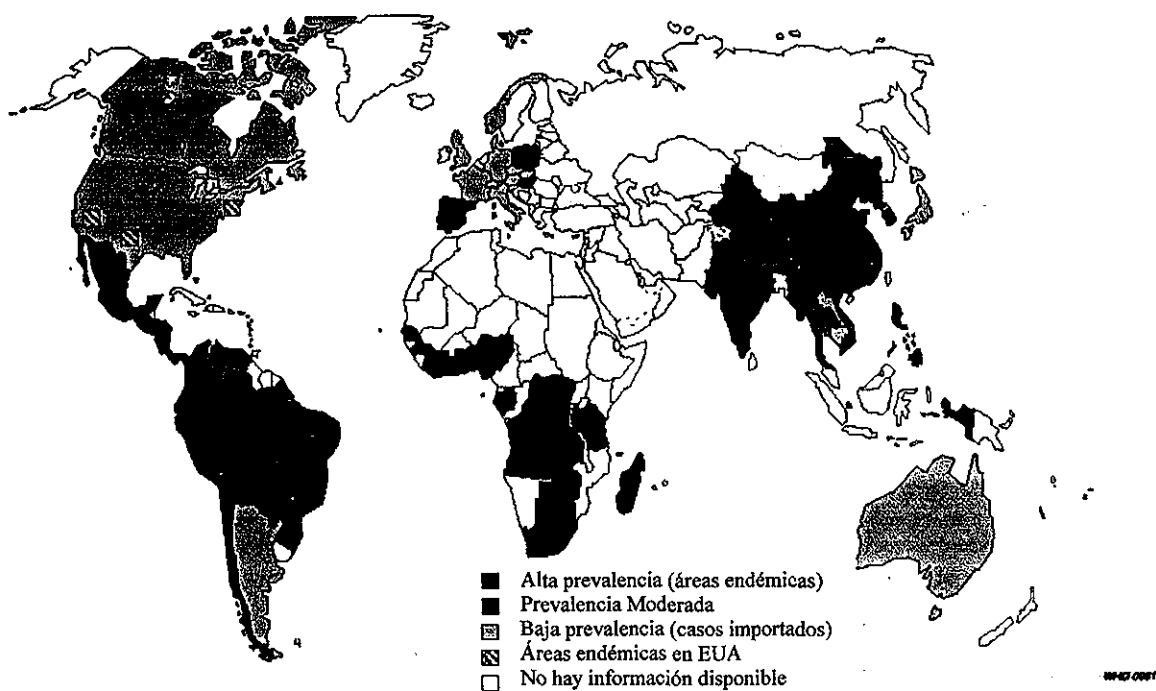


Figura 1. Mapa que muestra las regiones donde la cisticercosis es endémica. En negro se indican los países donde la cisticercosis es endémica, en gris se indican los países donde se han reportado casos. Tomado de Roman et al. 2000.

La teniosis es la enfermedad causada por los gusanos adultos del género *Taenia*. En el hombre, la teniosis se debe a la infección por dos especies distintas, *T. solium* y *T. saginata*. La infección por el gusano adulto o solitaria generalmente no produce ningún síntoma, aunque en ocasiones puede causar insomnio, anorexia, pérdida de peso y algunos trastornos abdominales ligeros. El riesgo que presenta la teniosis se debe a que los individuos enfermos son foco de infección para otros animales al liberar en sus heces miles de huevos, que si son ingeridos ocasionan la infección con la forma larvaria o cisticerco. La importancia de *T. solium* radica en

que mientras los huevos de *T. saginata* no son infectivos para el hombre, los de *T. solium* si lo son. A la infección con el cisticerco de *T. solium* se le conoce como cisticercosis y afecta principalmente al cerdo y al hombre (Flisser et al. 1991; Tsang y Wilson 1995; Sarti 1997).

Epidemiología

En México, las estadísticas oficiales informan que la frecuencia de infección más alta de teniosis, tanto por *T. solium* como por *T. saginata*, se presenta en el grupo de 5 a 14 años (35 %), seguido por el de 1 a 4 años de edad, sin diferencias significativas por sexo (Correa et al. 1994; SSA 1996). En cambio, los estudios epidemiológicos informan que el parásito adulto se presenta en todas las edades y alcanza su pico en el grupo de 16 a 45 años (edad económicamente productiva), siendo las personas del sexo femenino las que más frecuentemente presentan este parásito (Sarti 1986; Flisser 1994; OPS 1994). Las diferencias observadas se deben a que las estadísticas oficiales reflejan solo la demanda de servicios de salud, mientras que en los estudios epidemiológicos se obtienen datos representativos por sexo y de todos los grupos de edad (Sarti 1997).

En el caso de la cisticercosis humana la frecuencia de anticuerpos anticisticerco se ha determinado utilizando diversas pruebas inmunodiagnósticas en diferentes poblaciones, encontrándose prevalencias desde 0.1 a 12 %. Con el uso de técnicas más sensibles y específicas, como el análisis inmunoenzimático cuantitativo (ELISA) y la inmunolectrotransferencia (IET), las frecuencias encontradas en las poblaciones estudiadas, entre 1992 y 1997, se han mantenido alrededor del 10 % (Woodhouse et al. 1982, Díaz et al. 1990; Correa et al. 1994; Schantz et al. 1994; Sarti et al. 1986, 1992, 1994). Las estadísticas oficiales informan un promedio anual de 500 casos de cisticercosis con una tasa nacional cruda de 0.6 por 100,000 habitantes, y sin diferencias por sexo y señalan como el grupo más afectado el de 15 a 44 años de edad (Correa et al. 1994; SSA 1996). A la enfermedad producida por el parásito en el sistema nervioso central se le conoce como neurocisticercosis y es la forma más grave en el humano (Lombardo et al. 1982; Estañol 1986; Del Brutto y Sotelo 1988; Sotelo y Del Brutto 2000; White AC Jr 2000). Anualmente, la neurocisticercosis causa alrededor de 50,000 muertes anuales (Gemmell et al. 1983, Román 2000). En México es la principal causa de consulta neurológica por epilepsia y la causa del 20 al 25 % de las craneotomías (Zenteno 1965; Velasco-Suárez et al. 1982; Del Brutto y Sotelo 1988; Rolfs et al. 1995). Esta enfermedad puede permanecer latente por muchos años, pero con el tiempo, las personas afectadas pueden desarrollar un amplio espectro de manifestaciones clínicas como cefaleas, epilepsia, hidrocefalia o algunos otros desórdenes que pueden llevar a la muerte.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Se estima que la neurocisticercosis es la causa del 1-2 % de todas las muertes en los hospitales generales (Albores-Saavedra y Altamirano-Dimas 1971; Rabiela et al. 1979; Velasco-Suarez et al. 1982). En 1992 los costos por tratamiento para neurocisticercosis se situaron en 82 millones de dólares (Roberts et al 1994), a lo que hay que agregarle, las pérdidas económicas ocasionadas por la incapacidad para trabajar de muchas de las personas infectadas (Flisser 1988; Flisser et al. 1991; Tsang y Wilson 1995).

En el campo de la porcicultura, la cisticercosis en cerdos también causa considerables pérdidas económicas debido al decomiso de carne infectada en los rastros. En 1980, las pérdidas por decomiso alcanzaron los 43 millones de dólares (Acevedo-Hernández, 1982, Acevedo-Hernández 1989), lo que representó el equivalente al 68 % del total de la inversión en la producción de cerdos. Las prevalencias de cisticercosis porcina estimadas a partir de las cifras de cerdos que llegan a los rastros, y que no reflejan el número de animales criados rústicamente y sacrificados de manera clandestina (y de mayor proporción), informan una tasa cruda anual de 0.22×100 cerdos (1991), aunque por inspección de lengua las frecuencias van de 1.4 a 4.0 %, y por IET de 4.1 a 7.0 % (Sarti et al. 1992a, 1992b, 1994).

Morfología del parásito

Los céstodos son organismos acelomados con simetría bilateral. En general, se caracterizan por ser planos, segmentados, hermafroditas y carecer de tubo digestivo. El parásito adulto de *T. solium* tiene apariencia de listón y mide de 1.5 a 5 m de largo. Su cuerpo presenta un órgano fijador denominado escólex (Smyth 1994), que le permite fijarse a la mucosa intestinal del hospedero a través de sus cuatro ventosas y un rostelo con una doble corona de ganchos (Figura 2) (Merchant et al. 1998). La corona interna posee de 11 a 14 ganchos largos (de 0.13 a 0.16 mm), mientras la corona externa está formada por un número similar de ganchos pequeños (de 0.10 a 12 mm) (Verster 1969). En seguida del escólex se encuentra una zona de crecimiento con alta actividad mitótica llamada cuello, que da origen al estróbilo (Figura 3). El estróbilo está formado por una serie de segmentos denominados proglótidos, los cuales se encuentran en distinto grado de diferenciación, dependiendo de la posición que ocupan en el estróbilo. Los más cercanos al cuello son inmaduros sin órganos sexuales desarrollados. Les siguen los proglótidos maduros, que han desarrollado órganos sexuales femeninos y masculinos, lo que caracteriza a estos parásitos como hermafroditas. Los más lejanos al escólex son los proglótidos grávidos, que se encuentran llenos de huevos (Figura 3).

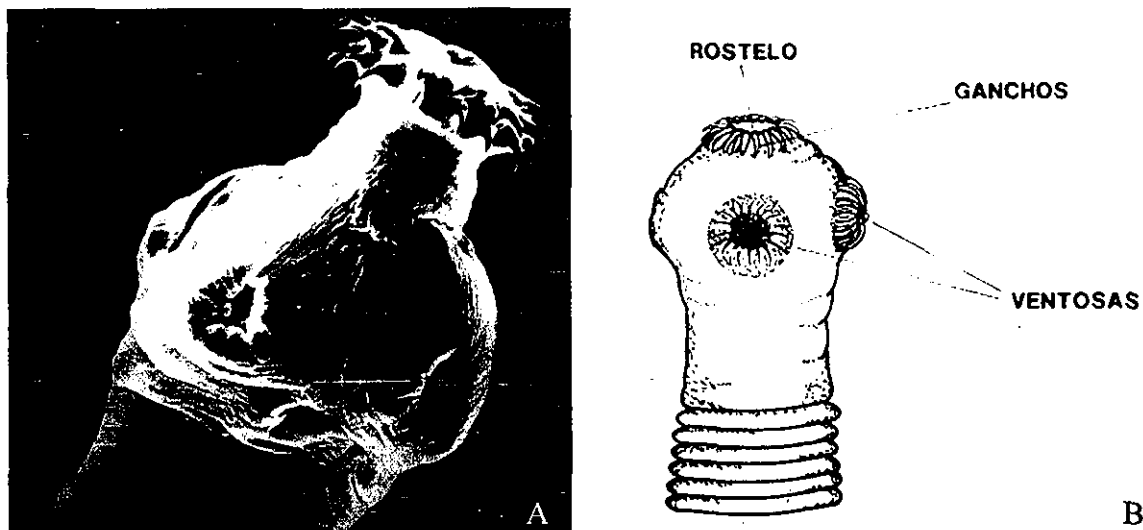


Figura 2A. Micrografía electrónica de barrido que muestra el escólex de *T. solium*. B. Representación esquemática de las principales estructuras del escólex.

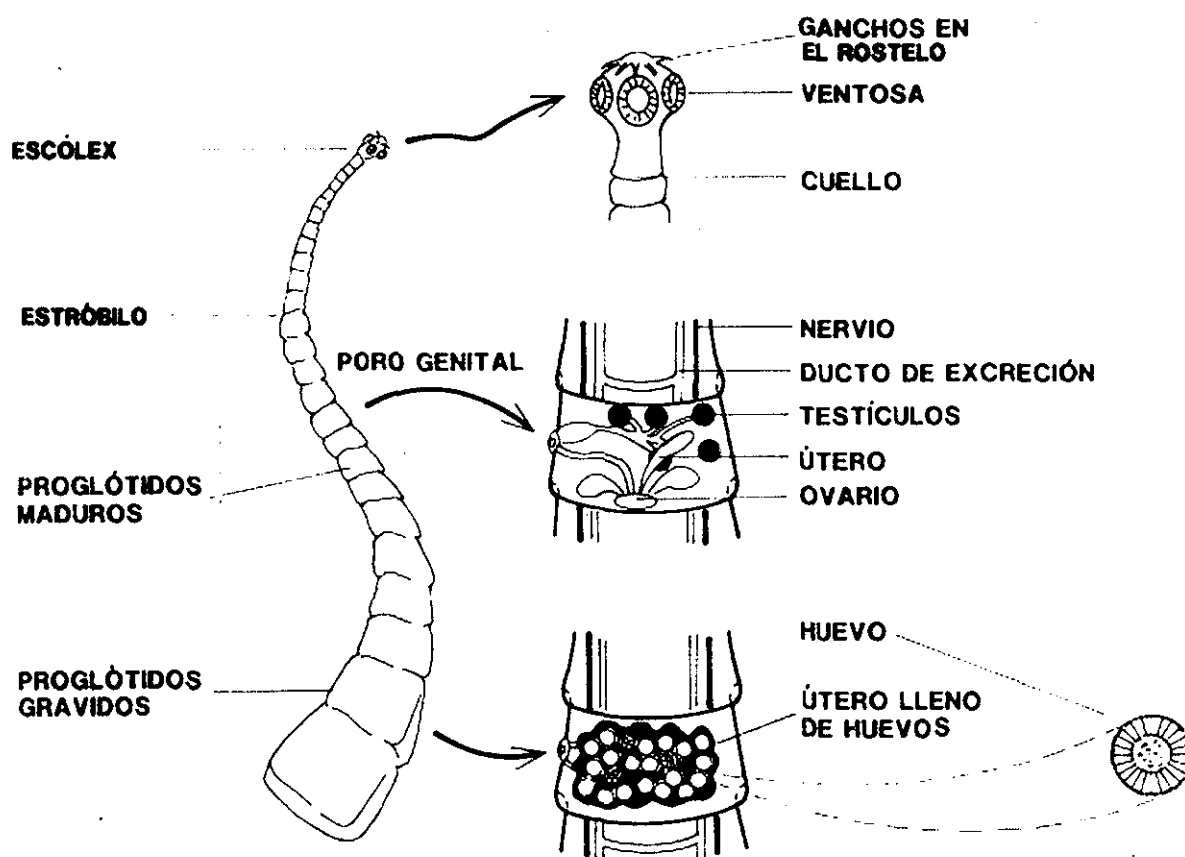


Figura 3. Representación esquemática del parásito adulto de *Taenia solium*. Tomado de Schmidt y Roberts 1989.

Los huevos son esféricos, miden de 31 a 51 μm de diámetro y tienen apariencia radial cuando se observan bajo el microscopio de luz (Figura 4) (Flisser et al. 1997). Contienen la oncosfera o embrión hexacanto, llamado así por presentar 6 ganchos. Varias envolturas rodean al

embrión, cada una con características particulares (Laclette et al. 1982). El vitelo delimitado por su cápsula constituye la envoltura más externa del huevo. Esta capa delgada y lábil se presenta como una envoltura sincicial caracterizada por la presencia de elementos citoplasmáticos tales como mitocondrias y glucógeno. El vitelo no se encuentra presente en los huevos encontrados en la materia fecal, y se sugiere que se encarga de la protección y nutrición de la oncosfera antes de que el embrión esté bien formado. Por debajo de la envoltura vitelar se encuentra la membrana embriofórica externa, la cual se presenta como una membrana flexible y discontinua con apariencia de cráter, muy relacionada con la superficie externa del embrioforo. El embrioforo es la cubierta más importante del huevo, protege al embrión mientras el huevo está en el ambiente exterior y está formado por bloques electrodensos de proteínas parecidas a queratina, unidos por una sustancia cementante. Estos bloques proteicos son resistentes a los jugos digestivos, no así la sustancia cementante, permitiendo la separación de los bloques al pasar por el tubo digestivo del hospedero, liberándose así la oncosfera. La célula embriofórica, la cual se extiende por debajo de

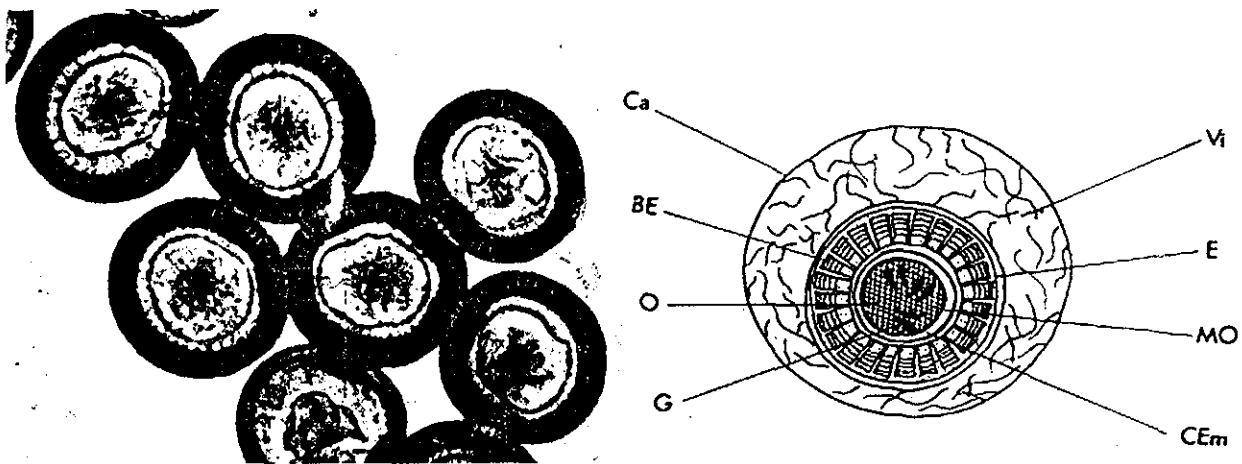


Figura 4. A. Micrografía electrónica de huevos de *T. solium*. Tomada de Laclette 1982. B. Representación esquemática de la morfología del huevo modificada de Slais 1970. BE, bloques embriofóricos; Ca, cápsula; Cem, célula embriofórica; E, embrioforo; G, ganchos; MO, membrana oncosferal; Vi, vitelo.

la superficie interna del embrioforo, es de origen sincicial y tiene una apariencia granular debido a la presencia de abundantes elementos parecidos a los ribosomas. Se considera que la función de esta envoltura es la de sintetizar al embrioforo. La envoltura más interna es la membrana oncosferal, la cual es impermeable a las condiciones ambientales externas, pero se vuelve permeable cuando se pone en contacto con el jugo gástrico, permitiendo la activación del embrión expuesto (Laclette et al. 1982).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

El cisticerco de *T. solium* es una vesícula translúcida redonda u ovoide de 0.5 a 2 cm de diámetro, con un escólex invaginado y opaco, semejante al de la etapa adulta (Figura 5). La vesícula está llena de un fluido transparente llamado fluido vesicular, que contiene proteínas del parásito y del hospedero (Willms et al. 1982; Ambrosio et al. 1994). La superficie de la pared vesicular está formada por el tegumento que es un citoplasma sincicial, anucleado y continuo cuya membrana externa se encuentra aumentada por proyecciones digitiformes llamadas microtricas recubiertas por un abundante glicocálix.

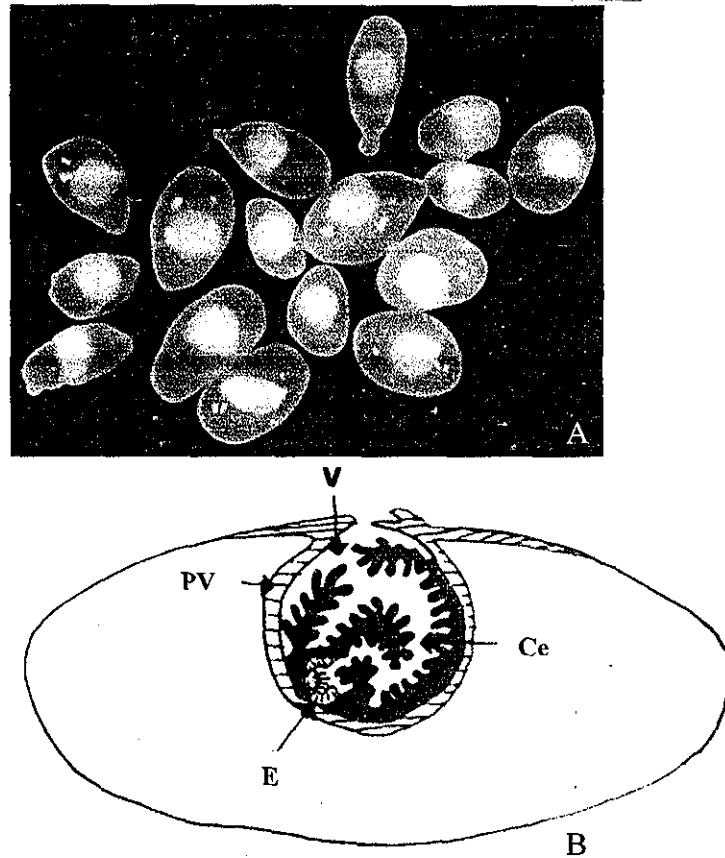


Figura 5. El cisticerco de *T. solium*. A. Cisticercos con pared vesicular intacta disectados de músculo esquelético de cerdo. B. Representación esquemática del cisticerco modificada de Slais 1979. PV, pared vesicular; E, escólex; Ce, canal espiral; V, vestibulo.

Ciclo de Vida

El ciclo de vida de *T. solium* (Figura 6) involucra a los seres humanos como único hospedero definitivo (que aloja a la tenia adulta) y al cerdo como principal hospedero intermediario (que aloja a los cisticercos). Cuando el humano consume carne de cerdo infectada y poco cocida, ingiere uno o varios cisticercos viables. La larva o cisticerco evagina en respuesta a las sales biliares y tripsina, adhiriéndose a la superficie de la pared del intestino delgado y se

desarrolla hasta alcanzar la forma adulta en 4 meses. Los individuos infectados con la forma adulta del parásito liberan en sus heces proglótidos y huevos que de esta manera contaminan el medio ambiente. Los gusanos adultos de *T. solium* espontáneamente liberan entre 4-5 proglótidos cada día y cada proglótido grávido contiene entre 30,000 a 50,000 huevos, de los cuales, alrededor del 50% contienen embriones infectivos. La contaminación de agua y alimentos con los huevos es favorecida por el fecalismo al aire libre, el hacinamiento y la falta de higiene personal.

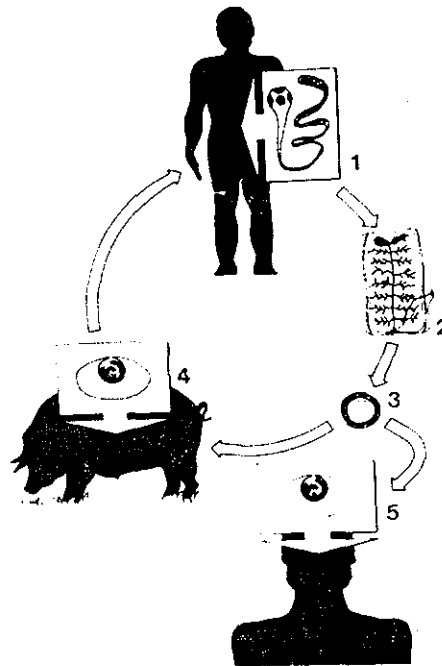


Figura 6. Ciclo de vida de *Taenia solium*. Los seres humanos, hospedero definitivo, alojan al parásito adulto (1). Los individuos teniásicos liberan en sus heces proglótidos maduros y grávidos conteniendo huevos (3) que de esta forma son liberados al medio ambiente. El cerdo es el principal hospedero intermediario (4) alojando a la forma larvaria (cisticercos). Ocasionalmente el hombre puede actuar como hospedero intermediario (5) al ingerir accidentalmente los huevos. Tomado de Aluja et al. 1987.

El ciclo de vida se cierra cuando el cerdo ingiere heces contaminadas con huevos. Las enzimas proteolíticas del estómago e intestino destruyen las envolturas protectoras del huevo liberando al embrión hexacanto (Laclette et al. 1982), el cual atraviesa la mucosa intestinal para alcanzar los capilares sanguíneos y linfáticos que lo llevan a diferentes órganos, en donde se desarrolla hasta convertirse en cisticerco. Ocasionalmente el hombre puede actuar como hospedero intermediario, si ingiere huevos. Una revisión actualizada de esta enfermedad se encuentra en el apéndice 5 (Sciutto et al. 2000) y el apéndice 6 (Vargas-Parada y Laclette 2001) contiene una introducción muy sencilla a la enfermedad, a nivel de divulgación.

El antígeno B es la paramiosina de Taenia solium.

La respuesta inmune de enfermos con neurocisticercosis ha sido estudiada por medio de diversas pruebas en las que esencialmente se separa un extracto crudo del parásito mediante movilidad electroforética, y la reacción se analiza con los sueros de los pacientes. De esta forma se identificaron varios antígenos a los cuales se les denominó con las primeras letras del alfabeto (Flisser et al 1980, Woodhouse 1982). Uno de los antígenos más prominentes resultó ser el antígeno B (AgB) (Guerra et al. 1982), el cual era reconocido por el 84% de los sueros de pacientes con neurocisticercosis comprobada (Flisser et al 1983; Espinoza, 1986). El AgB se purificó a partir de un extracto crudo de cisticercos por precipitación con sales y cromatografía de intercambio iónico (Guerra et al 1982). De esta forma se obtuvo una proteína de aproximadamente 95 kDa que contiene 52% de residuos Asp, Glu, Lys y Arg (Laclette 1989) y que puede unirse a colágena (Laclette et al. 1990).

En ensayos *in vitro*, el AgB inhibe la vía clásica del complemento, probablemente debido a la unión de esta proteína con la región colagénica del C1q (Laclette et al 1989, Laclette et al 1992). La digestión parcial del AgB con tripsina y su posterior microsecuenciación, permitió obtener la secuencia primaria parcial de 17 aminoácidos. Este péptido mostró homología significativa (13/17aa) con los residuos 243 a 260 de la secuencia primaria predicha para la proteína paramiosina de *S. mansoni* (SPmy), homología que se confirmó al probar un antisuero anti-AgB en contra de la paramiosina recombinante de *S. mansoni*, mostrando identidad inmunológica entre ambas proteínas (Laclette et al 1991). Con la clonación de la región codificadora completa del AgB (Landa et al 1993) quedó demostrado que el AgB es la paramiosina de *T. solium* (TPmy). La secuencia de aminoácidos deducida a partir de la secuencia de nucleótidos resultó ser idéntica en un 75% con la secuencia de la SPmy (Laclette et al 1991) y de aproximadamente un 35% con las paramiosinas de *Caenorhabditis elegans* (Kawaga et al 1989), *Dirofilaria immitis* (Limberger y McReynolds 1990) y *Drosophila melanogaster* (Vinós et al 1992).

Las paramiosinas

Las paramiosinas (Pmy) son un grupo de proteínas exclusivas de los invertebrados, incluyendo artrópodos, moluscos, anélidos, crustáceos, insectos, equinodermos y helmintos (Elfvin et al 1976). El Cuadro 1 muestra un listado de las paramiosinas que han sido identificadas.

Cuadro 1. Paramiosinas reportadas en la literatura

Organismo	Grupo Taxonómico	Procedencia del gen*	No. de aminoácidos	Referencia
<i>Blomia tropicalis</i>	Artropoda	cDNA	875aa	Ramos et al. 2001
<i>Boophilus microplus</i>	Artropoda	cDNA		Ferreira et al. 2002
<i>Demathophagoides farinae</i>	Artropoda	cDNA	98kDa, 711aa	Tsai et al. 1998, Tsai et al. 1999
<i>Drosophila melanogaster</i>	Artropoda	cDNA, gDNA	879aa	Vinos et al. 1991, Vinos et al. 1992, Vinos et al. 1992, Becker et al. 1992, Maroto et al. 1995, Adams et al. 2000
<i>D. melanogaster</i> Miniparamiosina	Artropoda	cDNA, gDNA	477aa	Becker et al. 1992, Maroto et al. 1995, Maroto et al. 1996, Adams et al. 2000, Arredondo et al. 2000
<i>Sarcoptes scabiei</i>	Artropoda	cDNA	876aa	Mattson et al. 2000
<i>Mercenaria mercenaria</i>	Mollusca	Incompleta	8aa	Watabe et al. 1989
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Mollusca	cDNA	864aa	Watabe et al. 2000
<i>Anisakis simplex</i>	Nematoda	cDNA	869aa	Perez-Perez et al. 2000
<i>Ancylostoma caninum</i>	Nematoda	cDNA	97kDa	Kohlmetz y et al. 1998
<i>Brugia malayi</i>	Nematoda	cDNA	97kDa, 880aa	Li et al. 1991, Langy et al. 1998
<i>Caenorhabditis elegans</i>	Nematoda	cDNA, gDNA	882aa	Kagawa et al. 1989, Schriefer y Waterston 1989
<i>Dirofilaria immitis</i>	Nematoda	cDNA	98kDa, 848aa	Limberger y McReynolds 1990, Grandea et al. 1989
<i>Onchocerca gibsoni</i>	Nematoda	cDNA, incompleta	220kDa, 672aa	Zhang y Miller 1995. Paramyosin related protein
<i>Onchocerca volvulus</i>	Nematoda	cDNA	879aa	Dahmen et al. 1993, Conraths et al. 1992, Limberger y Mc Reynolds 1990
<i>Opistharchis felineus</i>	Nematoda	cDNA, incompleta	638aa	Shustov et al. 2001, Shustov et al. 2002
<i>Wuchereria bancrofti</i>	Nematoda	cDNA, incompleta	500aa	Seltman et al. 2000
<i>Echinococcus granulosus</i>	Platyhelminthes	cDNA	97kDa, 863aa	Muhlschlegel et al. 1993
<i>Echinococcus multilocularis</i>	Platyhelminthes	ND	97kDa	Muhlschlegel et al. 1993
<i>Hymenolopis nana</i>	Platyhelminthes	cDNA, incompleta	214aa	Macnish et al. 2002
<i>Schistosoma mansoni</i>	Platyhelminthes	cDNA	97kDa, 866aa	Laclette et al. 1991, Lanar et al. 1986
<i>Schistosoma japonicum</i>	Platyhelminthes	cDNA	866aa	Kalina et al. 1997, Zhou et al. 1999, Zhou et al. 2000, Zhou et al. 2000
<i>Schistosoma japonicum ch</i>	Platyhelminthes	cDNA, incompleta	443aa	Hooker et al. 1995
<i>Schistosoma japonicum ph</i>	Platyhelminthes	cDNA	97kDa, 866aa	Becker et al. 1995, Nara et al. 1994, Yang et al. 1992
<i>Taenia crassiceps</i>	Platyhelminthes	cDNA, incompleta	15 y 17aa	Kalina y McManus 1993
<i>Taenia saginata</i>	Platyhelminthes	cDNA	863aa	Ferrer et al. 2002
<i>Taenia solium</i>	Platyhelminthes	cDNA, gDNA	98kDa, 863aa	Landa et al. 1993, Laclette et al. 1991, Vargas-Parada y Laclette 2002

*La procedencia del gen indica si ha sido clonado de una biblioteca de cDNA ó gDNA, y si se tiene la secuencia completa del gen.

Los filamentos de Pmy interactúan con los de la miosina, lo que sugiere que esta proteína participa en el ensamblaje de los filamentos gruesos (Epstein et al. 1985; Cohen et al. 1987). En los moluscos participa en el mecanismo de agarre (catch mechanism), condición fisiológica que le permite al animal largos periodos de tensión o contracción muscular con bajo consumo de energía (Watabe y Hartshorne 1990).

Las paramiosinas tienen una estructura de alfa hélice superenrollada, y su secuencia de aminoácidos presenta una organización característica, con repeticiones de 7 aminoácidos (a-b-c-d-e-f-g)_n, donde a y d son generalmente residuos hidrofóbicos apolares (Cohen et al 1987). La paramiosina forma dímeros, con ambas cadenas proteicas corriendo en la misma dirección. En estas estructuras homodiméricas y filamentosas, las dos cadenas se estabilizan por medio de cierres de leucinas que se forman entre cadenas laterales hidrofóbicas (Cohen et al. 1971; Cohen and Parry 1990). La secuencia completa de aminoácidos de diferentes paramiosinas conserva las características fisicoquímicas que le dan a su estructura la forma de alfa hélice, por lo que la mayoría de las sustituciones involucran cambios conservativos, es decir, cambios por aminoácidos con propiedades fisicoquímicas parecidas. Las Pmy pueden encontrarse fosforiladas, generalmente en los residuos de serina, aunque el número y localización de los sitios de fosforilación varían de acuerdo a la especie (Schriefer y Waterson 1989, Vinós et al. 1991, Dey et al. 1992, Schmidt et al 1996). Han sido identificadas como antígenos en varios parásitos helmintos (Pearce et al. 1986; Limberger and McReynolds 1990; Laclette et al. 1991; Mühlshlegel et al. 1993), y son el blanco de inmunidad protectora en algunos de ellos (Pearce et al 1986, Pearce et al. 1988; Nanduri and Kazura 1989; Nara T et al, Gobert 1998), lo que las ha convertido en candidatas para la vacunación en estos parásitos.

La primera inmunolocalización de la paramiosina se hizo en *Schistosoma mansoni* utilizando inmunofluorescencia indirecta, con la cual se localizó a la proteína en regiones justo debajo de la superficie del parásito (Pearce et al 1986). Unos años después, en un estudio más detallado en el cual se utilizaron anticuerpos contra la paramiosina de *Limulus* (Matsumoto et al 1988), se reportaron altos niveles de proteína en la matriz del tegumento. En el trabajo se hace notar que, en contraste con lo observado en el tegumento, en las fibras musculares los niveles de paramiosina son relativamente bajos. La paramiosina de *T. solium* se localizó, utilizando inmunofluorescencia y tinción con inmunoperoxidasa indirecta, en forma difusa en el tejido del cisticerco, con predominancia en los citones tegumentales (Laclette et al 1987). La localización no muscular de la paramiosina fue un descubrimiento inesperado, que apoyaba la hipótesis de que

la paramiosina podía funcionar como un potente inhibidor de la vía clásica del complemento, además de su papel estructural en los filamentos gruesos del músculo. Sin embargo, más tarde se encontró que la fijación con aldehído, que normalmente se realiza antes de la inmunofluorescencia, altera el patrón de inmunolocalización de la paramiosina, de tal modo que si la inmunofluorescencia se hace con tejido no fijado, el AgB se localiza predominantemente en los tejidos musculares (Laclette et al 1995). La observación de que la fijación con aldehído disminuye el inmunomarcaje de la paramiosina en las fibras musculares (Laclette et al 1995), trajo una explicación a los bajos niveles de paramiosina reportados en estos tejidos. La inmunolocalización de *S. mansoni* utilizando un método de intensificación por plata y oro coloidal, detectó a la paramiosina exclusivamente en el tejido muscular. Más aún, en este trabajo se sugiere que las sales de calcio de las glándulas postacetabulares podrían reducir los iones de plata, causando la precipitación de esta durante la intensificación del marcaje con oro, resultando en un falso positivo (Schmidt et al 1996). Sin embargo, la controversia sobre la localización de la paramiosina continúa. En un estudio de microscopía electrónica, utilizando anticuerpos policlonales contra la proteína recombinante de *S. japonicum*, se detectó paramiosina no solo en el músculo de la cercaria, esquistosómula y adulto, sino también en los gránulos de las glándulas postacetabulares de la cercaria y en la matriz tegumental y superficie de las esquistosómulas (Gobert et al 1997). Es importante hacer notar que este trabajo se tuvo extremo cuidado con la metodología de fijación y tinción para evitar los problemas metodológicos observados previamente. La localización extramuscular de la paramiosina también se ha reportado en *Echinococcus granulosus* (Muhlschlegel et al 1993) y *S. japonicum* (Nara et al 1994).

Paramiosina en Caenorhabditis y Drosophila

A pesar de la información abundante sobre la paramiosina en diversos invertebrados, sólo los genes de Pmy del nemátodo *Caenorhabditis elegans* (Kagawa et al. 1989) y el de la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* (Maroto et al. 1995) han sido caracterizados a nivel genómico. El gen de la paramiosina de *C. elegans* (*unc-15*) fue identificado originalmente mediante un tamizaje de una biblioteca de expresión con anticuerpos específicos. Posteriormente, mediante sondas, se identificó el gen completo en una biblioteca genómica de cósmidos. La secuencia completa de nucleótidos comprende una región de 12 kb y el gen está compuesto de 10 exones que codifican una proteína de 882 aminoácidos (Kagawa et al 1989). Mediante titulación con sales y diferencia de pH se aislaron dos poblaciones de paramiosina en *C. elegans*. Ambas poblaciones mostraron diferencias en su capacidad para ensamblarse y disociarse de los

filamentos gruesos de miosina (Deitiker y Epstein 1993), lo que está relacionado con fosforilación diferencial. Además se ha demostrado la actividad de una cinasa dependiente de magnesio que actúa sobre la paramiosina después de que ésta ha sido desensamblada de los filamentos gruesos (Dey et al 1992).

El gen de la paramiosina de *D. melanogaster* se aisló a partir de una biblioteca de expresión utilizando anticuerpos policlonales anti-paramiosina. La secuencia de aminoácidos, deducida a partir del cDNA, mostró un 47% de identidad con la paramiosina de *C. elegans*. La paramiosina de *D. melanogaster* codifica 468 aminoácidos con un arreglo de 28 repeticiones, característica de las proteínas del filamento grueso. Mediante inmunofluorescencia indirecta se mostró la presencia de la proteína en el músculo tubular y por medio de isoelectroenfoque se identificaron al menos tres isoformas de aproximadamente la misma masa molecular (197kDa), siendo la isoforma menos abundante la más ácida y fosforilada (Vinos et al 1991). El análisis por Southern blot indicó que solo hay una copia del gen de paramiosina, aunque por análisis de Northern blot se identificaron dos formas diferentes de RNA, producto de dos sitios alternativos de poliadenilación (Vinos et al 1992). Utilizando como sonda el cDNA de la paramiosina, se tamizó una biblioteca genómica de *Drosophila* y se aislaron tres diferentes clonas. El gen comprende 12.8 kb y se divide en 11 exones y 10 intrones. Todos los exones identificados pertenecen a la secuencia de la paramiosina a excepción del exón IB (localizado entre el exón 7 y 8 de la paramiosina). Este exón junto con los exones VIII y IX codifican para otra isoforma de la paramiosina: la miniparamiosina, la cual se produce por splicing alternativo (Maroto et al 1995). Ambos genes se expresan como unidades transcripcionales sobrepuestas que codifican para la paramiosina y la miniparamiosina utilizando dos promotores y una combinación de diferentes orígenes de transcripción y sitios de poliadenilación. La miniparamiosina codifica para una proteína de 55kDa que tiene una secuencia amino terminal única y se encuentra sólo en el músculo de la pupa y del adulto pero no en el de la larva (Becker et al 1992). La comparación de los promotores de paramiosina de *D. melanogaster* y *D. virilis* mostraron una estructura conservada y en ambos promotores se encontraron secuencias probables para la caja E, que es parte integral de los elementos reguladores positivos de genes musculares (Maroto et al 1995).

Llama la atención que, a diferencia de lo observado en la localización de la paramiosina en platelmintos, en *Drosophila* y *Caenorhabditis* la paramiosina siempre ha sido localizada en los tejidos musculares. En *C. elegans*, la paramiosina se coensambla junto con las cadenas pesadas A y B de la miosina, en una proporción y estructura definida, para formar los filamentos gruesos de

la pared muscular del cuerpo (Honda y Epstein 1990), mientras que en *Drosophila* se encuentra asociada al músculo tubular (Vinos et al 1991).

La Paramiosina de Schistosoma

Dentro de los platelmintos, la paramiosina de *Schistosoma* ha sido una de las más ampliamente caracterizada. Durante uno de los primeros estudios de vacunación contra la esquistosomiosis se encontró que una gran parte de la respuesta inmunológica, que incluía una gran proporción de anticuerpos, se dirigía en contra de una proteína de 97 kDa a la cual se le denominó Sm97. Para el ensayo se utilizó un modelo murino, al cual se le inyectaron homogenados de adultos de *Schistosoma mansoni* ó esquistosómulas inactivadas. Más tarde, la proteína Sm97 fue identificada como paramiosina mediante secuenciación de DNA y análisis de aminoácidos (Lanar et al 1986). El hecho de que el inmunógeno utilizado en la vacunación fuera una proteína muscular, generó varias interrogantes sobre cómo una proteína intracelular podría estimular la respuesta inmune.

Aunque en 1987 se reportó la producción de anticuerpos de clase IgE contra un antígeno de 97 kDa en extractos de *Schistosoma japonicum* (Kojima et al 1987), no fue sino hasta 1994 que se demostró que el anticuerpo IgE era específico para la paramiosina (Nara et al 1994). La IgE podía proveer hasta un 58% de protección en contra de la infección con cercarias de *S. japonicum* en un modelo murino (Kojima et al 1987). Otros ensayos de vacunación, utilizando paramiosina recombinante y nativa junto con BCG (Bacillus Calmette Guerin), lograron una protección de entre 26-33% en ratones infectados con *S. mansoni*. Se determinó que la principal respuesta era mediada por células T y por interferón gamma (IFN γ) (Pearce et al 1988). En ratones vacunados con la paramiosina nativa y retados con cercarias de *S. mansoni* se reportó protección del 24-53% (Flanigan et al 1989) mientras que con paramiosina nativa sin adyuvante, se indujo 62-86% de protección después de retar con cercarias de *S. japonicum* (Ramírez et al 1996).

Como se mencionó anteriormente, la paramiosina de varios invertebrados existe en más de una isoforma. En el caso de *Schistosoma* fue posible identificar hasta 10 distintas proteínas en el rango de pH entre 4.7 y 5.2 por medio de electroforesis de doble dimensión y revelando con anticuerpos anti-paramiosina, sugiriendo que los músculos de los esquistosomas contienen diferentes isoformas de la proteína. Además, anticuerpos anti-fosfotirosina y anti-fosfoserina reaccionaron con la paramiosina purificada de los esquistosomas, lo que comprueba que esta

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

proteína se encuentra fosforilada (Schmidt et al 1996), y que la generación de estas isoformas se podría explicar por eventos de fosforilación diferencial, como se ha reportado en *Caenorhabditis* (Schriefer y Waterson 1989) y *Drosophila* (Vinos et al 1991).

La paramiosina de T. solium y otros céstodos

Además de *T. solium*, se han identificado las paramiosinas de *E. granulosus*, *E. multilocularis* (Muhlschlegel et al 1993), *H. nana* (Macnish et al 2002), *T. crassiceps* (Kallina y McManus 1993) y *T. saginata* (Ferrer et al 2002). Para las tres últimas especies solo se conoce la secuencia parcial del cDNA. En el caso de *Echinococcus*, la secuencia de aminoácidos predicha a partir del cDNA, mostró 71% de identidad con la paramiosina de *S. mansoni*, y la proteína se localizó mediante inmunofluorescencia en el tegumento y el protoescólex de la larva (Muhlschlegel et al 1993). En este trabajo también se observa fluorescencia en los músculos de las ventosas orales aunque el autor no lo menciona.

La paramiosina de *T. solium* ha sido probada como candidato para la vacunación contra la cisticercosis en numerosos trabajos. Los resultados obtenidos en nuestro laboratorio muestran que la inmunización con la TPmy recombinante induce protección en contra de la cisticercosis murina (Vázquez-Talavera et al 2001). En un estudio para identificar qué regiones de la proteína son inmunologicamente relevantes para la respuesta inmune, se encontró que el suero de pacientes con neurocisticercosis reacciona principalmente con la región carboxilo de la proteína y muy poco con la región central y amino (Vázquez-Talavera et al 2001). En este estudio se encontró que a diferencia de la respuesta humoral, la respuesta inmune celular no muestra reconocimiento preferencial por ninguna de estas regiones. Más recientemente, se reportaron niveles de protección entre el 85 al 99 % en contra de la infección por el cisticerco de *T. solium* utilizando el DNA de la TPmy para inmunizar cerdos (Cai et al 2001).

ANTECEDENTES

Estructura del gen eucariote

La transcripción es el proceso encargado de la síntesis de una molécula de RNA a partir de la información genética contenida en la región codificante de un DNA. Los genes que contienen la información para sintetizar una molécula de polipéptido contienen dos tipos de secuencias con funciones diferentes, una reguladora de la expresión, y otra estructural o realmente codificadora, con la presencia de regiones codificantes y no codificantes.

La región reguladora, sin función codificante, está situada normalmente hacia el extremo 5' de la región estructural. Contiene distintas regiones promotoras, encargadas de interactuar con los factores de transcripción proteicos para regular positiva o negativamente el inicio de la transcripción. En función de su capacidad de expresión, la región estructural se divide en dos tipos de secuencias: los intrones, o regiones no codificantes, presentes al interior del gen, y los exones, que incluyen tanto las secuencias codificantes como las no codificantes de ambos extremos del gen. El conjunto de exones e intrones de la región estructural se transcriben para dar lugar a un RNA llamado precursor o transcrito primario, el cual, a través de un proceso adicional durante el cual se pierden los intrones, y los exones se unen linealmente, da lugar a moléculas funcionales o maduras de RNA. Este proceso de escisión de intrones, depende de la estructura del RNA y de la secuencia de nucleótidos localizada en los sitios de escisión, justo en el borde entre exones e intrones. Las secuencias consenso para estos sitios de escisión han sido determinadas para muchos genes eucariotas (Seif et al. 1979; Benoist et al. 1980; Breathnach y Chambon 1981), encontrándose que en todos los genes analizados se encuentran las secuencias 5'GT y 3'AG (Senapathy et al 1990).

La unidad de transcripción

A la cadena de DNA, que normalmente se documenta al dar la secuencia de un gen, se le denomina hebra codificante y es idéntica en secuencia al RNA mensajero. También se le conoce como hebra no transcrita, con sentido, positiva o no molde. La hebra a partir de la cual se sintetiza el RNA se le denomina DNA molde, no codificante, transcrita, antisentido o negativa. La posición de las bases en cualquier gen o región del DNA relacionada con el proceso de la transcripción se refiere a la hebra no molde, codificante. Por convención, su orientación es la del sentido de transcripción. Los nucleótidos de esta hebra se numeran a partir del punto de inicio de

la transcripción, al que se asigna el valor +1 y se denomina origen de la transcripción. No existe el nucleótido número cero. Los situados hacia el extremo 5' se dice que están corriente arriba y se indican con número negativos consecutivos. Los nucleótidos situados en el sentido de la transcripción hacia el extremo 3', están corriente abajo y se indican con números positivos consecutivos. A pesar de la convención, en algunas ocasiones, sobre todo cuando el sitio de inicio de la transcripción no ha sido definido, el valor +1 se asigna a la primera base del codón de inicio de la traducción.

Para que tenga lugar la transcripción, es necesaria la presencia en la hebra molde de la llamada unidad de transcripción, que incluye la secuencia del DNA que se ha de transcribir más las dos secuencias consenso que la flanquean (llamadas promotor y terminador). La terminación de la transcripción ocurre al alcanzar determinadas secuencias del DNA eucariótico, aún poco caracterizadas.

El promotor

Un promotor o secuencia promotora es una región de DNA que regula el inicio de la transcripción de un gen, y se les suele llamar también factores cis, por encontrarse en la misma molécula de DNA cuya expresión regulan. Una característica de la transcripción eucariótica es que su regulación se debe a la afinidad específica por los promotores de ciertas proteínas denominadas factores de transcripción (FT). A cada promotor se puede unir un número variable de FT, que actúan favoreciendo o dificultando la unión y la actividad de la RNA polimerasa, o de otros factores de transcripción y, en consecuencia determinando la posición y eficacia del inicio de la transcripción. Los FT se denominan también factores trans, pues sus genes están en posiciones alejadas y no relacionadas con aquella región génica cuya expresión regulan.

El promotor basal comprende las secuencias que definen el punto de inicio de la transcripción y son imprescindibles para que ésta comience. Es una región situada en posición adyacente al origen de la transcripción, comúnmente hacia el extremo 5' hasta la posición -30. Una de las secuencias más habituales es la secuencia TATA, caja TATA o caja de Hogness, situada típicamente alrededor de las posiciones -15 a -25 (Goldberg 1979; Benoist et al. 1980). Otra secuencia basal frecuente es la secuencia iniciadora Inr también llamada señal CAP, situada sobre el propio origen, entre -3 y +5. Hay promotores que tienen ambas secuencias, solo una de ellas o ninguna (Weis y Reinberg 1992).

A menudo, el promotor basal no es suficiente por sí mismo para provocar el inicio de la transcripción, sino que se requiere de otra región adicional conocida como promotor proximal.

Esta región normalmente se encuentra cercana al promotor basal, pero más alejada corriente arriba del origen, comúnmente entre las posiciones -30 y -200. Los elementos proximales determinan la frecuencia con la que se produce el inicio de la transcripción. Esto es posible gracias a que sobre ellos se unen diversos factores de transcripción que favorecen la interacción de la RNA polimerasa con el DNA en el punto de inicio. Los dos elementos proximales más característicos son la caja o secuencia CAAT, entre -60 y -80 (Efstratiadis et al 1980; Bucher 1990; Santoro et al. 1998), y la caja GC (Bucher 1990), que aparece en copias múltiples en cualquier orientación, a menudo a ambos lados de la caja CAAT.

La expresión de algunos genes sufre una regulación aún más compleja, que depende de secuencias situadas a gran distancia del punto de inicio, incluso de varios miles de pb, corriente arriba o corriente abajo. Esto ocurre especialmente para los genes inducibles. Estas secuencias promotoras distales son muy variadas y específicas para cada gen y se clasifican en dos tipos principales, los potenciadores, que aumentan la velocidad de inicio de la transcripción, y los silenciadores, que tienen el efecto opuesto.

Estructura de genes en céstodos

A la fecha, poca información está disponible sobre la organización de los genes en céstodos. Aunque muchos genes han sido clonados y caracterizados, en la mayor parte esto solo ha sido en bibliotecas de cDNA y por lo tanto se conoce poco sobre las secuencias reguladoras y la estructura de dichos genes.

En *E. granulosus* se caracterizaron dos secuencias genómicas para el gen de actina, *EgactI* y *Egact II* (da Silva et al 1993), que codifican para proteínas de 375 y 376 aminoácidos respectivamente. Se identificó un intrón de 591 pb en la secuencia de *Egact II*, localizado en la posición correspondiente al codón 42 (que corresponde a la posición 41 en *EgactI*), y cuya secuencia de escisión es igual a las secuencias consenso reportadas. Además en la región 3' se identificaron señales potenciales de poliadenilación (Proudfoot y Brownlee 1976; Fitzgerald y Shenk 1981) 56 y 58 nt abajo del codón de terminación en las secuencias de *EgactI* y *EgactII* respectivamente. La posición de los intrones en los genes de actina ha mostrado estar conservada en los genes analizados, especialmente en deuterostomados (Fornwald et al 1982; Zakut et al 1982). De hecho, la hipótesis más aceptada sobre el número y la posición de intrones en los genes modernos de actina, al menos en el caso de los deuterostomados, es que son el resultado de la pérdida de algunos de los intrones de un gen de actina ancestral común que originalmente tenía muchos intrones. Previamente al analizar las actinas de algunos protostomados, no se había

encontrado que las posiciones de los intrones estuvieran conservadas y que hubiera coincidencia con las posiciones de intrones encontradas en deuterostomas (Fyrberg *et al* 1981; Fischer y Bode 1989). Sin embargo, la presencia del intrón en el codón 42 de *E. granulosus*, la presencia de un intrón que interrumpe el codón correspondiente al aminoácido 41 en los genes de actina de *T. solium* y en los genes de actina de *Pisaster ochraceus*, *S. purpuratus*, *Xenopus laevis*, pollos, ratas y el hombre (Fornwald *et al* 1982; Kowbel y Smith 1989; Crain *et al* 1987; Mohun *et al* 1986; Nudel *et al* 1983; Nakajima-Iijima *et al* 1985), demuestra una correlación evolutiva entre los genes de actina de prostostomados y deuterostomados apoyando la hipótesis de que los genes primordiales de actina contienen muchos intrones, algunos de los cuales se suprimieron durante la evolución. También en *E. granulosus*, se caracterizó el promotor de un gen ribosomal, aunque no se demostró actividad funcional. Dicho promotor no mostró homología con otros promotores de genes ribosomales de otros organismos, aunque si se identificaron algunos elementos reguladores como una región rica en d(T) en la posición -32 del sitio de inicio de la transcripción, y dos repeticiones invertidas (IR) presentes en otros genes ribosomales (Picon *et al.* 1996). El primer reporte de promotores funcionales en céstodos fue para los promotores de actina de los genes EgactI y EgactII (Gimba *et al.* 2000). Ambos promotores mostraron actividad en una línea celular de mamíferos NIH3T3, utilizando como reportero al gen de la cloranfenicol acetiltransferasa (CAT).

Estructura de genes en Taenia

En el caso de *T. solium*, poco más de una docena de genes han sido reportados (Cuadro 2), de los cuales solo se conoce la estructura de unos cuantos. Los primeros genes completos de céstodos que se describieron fueron los genes pAT5 y pAT6 de actina, que contienen una región codificadora para una proteínas de 376 aminoácidos, interrumpida en cada gen por un solo intrón, localizado después del codón para el aminoácido 41 (Campos *et al* 1990). El intrón tiene una longitud de 395pb en pAT5 y 413pb en pAT6. Las secuencias en la unión exón/intrón implicadas en la escisión del RNA mensajero (RNAm), corresponden a las secuencias consenso identificadas en otros genes eucariotas en los cuales se lleva a cabo el procesamiento del RNAm. En el análisis de las regiones corriente arriba se identificaron dos secuencias en las posiciones -126 y -95 desde el codón de iniciación, en pAT5, y en la posición -130 en pAT6, las cuales coinciden con las secuencias consenso para cajas CAAT. Las secuencias 5'-TATATAA-3'(posición -71) en pAT5 y 5'-CATAAAT-3'(posición -76) y 5'-TATAAGA-3'(posición -53) en pAT6 coinciden con las secuencias consenso para las estructuras de caja TATA. Finalmente, se encontraron dos

secuencias probables de reconocimiento para poliadenilación (AAUAAA) (Proudfoot y Brownlee, 1976; Fitzgerald y Shenk 1981), 63 y 73 nucleótidos corriente abajo del codón de terminación en pAT5 y pAT6 respectivamente. La comparación de las secuencias de ambos genes mostró que el segundo exón se encuentra más conservado que el primero.

Los genes TSO45-1 y TSO45-4 son homólogos al gen 45W de *T. ovis* (Waterkeyn et al 1997), y consisten de cuatro exones y tres intrones de manera similar a la familia de genes 45W (Gauci y Lightowlers 2001). Las secuencias en la unión del borde exón/intrón corresponden a las secuencias consenso. Se identificaron ocho transcritos codificados por al menos cinco genes y la comparación de las secuencias de DNA mostró que algunos de estos transcritos se forman por escisión alterna (alternative splicing) (Horowitz y Krainer 1994). Este es el primer reporte en cestodos sobre la escisión alterna de los RNAm. Más recientemente, se caracterizó un gen que codifica para una secuencia líder de escisión que participa en la transescisión (trans-splicing) de mRNAs (Brehm et al. 2002).

Cuadro 2. Genes reportados en *T. solium*

Nombre del Gen	Referencia
Actina	Campos et al. 1990
Paramiosina	Landa et al. 1993
Antígeno recombinante protector	Manoutcharian et al. 1996
Proteína ribosomal P	Kalina y McManus 1996
Miosina	Ambrosio et al. 1997
Transportador de glucosa (TGTP1 y TGTP2)	Rodríguez-Contreras et al. 1998
Proteína de la oncosfera	Gauci et al. 1998
Proteína recombinante 10kDa	Chung et al. 1999
Antígenos 14 y 18kDa GPs	Greene et al. 2000
Triosafosfato isomerasa	Jimenez L et al. 2000
Antígeno de bajo peso molecular	Sako et al. 2000
Citocromo oxidasa I	Hancock et al. 2001
TSO45-1 y TSO45-4	Gauci y Lightowlers. 2001
Anexina	Guo et al. 2001, Hongli et al. 2002

El gen de la paramiosina de T. solium

El gen de la paramiosina de *T. solium* se clonó a partir de una biblioteca de cDNA preparada con RNA mensajero (2-7 kb) de cisticercos de *T. solium* (Landa et al. 1993). La clona de cDNA, conteniendo la región codificadora completa de la paramiosina, tiene un solo marco de lectura que corresponde a una proteína con 863 aminoácidos y un peso calculado de 98 kDa. La secuencia de aminoácidos, deducida a partir de la secuencia de cDNA, mantiene el patrón de

organización de grupos de 7 residuos característico de las paramiosinas, con excepción de los primeros 15 residuos del extremo amino y los últimos 31 residuos del extremo carboxilo. En el extremo 3', una cola de adeninas indicó que la clona contiene la región no transcrita completa. Por ensayos de hibridación se determinó la presencia de un solo transcrito de aproximadamente 3.6 kb, codificado por un gen de copia única. La secuencia codificadora completa se ligó en un vector de expresión con el fin de obtener la proteína recombinante, la cual se purificó parcialmente. Esta proteína recombinante mostró afinidad por colágeno así como la capacidad de inhibir in vitro la actividad de C1q.

La inhibición de la cascada del complemento, por la Tpmv, sugiere un papel activo de esta proteína en la evasión de la respuesta inmune del hospedero, evitándolo el daño al tegumento (Podack 1980), disminuyendo la producción de mediadores inflamatorios (anafilatoxinas), impidiendo el escalamiento de la reacción inflamatoria (Chenoweth 1986) y facilitando así la coexistencia de estos dos organismos (Laclette et al 1989). Sorprendentemente, la secuencia de cDNA no mostró ninguna señal característica de las proteínas de secreción-excreción, lo que dificulta explicar el posible papel inmunomodulador de la paramiosina observado in vitro.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

HIPÓTESIS

En vista de que la secuencia del cDNA de la paramiosina de *T. solium* no mostró ninguna señal de excreción/secreción en el extremo amino terminal que pudiera explicar su posible papel *in vivo* como inhibidor del complemento, se sugiere la existencia de isoformas de paramiosina producidas a partir de escisión alterna que puedan inhibir al complemento.

OBJETIVOS

1. Clonar un fragmento extenso del DNA genómico que contenga el gen de la paramiosina
2. A partir de la secuencia completa del gen de paramiosina determinar la estructura del gen incluyendo la localización de intrones y exones
3. Caracterizar las posibles regiones reguladoras localizadas 5' de la secuencia codificadora y el sitio de inicio de la transcripción, para poder en un futuro diseñar vectores de expresión para estudios de transfección en cisticercos

El artículo resultado del trabajo que a continuación se detalla se encuentra en el apéndice 1 (Vargas-Parada L y Laclette JP (2002) Gene Structure of *Taenia solium* paramyosin. Parasitol Res, en prensa).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

HIPÓTESIS

En vista de que la secuencia del cDNA de la paramiosina de *T. solium* no mostró ninguna señal de excreción/secreción en el extremo amino terminal que pudiera explicar su posible papel *in vivo* como inhibidor del complemento, se sugiere la existencia de isoformas de paramiosina producidas a partir de escisión alterna que puedan inhibir al complemento.

OBJETIVOS

1. Clonar un fragmento extenso del DNA genómico que contenga el gen de la paramiosina
2. A partir de la secuencia completa del gen de paramiosina determinar la estructura del gen incluyendo la localización de intrones y exones
3. Caracterizar las posibles regiones reguladoras localizadas 5' de la secuencia codificadora y el sitio de inicio de la transcripción, para poder en un futuro diseñar vectores de expresión para estudios de transfección en cisticercos

El artículo resultado del trabajo que a continuación se detalla se encuentra en el apéndice 1 (Vargas-Parada L y Laclette JP (2002) Gene Structure of *Taenia solium* paramyosin. Parasitol Res, en prensa).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

MATERIAL Y MÉTODOS

A. Materiales biológicos

Parásitos

Los cisticercos de *T. solium* se obtuvieron por disección de músculo esquelético de cerdos infectados. Los cisticercos se congelaron en hielo seco inmediatamente después de la disección y se mantuvieron a -70°C hasta su uso.

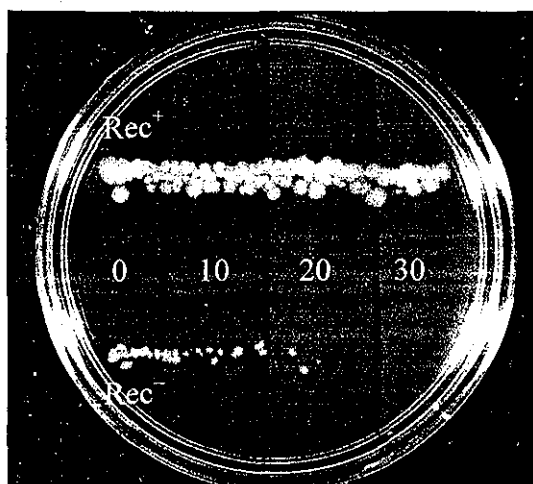
Células bacterianas

Las cepas de *Escherichia coli* utilizadas en este proyecto fueron:

JF242	fenotipo: recB21-recC22 derivada de LE392 (supEsupF)
JM101	fenotipo: supE thi Δ (lac ⁻ proAB) F' [traD36 proAB ⁺ lacI ⁹ lacZ Δ M15]

Caracterización del fenotipo Rec⁻

Para confirmar el fenotipo deficiente para recombinación (Rec⁻) de la cepa JF242, se utilizó el fenotipo asociado de sensibilidad a luz ultravioleta (UV). Se sembraron dos cultivos a partir de colonias únicas de cepas Rec⁻ (JF 242) y Rec⁺ (JM 101) en 5ml de medio Luria Beltrani (LB) y se dejaron crecer toda la noche con agitación a 200 rpm a 37°C . Usando un asa flameada se sembró cada una de las cepas en forma de una franja de aproximadamente 6 cm (Figura 7). La caja de Petri se dividió en 4 zonas marcadas 0, 10, 20 y 30, las cuales se expusieron durante 0, 10, 20 ó 30 segundos, respectivamente, a luz UV (254 nm). Para evitar procesos de reparación inducidos por la luz, la caja se envolvió en papel aluminio y se incubó a 37°C durante toda la noche.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Fig 7. Caja LB con las cepas JM101 (cepa Rec⁺) y JF242 (cepa Rec⁻) expuestas a luz UV.

Biblioteca genómica

La biblioteca genómica de DNA de cisticercos de *T. solium*, proporcionada por el Dr. Abraham Landa (Facultad de Medicina, UNAM), fue construida en el bacteriófago λ Syrinx 2A (Lutz et al 1987) y contiene aproximadamente 8×10^4 recombinantes independientes con insertos de 5-15 kb (Figura 8).

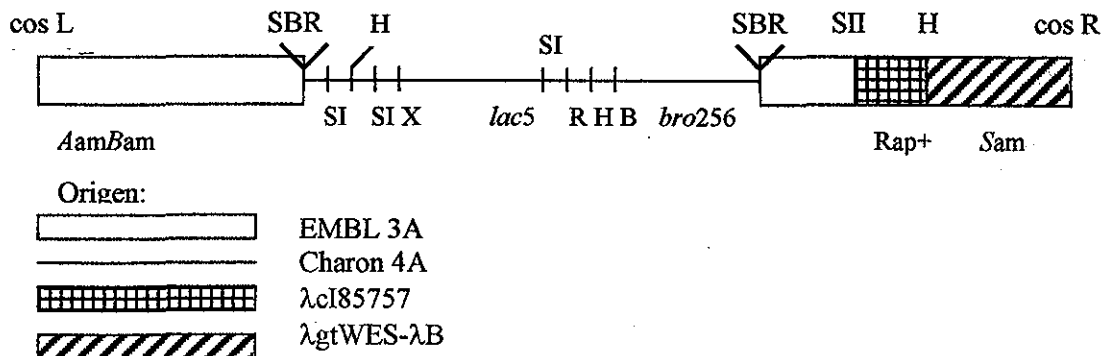


Fig 8. Mapa de lambda Syrinx 2A. Se muestran los fagos de donde se derivó Syrinx 2A. También se muestran los genes relevantes, la región codificadora del fenotipo Rap⁺ y los sitios de restricción. *Sal* I (S), *Bam*HI (B), *Eco*RI (R), *Hind* III (H), *Xba* I (X), *Sst* I (SI) y *Sst* II (SII). El fragmento *Eco* RI *lac5* está invertido con relación a Charon 4A.

cDNA

Con el fin de estudiar hacia qué regiones de la proteína se dirige la respuesta inmune humoral y celular del huésped, se prepararon en el laboratorio construcciones en el vector de expresión pRSET-B (In Vitrogen Co., San Diego, CA) diseñadas para expresar fragmentos recombinantes, que corresponden a tercios de la paramiosina completa (Vázquez-Talavera et al. 2001). La construcción que contiene la región codificadora completa de la paramiosina se denomina VW7-3, la VW2-1 contiene el tercio que codifica para la región amino de la proteína, la VW3-3 codifica para el tercio central y la VW4-1 codifica para la región carboxilo de la proteína. Estas construcciones se utilizaron para preparara las sondas para el tamizaje.

B. Enzimas y otros reactivos.

Las endonucleasas de restricción, así como sus amortiguadores específicos, se obtuvieron comercialmente de Boehringer. La proteinasa K (proteinasa de *Tritirachium album* tipo XI), la RNAsa (Ribonucleasa de páncreas bovino tipo XII-A), y la lisozima fueron obtenidas de Sigma Chemicals. El IPTG y el X-Gal fueron de BRL.

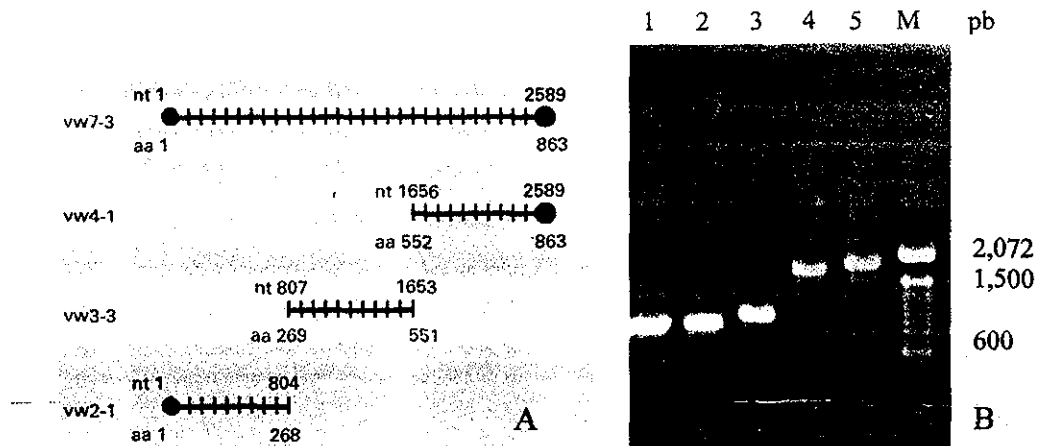


Fig 9. A. Representación esquemática de las construcciones de la paramiosina de *T. solium* en pRSET. Las posiciones de nucleótidos (nt) y aminoácidos (aa) se indican por números con base en la secuencia del cDNA de la TPmy (Tomado de Vázquez-Talavera et al 2001). B. Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio que muestra los productos resultantes de la amplificación por PCR de cada uno de los tercios usando como templado vw 7-3. Carril 1. Tercio amino amplificado con los oligonucleótidos X1-X6; Carril 2. Tercio central amplificado con X4-X7; Carril 3. Tercio carboxilo amplificado con X5-X2; Carril 4. Amplificación con X1-X7; Carril 5 Amplificación con X4-X2; M marcador de peso molecular 100 pb

C. Métodos Moleculares

Extracción y purificación del DNA de T. solium a partir de cisticercos

Se pesaron 10 g de cisticercos congelados, a los cuales se les agregó 100 ml de una solución salina con citratos (SSC) (0.87% de NaCl, 0.44% citrato de sodio, pH 7). La solución con los cisticercos se mantuvo en hielo mientras se homogenizó con un vástago de teflón (10 golpes). El homogenizado se centrifugó durante 20 min en un rotor GSA a 4,500 rpm a 4°C y el precipitado se resuspendió en 10 volúmenes de una solución EDTA 0.5M, sarkosil 0.5% y proteinasa K 100 µg/ml (pH 8.0). Posteriormente se incubó a 50°C hasta que el precipitado se disolvió completamente (aproximadamente 3h). El DNA se obtuvo a partir de tres extracciones consecutivas con fenol-Tris, centrifugando a 4,000 g durante 5 min, desechando cada vez la fase orgánica. El sobrenadante se dializó contra 4L de una solución de TE (1mM EDTA en 10 mM de Tris-HCl, pH 7.6) y posteriormente se trató con RNAsa (10mg/ml) a 37°C durante 1h seguido de una extracción fenol-Tris, fenol-Tris-cloroformo (1:1) y una extracción más con cloroformo. Finalmente, la solución de DNA se dializó contra TE, se precipitó con etanol absoluto y se guardó a -20°C hasta su uso. El DNA purificado se cuantificó en el espectrofotómetro y su integridad se verificó sometiendo a electroforesis una alícuota en un gel de agarosa.

Purificación del DNA plásmídico

El pRSET, previamente introducido en la cepa adecuada para la amplificación del plásmido (*E. coli* K12 DH1 RecA⁻), se extrajo de un cultivo bacteriano crecido en 500 ml de medio LB (10g triptona, 5 g de extracto de levadura, 5 g NaCl por litro, pH 7.4) con ampicilina (100 µg/ml) e incubado en agitación constante (250 rpm) a 37°C, hasta el crecimiento exponencial de las bacterias. El precipitado de bacterias obtenido por centrifugación a 9,400 g durante 10 min se resuspendió en 25 ml de una solución 10 mM de EDTA, 50 mM de glucosa en 25 mM de Tris-Cl (pH 8.0) a la cual se le agregó lisozima a una concentración final de 4 mg/ml, y se dejó incubar durante 30 min a 0°C. Las bacterias se lisaron al añadir 50 µl de 0.2 M de NaOH en 1% SDS e incubando a temperatura ambiente (TA) durante 5 min. Los fragmentos celulares y una gran parte del DNA cromosómico se precipitaron en acetato de sodio 3M pH 5.2, se dejó reposar sobre hielo durante 1 h y se centrifugó a 9,400 g durante 30 min. El plásmido se precipitó añadiendo 112.5 ml de etanol absoluto al sobrenadante e incubando toda la noche a -20°C. El precipitado conteniendo el DNA plasmídico se colectó por centrifugación a 16,000 g durante 20 min lavándose dos veces con etanol al 70%. El DNA purificado se resuspendió en 6 ml de agua estéril, y se incubó 1 h en presencia de RNasa 10 mg/ml a 37°C. Para eliminar la RNasa se extrajo con fenol-cloroformo y nuevamente se precipitó con etanol. El DNA del plásmido puro se resuspendió en agua o TE y se determinó su concentración con el espectrofotómetro.

Extracción y purificación del RNA total de T. solium

El RNA se purificó por el método del Trizol (TRIZOL Reagent, Life Technologies Gibco BRL). Grupos de veinte cisticercos congelados a -70°C se pesaron en una balanza analítica para luego molerse con un mortero y nitrógeno líquido hasta tener polvo fino. El polvo resultante se resuspendió en Trizol (1 ml por cada 50-100 mg de tejido) y se incubó durante 5 min a TA para permitir la disociación completa de los complejos de nucleoproteína. Se agregaron 0.2 ml de cloroformo por cada ml de Trizol y se dejó incubar a TA durante 3 min. Las muestras se centrifugaron en microfuga a 11,750 g durante 15 min a 4°C y la fase acuosa se transfirió a un tubo limpio. El RNA se precipitó con isopropanol (0.5 ml por ml de Trizol) a TA durante 10 min y el precipitado se colectó por centrifugación durante 10 min a 4°C. El precipitado se lavó una vez con 1 ml de etanol al 75%, y se centrifugo a 8,000 g durante 5 min a 4°C, secando brevemente a TA. El RNA se disolvió en agua libre de RNAsas (solución 0.01% dietilpicrocarbonato, DEPC) incubando 10 min a 55°C. Para eliminar por completo cualquier contaminación con DNA, el RNA se repurificó siguiendo las indicaciones del protocolo de

limpieza del sistema RNeasy mini protocol for isolation of total RNA from animal tissues (RNeasy QIAGEN) y se cuantificó en el espectrofotómetro. La integridad del RNA se verificó sometiendo a electroforesis una alícuota en un gel de agarosa.

Cuantificación del RNA y DNA. Determinación espectrofotométrica de su pureza.

La concentración y pureza del DNA y RNA se pueden determinar midiendo su absorbancia a 260nm (A_{260}) y 280nm (A_{280}) en un espectrofotómetro. La absorbancia a 260nm mide la concentración de los ácidos nucleicos y debe ser mayor a 0.15 para asegurar que sea significativa. Una absorbancia de 1 unidad a 260nm corresponde a 40 μg de RNA por ml ($A_{260}=1=40 \mu\text{g/ml}$) ó 50 $\mu\text{g/ml}$ de DNA ($A_{260}=1=50 \mu\text{g/ml}$) (Sambrook et al. 1989). Esta relación es válida cuando la muestra se encuentra resuspendida en agua. El cociente entre los valores de absorbencia a 260 y 280 nm (A_{260}/A_{280}) da un estimado de la pureza de los ácidos nucleicos. El DNA se considera puro cuando el cociente es igual o superior a 1.8, mientras que el RNA puro tiene un cociente mayor a 2.0. Las medidas se llevaron a cabo en un espectrofotómetro GeneQuant *pro* RNA/DNA Calculator (UV/Vis Spectrophotometer, amersham pharmacia biotech).

Electroforesis en agarosa

Se prepararon geles de agarosa al 1% en TBE (54g Tris base, 27.5g ácido bórico, 20 ml EDTA 0.5M pH 8.0, concentración final 5x) ó TAE (242g Tris base, 57.1 ml ácido acético glacial, 100 ml EDTA 0.5M pH 8.0, concentración final 50x) a los cuales se les agrega 1 μl de bromuro de etidio (10mg/ml) por cada 10 ml de agarosa. Los geles se corren a voltaje constante (75 V) en un tanque de electroforesis conteniendo el buffer respectivo de TBE o TAE. Los ácidos nucleicos se visualizan con luz UV.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Las reacciones de la PCR se prepararon en un volumen final de 50 μl con 1 μl de cada oligonucleótido 10 μM , 5 μl amortiguador de PCR 10x (200 mM Tris-HCl pH 8.4, KCl 500 mM), 3 μl MgCl_2 25 mM, 2 μl dNTPs 10 mM y 0.5 μl Taq polimerasa 5 u/ μl . La amplificación se llevó a cabo con rondas de 35 ciclos de PCR, con un primer ciclo a 94°C durante 1 min, seguido de los ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 seg, de unión del oligonucleótido (annealing) a 55°C durante 2 min y de extensión a 72°C durante 1.45 min. Al final de los ciclos se realizó una extensión final de 5 min a 72°C. En algunos casos, la temperatura de unión del oligonucleótido pudo variar según la temperatura óptima para la pareja de oligonucleótidos utilizada. Los

productos de las reacciones se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1% en TAE y se purificaron por afinidad a polvo de vidrio, siguiendo el método de Vogelstein y Gillespie (1979). Se cortó la región del gel que contiene el fragmento de interés y se colocó en un tubo eppendorff (1.5 ml) al cual se le agregaron 500 μ l de una solución de NaI (90.8 g NaI, 1.2 g Na₂SO₃ en 100 ml agua), 2 ml por cada gramo de gel, y se incubó a 55°C hasta disolver el gel. Se agregaron 2 μ l de una suspensión de polvo de vidrio, se mezcló vigorosamente y se dejó incubar 1 h a 4°C. El DNA-polvo de vidrio se colectó por centrifugación y al precipitado se le agregaron 500 μ l de la solución de NaI. Se agitó para resuspender completamente, se centrifugó durante 30 seg a 14,000 rpm y se descartó el sobrenadante (SN). Se agregaron 500 μ l de buffer de lavado frío (50% EtOH, 0.1 M NaCl, 10 mM Tris pH 7.4, 1 mM EDTA) mezclando vigorosamente y se centrifugó nuevamente, repitiendo este último lavado tres veces más. El DNA se secó al vacío a temperatura media durante 5 min y se resuspendió en 20 μ l de agua estéril. Adicionalmente, se purificaron otros productos de PCR utilizando el Wizard PCR preps DNA purification system (Promega), siguiendo las recomendaciones del proveedor.

Oligonucleótidos

En el cuadro 3 se enlistan los oligonucleótidos utilizados en este trabajo, mientras que la Figura 10 muestra su localización sobre la secuencia de la paramiosina.

Digestión del DNA con endonucleasas de restricción

Las digestiones de DNA se realizaron en las condiciones estándares para cada enzima usando la relación de 1 unidad de enzima por mg de DNA. Adicionalmente, se utilizó una modificación del ensayo de restricción para verificar rápidamente la presencia de insertos dentro de distintos vectores. Para esto, se preparó una microreacción de digestión a un volumen final de 20 μ l. La digestión se expuso durante 10 seg a temperatura media en el horno de microondas con intervalos de reposo de 2 min. El proceso se repitió 6 veces, se agregó colorante de corrida e inmediatamente se analizó en geles de agarosa.

Cuadro 3. Secuencia de los oligonucleótidos sintéticos utilizados

Nombre	Dirección	Secuencia
<i>Región río arriba del codón de inicio</i>		
Rev 4	→	5'-ACAGTAATTTGGGGGTGG-3'
Rev 3	←	5'-GCTGTGTTCCGTATCACCTA-3'
X0	→	5'-CCGGATCGTGCGGCAG-3'
Rev 2	←	5'-GCTGTACGCACGATCACA-3'
Rev 1	←	5'-AGTCACAGGGAAAATTCG-3'
Rev 0	←	5'-CGCGTATGATGGTACGAG-3'
<i>Tercio amino</i>		
X1	→	5'-ATGTCTGAATCACACGTC-3'
In1	→	5'-TAGCCTGATGCATTGCTT-3'
In3	→	5'-TTTCCGTTAAGAGTCGCGT-3'
In6	→	5'-GTCCTTGAATAATTGTTTCG-3'
In4	←	5'-GTGTGAGCCTGATGTGAC-3'
F	→	5'-GCTCGCGTCCGGGCTG-3'
F'	←	5'-AGTACCACTCAATTCGTC-3'
D	←	5'-GGTGAGCTTGGAGAAATCTG-3'
E	→	5'-GCGCAAGGATCTGGA-3'
E'	←	5'-GTGGCCTCGGCAGTTTCG-3'
In2	←	5'-GCCATGCATGCTTGTGTT-3'
H'	→	5'-TAGGGCAGAGAAGGAC-3'
G	←	5'-GACCAAGAACGTTATCG-3'
G'	→	5'-GTCAACTTGATGGCGCTTT-3'
N	→	5'-TTGGACAGCCAGCTG-3'
N'	←	5'-CGCGTCAGCTGGCTGTCC-3'
X6	←	5'-ATTCCGGCTGCCTCG-3'
<i>Tercio central</i>		
X4	→	5'-CTGCGCAACCAAGTTGC-3'
B	→	5'-CAACCTGGAGAAGACC-3'
J	←	5'-TCAGTCGACGATTTCG-3'
C	→	5'-GAAGGAGATGGAAGCG-3'
K	←	5'-TAGCTCGCTGATTGT-3'
X7	←	5'-GTTGACGTTGCTTGT-3'
<i>Tercio carboxilo</i>		
X5	→	5'-CTCAACCGCGAGAACA-3'
I	←	5'-CATTGGTAAGAGTGT-3'
H	→	5'-GGCTGATGAGCTGCGA-3'
Q	←	5'-CTGTTCGAGCTCATCAGC-3'
L	→	5'-GCGCAAATACGAGCG-3'
M	←	5'-CGTTTATCATCCTCGC-3'
X2	←	5'-CTACATGATGCTGGTTGC-3'
<i>Región río abajo del codón de terminación</i>		
X2 BIS	→	5'-GCAACCAGCATCATGTAG-3'
DWS1	→	5'-ATGTCTCTGCTGCCAACTCA-3'
DWS2	←	5'-GTCCCACTCCCTGCCTCT-3'
<i>Oligonucleótidos para 5'RACE</i>		
Race1	←	5'-GCCTCGGCTTCCTCCTCGTAAC-3'
Race2	←	5'-CGACAACTGTGTTTGAAGGCTTAGG-3'
Race3	←	5'-GCCCTGCCCTTCTGCTTCTG-3'

Localización de los oligonucleótidos sobre la secuencia completa de la TPmy.

1	GGTAATTACT	TTCATACCCG	CGGGACAAT	TGCCATAATA	TTCTGTCGTT	TTTCAAGCCC	CCATTGCATT	AAGGTATATT	
81	GCTTCACGGC	CTGGAGATTA	ACAGTAATTT	GGGGTTGGGA	AAGGAACTTT	AATGAAGTT	TTCTCTCAGT	TAACAGAGAC	REV4
161	TGCCCCAAAT	CGCGGGTCAA	AAFCGAAATT	GTACCTTTCA	TGCCAGTGAA	AGAATTGACT	GTAATGGAT	TAATTAACG	
241	TGAGCAAGTC	CTTTTCCOCT	TCCTACCAA	AAAAGCTCTA	TTTTATGCTT	CACATTATGAT	TGGTCATAAC	ACCTAACCGA	
321	CTTGGTGTCA	CTCTTGATAC	TACTACTAGC	TTGTTTTGCT	ACTTTTGTCA	TCTTTGGTGC	CTGACAATAT	TTCACTCAAC	
401	ATGTTTCACT	AATAGCATAA	GGAACTCTTT	TCTTTTGAAC	AAAAATGGGA	GTTTTCAACT	TTAATCTTC	ACTGTGCATT	
481	TCCCAAAAG	CCACGGAAAG	GTCTGCTTCA	AGCGAAGTTG	ACAGTAGCAA	GTGCAGTCTG	AAGCTCTCTA	ATGTGGAGG	
561	GGCACATGGA	TTGAGGTGAG	TGGATGCATA	GGCAAGTGTC	GCCTAGGTGA	TACGGAACAC	AGCTACACCC	TGTTTCTGAA	REV3
641	TTTAAACAGT	CACGCCACA	GTGCACGCC	CATCCAATGA	GGCACAGCAA	GTGTGAGTTG	AAGGAGAATG	GAGGGGGGTG	
721	ATGCTTAAAG	CGCCAAGTAA	ATTAGAATTG	GTCTTCAGTA	TGTAGACCAC	CTCGAGGTAA	GGGTAGACCG	CATTTAACAG	
801	TCCACTTCGA	TCCTACTFTC	CCAAAATCAA	CCCTCTTGTG	TGACTGTGTT	TAGAAACCAT	CTGCCTGAT	GATAGAATG	
881	ATGGCAATTA	AGGGGTTGGG	GCATCCCTCC	GAGGTGCTGA	ATATCACAGT	CATGGCATTG	GGCGGGTGTG	CGTGTGTGCA	
961	CGTGTGTGTA	TGCGGGCTTT	TGCGGCGACG	ACACTGGGGC	ACCAATGTGC	GACAAGCTAC	CCATCGATG	GAGGGGGGTG	
1041	TCACGCCCTGT	ATGCGCCGGA	TCGTGCGGCA	GTGCTGCACA	GTGTGATCGT	CGCTACAGCT	TTATCGATT	GCAGTGGAAC	X0/REV2
1121	GGGCAGTGT	TTGGGGCAAT	CGGCCAATGG	GAGAGGAACG	CGGATTTCTG	ATAAAGTCTG	GTATTGGCCG	GGCCGACGGG	
1201	CAGATTGTAC	GCATTGGCCG	AAATAGGCAG	ACGTGCACGC	CACTACACTC	CATCCAGGAC	TCGTTCTCGC	TCTCCAGCTT	
1281	TTGATACCTG	TCGACCGGTT	GTGTCTCTC	CAATGAGGGC	GACTACAGCT	TAACTTTCCA	ATTTCCCTG	GACCTTCAGT	REV1
1361	GACTAGGAAA	GGAAATTTCT	GAGCGGTGCG	ATTCAATGTA	GAATCCGGTC	CGTTTTCTGA	CTTTCGAATC	TACTTACAGC	
1441	ACACAACCAA	TCCATTGGCG	AGCTGCCGTG	ATTCACACA	AAACGGGACC	TATCAGAGAC	GAAGAC		X1
1521	CAAAAAT	TCCTGTACCA	TCATACCGCG	GACTTCCCCA	AGTACTGTTT	GACTGTGAGT	ATTACCTTTC	TACATCTTC	REVO
1601	ATCTCACTTA	TGTTTGTGGT	TTGAAAATAGT	TTTAGACTTT	TTAAATGGCG	TGATGAAAAC	FGACTGCTTA	ATTCACGTC	
1681	TCTGATAGTT	CGTTGCTTTC	GTGATTCTAG	ATATTGACAC	TTTTTACCGA	TTGATTACTG	CCATATGGAT	CTAGCCGTAT	In1
1761	GCATFGCTTA	TAACCGCCTT	ACATTCAAAA	ACGGGGTCAA	ACAATCTGAT	CTGATAGACC	AAAACCTTAT	TCATTTATTG	
1841	CCCTCAGATG	AAGTGGAGTC	TTCACGGCTC	TAGTGGTAAA	TAGATCAAAC	TATGTGATAA	AGCTAAGAAG	TGATGGCTTC	
1921	ATAAATACAT	GGTFCGAGTT	AAFTTTGCAT	TTTTTTCCGT	TAAGATTCGC	GTACGAGAAC	TGGAGGACCT	GCATCGATC	In3
2001	GAGCGAGATG	CTCGCTCCCG	GGTATGATT	TTCAATTTGC	ATTATTATTT	TTCTGGGATC	CGATTGCCTG	TGCCTTTAAA	
2081	ACGTATTAAA	AATCGATGGC	CTACTATCAT	ATCACACACT	GTGGACAATA	TAATCGCAAA	ATTCATTTCA	TTTGCTTATT	
2161	TTGTCTGAAT	AAGTGGGCAC	TGACAGACTC	TGGCAACAAT	AAATGTCTCT	TGGAAATAAT	GTTCGTGGAC	GCATGGAAAC	In6
2241	TCATTGATGT	GGTCAACATG	GGCTCACACG	TTTTTTCCCT	CTAAGCTTGA	ACGCAATGCC	AACGAGATGA	GCATTCAGCT	In4
2321	GGACACATG	CGTGAACGTC	TGACCGAATT	GAGTGTACT	TCCTCTCAGA	CTGTAAGCTA	AGTAATTTT	AAATTAACAA	F
2401	AAATTCGAT	GAGATATTTA	CTGTATTFTA	AATCAACATG	GCAGATTTCA	TTCATTTGAT	CATAACATAG	CGCAAAATCAA	
2481	GATTTAAGGT	CGTTTGGTGC	AGTGGCCTCT	TTAATGAAAA	TGGGTGGTTT	ATTTGCAAGC	GGAGTTGGGC	TTGGATGTGT	
2561	AATCAATGGG	TACTGAAAAG	CAGTACTTAC	TATTTATTAT	TATTTATTTT	GAATACCTTG	AAACTGACC	TTGCTGTGG	
2641	TCTAGGTAGC	TAATATGAAG	GCCTGCGCGC	TGTGTGCACT	GCCAACACAT	GAAGGTGAAG	CCATACTTAG	GCACGTAGGA	
2721	TGGACTGACT	TCTGGATGCA	GATGTGACTT	TCAGACATTC	ACTGACGAAT	GAATATATGT	TGGACTTGGT	GGGTAACCTG	
2801	AAAATAGCTA	CCATGGCCAG	TTTTTGCTAG	GTTTTTTCCG	AAATGAAATG	GGATGGGGTT	CAGCACTAAT	TGGCTTCCCT	
2881	CAATFATCTT	TTAATGGGCC	CTGAAATFCA	GATTTCTCCG	AGCTACACCC	TTATCTCCCA	GTTTTTGCCAG	CAGTTCCAGG	D
2961	AAGATGACAG	AGTGTGAAA	TCGAAATFCA	ACCTTTTAT	TCGGATCAGC	AAAGAGGATT	TCAAATGGCA	TCTACCGGTA	
3041	TTTAAACAAA	GTTCGGATAA	CAACGTAAAG	ATAGGGACTC	GTTTGTTFCG	ACAGTGTCTT	TTCAATGACA	GCTTACTTGA	
3121	TAAGAGCTGA	CGTATGACGA	AAGCGTTTGC	CGAAGTCTG	TTTTTTTCCG	CGCTGTCCTA	CAGCAGCTAG	CTATTCGCCG	
3201	TAAGCATGAT	GAGATCTCGA	AGCTGGCGAA	GACTCTGAAA	AATGCCAAGC	CTGCTTTCCG	AACTCGGTGC	GGCACTTGC	E/E'
3281	CCCGCAAACA	CACACCATG	ATCTCCGAGA	TCTCCAGCGA	GGTTGGAAT	TTGCGAAGC	AGAAGGGCAG	GTAAGTCTT	RACE3
3361	CTGCGCCCTT	CTCTTCTCT	GCTCCTTGTG	TGAGATCCTT	CAAAGTAAT	GTTGAGACTT	TTGCCCAATG	AGAACACAGT	
3441	GTGCTAACAC	CTTAGAGGTT	AGCGAGCTGA	AGGTCATATT	GTAGATFCCA	GAATCTGTAG	TGGAAACATT	GGAAATTTA	
3521	AAAATATCAT	CCAGTACATT	TTGAAGAAAT	TAGCAATGTT	ATTTTTGAGG	ATGTGAAACC	CACAAATCTG	GATGGGCTC	
3601	TAACACAAGC	ATGCATGGCA	TGGGTAGTTT	TAACAGATCT	ATATGTACAC	AGGATAGAGA	TACAGGATTT	ATGCGTAGTT	In2
3681	AAACGTGAAA	TCAGGGCTGA	AGTAATTTAG	CTTACAATTT	TTGGTTTTTT	AGGGCAGAGA	AGGACAAGAG	CCAGCTCATG	H'
3761	CTTGAATCA	ATAACGTTCT	TGTTCACTT	GATGGCCTT	TAAGAGCCAA	GGTAAATTTT	CTTCTTTTTG	TATCAAATTT	G/G'
3841	TTGTCTCAAG	TGCGCATTAA	ACTCCTCTT	ATTTAAGCAG	AAAGGCATAG	TTGAAATCCAC	TTGAAATGAT	GCATCAATTC	
3921	ATGAGGGGGG	ATGAAACATAT	TGTTAGTGG	TATTAATAACA	TACCCTCAG	CTTCTCAA	TATCAGGGCA	ATGGTAATGA	
4001	AGTTTGTGTC	CGGAAGTGAA	ACTGAAACAG	GTGGAATTGG	AAAAAAGTG	TTATTTTGTG	TCATTGAGA	AGTTCTATG	
4081	GCTAAACTA	CGTTCGAGA	ATGCACAGT	CGGAATTATT	TGCCCCGTTG	CATTAAGTAT	TGAATCGATT	TGATGCGCTG	
4161	ATATTGTTCG	CATTTCCGTT	TTAGCCCTCA	CGCGAGAGCA	AAGCTGGAGG	CTTGGACAGC	CAGTGTGAGC	GCTTGAAGC	N/N
4241	CGTGACCCG	GATCTTCAAC	CGCAAAATGG	CGACGCTAAC	CTCGCAAAGT	CGCTTTGGC	CGCAGAGAAC	TTCGAATGG	
4321	TTGCGGTAAA	TCAGGAGTAT	GAAGCACAG	TCGTACACTT	CTCTAAGACA	AAGCCCGCTC	TTGAAAGCCA	GCTGGATGAC	
4401	CTTAAACGGG	CCATGGATGA	AGATGCACGC	GTAAGTGCCA	GTCTACACAT	TAGAATTTGG	AGATCGCCAG	CCACACCTTT	
4481	CTATTGCTTT	GCTTGTCTCT	GTAGAATCCG	CTAAGCTTTC	AAACACAGTT	GTGAGTCTG	CAATGGGAT	ACGACAACCT	RACE2
4561	GCAAGCACET	TACGAGGAGG	AAGC	CAAAATCCG	CAAAATCCG	CAAAATCCG	ATTCAACGCC	GATATGGCTG	RACE1,
4641	CCCTCAAGAC	CCGTCTTGG	AGAGAACTTA	TGCCCAAGAC	TGAAGAGTTT	GAAGAAGTCA	AGTAGGTTCT	TTTTCATCTT	X6/X4
4721	CCTCCATCTC	TCGTTTGAAT	TTGTATTGAC	TTTTTTCCGG	TGATGTGACA	TAGCTGAAAT	GTGCCGATCA	ACCCCAACTC	
4801	CTTCTTGTAG	ACGCAAGCTG	ACTGTTCCGA	TTACCCAGTT	GGAGGATATG	CGCTGAACAT	AGCGCAGCTG	TGCCAACAAC	B
4881	CTGGAGAAGA	CCAAAGTTAA	GCTGACTCTT	GAGATCAAGG	ATCTACAGGC	TGAGAACCGAG	CGCGTAGTGT	CCCGCAACGT	
4961	CATCTGAAAT	AAGTTTAAAT	CCTAAAGAAA	TCATATCAA	CAAGTTAACT	GAATGGATGT	AATCGAATGC	ACAGTTCTGA	
5041	ATGGCAGGAG	GCTCGGTTGT	CTTTCTGTAG	TATAATCGTT	AGGTGAACAT	TGAATAATAA	GGTGGAAATG	TTCTCTCTTA	
5121	CAGAATCTG	ATTTCAATG	TCTCATTTA	CCCGTCTTTT	TGATTTTTAA	AATCCCTTGA	CAGTTGGCAG	CAGAGAATG	
5201	AGAGTTAAGC	CATCGGGCGA	AGCAGGCGA	GAACTTTGCC	AATAGGCTGC	AGCCTCGAAT	AGCAGAGATG	ACAGTGAAAA	
5281	TCAACACCTT	CACTCGGCC	AACAGCGCTC	TAGAGGCGGA	CAACATGCGC	CTCAAGGGGC	AGTTCGGTGA	CCTCACGGAC	
5361	CGCATCGCCA	ATCTCGACCG	CGAAAACCGC	CAACTTGGCG	GTACGGTTTT	CTCATAATTC	ATTAATCTTT	AGTGGCAGTT	
5441	ATGATGGCAG	AAAAACTCA	TAACTTTTGT	GGATTCACT	AAACGCATT	ATGTTCACTT	TTCTCAGGG	AAAAGCAATA	
5521	GGCGGGGAAG	AAAGCTACC	CAAAATGTTT	GTCTGTAGT	CGCACAAGAG	ATGCGCCAGT	TTGCAATGTT	AAGCGTTGGA	
5601	GTCAATTTGT	TCAAATTTT	TATCCAAAAG	CTACAACAGA	ATATTTACCT	CACGCATATT	TTAGCATAGC	TGCTTATTCT	
5681	AGGTATTAA	AAACCAATTA	AGACCATTG	GACCTTAAAT	CGGCAATCAA	CCTGGCAGTG	AATAACCAA	TAGTTTTTTT	

TESIS CON
FALIA DE ORIGEN

5761 TATTATTTTT TTCCTTTTTC TCCCTACAAC CATCCACAGA TCAACTGAAG GAGACGAAAT CAGCCCTGCG TGATGCGAAT J
5841 CGTCGACTGA CCGATTGGGA GGCCCTGCGC AGTCAGTTGG AGGCAGAGCG TGACAACCTC GCCTCTGCTC TCCATGATGC
5921 TGAGGAGGCA CTGAAGGAGA TGGAAAGCGAA GTACGTTGCC TCGCAGAACG CTCTTAATCA CCTCAAGTCC GAGATGGAAC C
6001 AACGCTGCGG TGAGAAGGAC GAGGAAGTGG AGAATCTGAG GTCAGTCAATC TTCATATATT TCACTTTACT GATTCCAGT
6081 AAGTATCCAT AGGTAAGA GTAGTCTTTT GATCTTTTAA AACTAAATAT CAGCGTTATC TGGTCCCTCC AAATGGTTGT
6161 CGTTTAGAG TCATAAGTAT AATTACGCAA ATTACTCCTA GCTCGTAAAA ACCAAAATTT GGAACAGG GTTTGGGTTT
6241 TATAAGTGA ATTAAGAGGT GTGCTGTGGA TATTGATGTT TTAGAAAGAG CACGACTCGC ACGATTGAGG AGTTGACAAC
6321 CACCATCTCA GAGATGGAGG TTCGCTTCAA GTCGGATATG TCTCGTCTGA AGAAGAAGTA CGAGGCGACA ATCAGCGAGC K
6401 TAGAGGTGCA ACTAGACGTG GCGAATGAGG GAGGAGGAGG GAGGAGGAGG AAA CCCTGGCTCA ACGAGTTCAA X7/X5
6481 GAGCTGCAGG CTGCGTTGGA GGACGAGCGA CGAGCTCGCG AAGCTGCAGA GAGCAACTTG CAGGTGAGCG AGCCGAACG
6561 CATCGCCCTT GCTTCGGAAG TGGAAAGAGT TCGCAGCCAA CTGGAACTCA GTGACCGCGC TCGCAAGAAC GCCGAGTCCG
6641 AACTCAACGA TGCCAATGGA CGTATCTCGG AGCTCACCCCT ATCGGTCAAC ACTCTTACCA ATGACAACCG TCGACTTGAA I
6721 GGCGATATTG GCGTCATGCA GGGCGATCTC GATGAGGCCG TCAATGCGCG CAAGGTATCA ATCATCTTTA ATAATCATGT
6801 TCTTTGAACT CTAAATAGTA GTTAACCTAA AATGGATCTG CATCGTAAAG GCTGCTGAGG ATAGAGCTGA CCGTGGGTAAC
6881 GCTGAGGTAC TCCGCCGTCG TGATGAGCTG CGACAGGAAC AAGAAAATTA CAAGCGTGCT GAGACTCTGC GCAAGCAACT H/Q
6961 TGAGATCGAG ATCCGTTGGA TCACGGTCAA GTTGGAGGAG GCTGAGGCTT TCGCTACTCG TGAGGGTCCG CGTATGGTTC
7041 AAAAGCTCCA GGTAGACCT CCCTGTCTCG GATCGCCTTA AAGTGTGTTG CAAATGCTAA GTGCTATTTT TTCTCTTTA
7121 CCATTAGAAT CCGGTTGAGG AGCTTGAGGC GGAGTGGAC GTCGCGCCAA GTGAGGCTTC GCGCAACCG L
7201 GCAAATACGA GCGTCAATTC AAGGAAGTGC AGACACAGAG CGAGGATGAT AAACGCATGA TTTTGGAGCT TCAAGACCTG M
7281 CTAGACAAGA CTCAGATCAA GATGAAAGCC TACAACCGT AGCTTGAGGA ACAGGTGCAG TGCTTAACCT AAGTTATAAG
7361 GTATATGAGA GTGTAGATTG STACTGACGC GAGAAGCTTTA TGCTGTGCT ATAGGAAGAG GTGTCTCAGC TGACGATGAG
7441 CAAGTACCCT AAGGCGTAGC AACAGATTGA TTTTATGTA TAGAAATGTT TCAGAAAAAG TGCTGTCTC TCTCTGTTT
7521 GGACAATTGG TGGACCCGGT TCCCGCGCCG TTTCCGGTGT TCGGGAGATC AACAGTGTCT CCCGTGGTAA CCGT X2/X2BIS
7601 ATGTCTCT AAAAGGGCAG AACTCGTGAC TTTTCTTAGC CCTTATCCA CCCAGTCC CCTCCCATCC
7681 CTACCCTTCC AGCACACTCT TTTCCGTGCT TACGTCCGCA TAAACCCATA TACTATTCAA AAGGAGGAGG AGGGGCAGGG
7761 TAATGAAAGA GAAAGAGAGC ACCTCTGTG CATGCCCTAT GCCGTCCCGT TCTACTTTGC TTTTCTCAAC TCTGCCCTC
7841 CTCCCTCCTT TGTTCAATTC GCGTTTTTCT TCTCTCTCC ACCATCGTCC GTTCTTCCCC TTACCTGAAC TGTTCCTGCC
7921 GCCACAGAAG ACTCTAGGGT GTTTTCTCTA CCACCTGCTAC CACCTAAGCA GGTGGCTTCT TGCTTTCCAG TCGCGAGTTT
8001 GCCCCACCTC TTCTCCCTAT TTCAGTTTGC GTTTATTGTA ATGTCTCTGC TGCCAACCTA ATCAACACCA CTGCCACCAA DWS1
8081 CGCTGCCACT AACACTCTTG AGTTGTTATG TTTTATGTA TAGAAATGTT TCAGAAAAAG TGCTGTCTC TCTCTGTTT
8161 TATTATGATG TGCCATTGAG GCGCGAGTTG TTTGGCCCTT AACACCTTGC CTCCCAAAGG TGTGTACAGG ATCAATGCC
8241 TATTGTGAGA TGATCGACCC AGATCCGCCT ACCTTTCAG AGTTGCGCAG TTTGTCTGCA AGACTCTATG AGAAGCAGAT
8321 AAGCGATAAG TTTGCTCAAC ATCTTCTCGG GCATAAGTCC GACACCATGG CATCACAGTA TCGTGATGAC AGAGGCAGGG DWS2
8401 AGTGGGACAA AATTGAAATC AAATAATGAT TTTATTGTA CTGATAGTGA CCTGTTGCT GCAACAAAT GATAAGCAAT
8481 GCTTTTTTAT AATGCCAACT TAGTATAAAA AAGCAGGCTT CATCCGGATT CTCTGAGCCC ACCGTGTTCA CCACCACCTG
8561 GGTGCTGTTA CGTCTGGCTT TCAGCTGAAT GGTGCAGTTC TGACCGGTTT TCCTGTGCC

Fig 10. Los oligonucleótidos se muestran subrayados en amarillo, los que delimitan los tercios de la paramiosina se muestran en verde, los utilizados para el 5'RACE están subrayados y se diseñaron sobre la región codificadora (sin intrones). Los codones de inicio y terminación están en rojo, y la secuencia en gris pertenece al fago lambda Syrix. Los intrones se muestran con letras azules.

Análisis por Southern blot

TRANSFERENCIA Los fragmentos de PCR se separaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1% en TAE a 0.15 V/cm durante toda la noche. Posteriormente el gel se colocó en una solución 10 ml HCl en 460 ml de agua durante 10 min, se enjuagó con agua destilada y se incubó en una solución desnaturalizante (NaOH 0.5 M, NaCl 1.5 M) durante 40 min a TA. Después de eliminar completamente la solución desnaturalizante, se neutralizó con una solución de Tris HCl 0.5 M (pH 7.2) y NaCl 1.5 M durante 30 min a TA. El gel se colocó en una charola que contenía 6 hojas de papel Whatman 3MM saturadas en 20xSSC, y sobre el gel se coloca cuidadosamente una membrana de nylon. Se agregaron sobre la membrana, 8 hojas más de papel Whatman del tamaño del gel, se selló alrededor del gel con Kleen Pack, se agregaron varias capas de papel absorbente y peso, dejándose transferir durante toda la noche (Southern 1975, Sambrook et al 1989). El DNA se fijó mediante exposición a luz UV (120 milijoules/cm²) y la membrana se colocó en una

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

bolsa de plástico a la cual se le agregó una solución de prehibridación (SSC 5x, Denhart's 5x, SDS 0.5%, 100 µg/ml DNA de espermatozoos de salmón y formamida 40%), y se dejó incubar toda la noche a 45°C ó 65°C.

HIBRIDACIÓN. La hibridación se llevó a cabo a 45°C o 65°C durante toda la noche en una solución SSC 5x, SDS 0.1%, DNA de espermatozoos de salmón (100 µg/ml) y formamida 40% y se utilizó la construcción vw 7-3 como sonda. La membrana se lavó en una solución que contenía SSC 2X una vez a TA durante 5 min, tres veces a la temperatura a la que se llevó a cabo la hibridación (15 min cada lavado) y en SSC 1x a 37°C durante 60 min. Finalmente, se expusieron placas de rayos X (X-Omat, Kodak) a los filtros radiactivos, en presencia de una pantalla intensificadora durante 24, 48 ó 72 hs a -70°C.

PREPARACIÓN DE LA SONDA. En vista de que el plásmido pRSET VW7-3 contiene la región codificadora completa del cDNA de *T. solium* insertada entre un sitio *EcoRI* y *HindIII*, su digestión con estas enzimas da como resultado dos fragmentos que corresponden a la región codificadora de la paramiosina (2.6kb) y al plásmido (2.9kb) (Figura 11).



Fig 11. Digestión del plásmido pRSET vw7-3 con las enzimas *EcoRI* y *HindIII*. pb, pares de bases, M marcador de peso molecular 100bp, P plásmido pRSET vw7-3 digerido. La flecha indica el fragmento de 2,600 pb que corresponde a la región codificadora completa de la TPmy.

El fragmento de 2.6 kb se amplificó por medio de PCR utilizando para ello la pareja de oligonucleótidos X1 y X2 (Cuadro 4) que se encuentran situados en el extremo 5' y 3' respectivamente de la región codificadora. El producto de PCR se concentró por precipitación con etanol absoluto y AcNa 3M (pH 5.2), se lavó con etanol al 70% y se secó al vacío durante 25 min. El amplificado se analizó en geles de agarosa en TAE, se recortó la región del gel donde migró la banda de DNA de 2.6 kb y se purificó por el método de afinidad a polvo de vidrio descrito antes. El DNA se calentó a 37°C al menos 30 min con el fin de solubilizarlo, se

centrifugó en microfuga 1 min a máxima velocidad y se tomó una alícuota para marcarla con radiactividad.

MARCAJE RADIOACTIVO DE LAS SONDAS

El fragmento de PCR que contenía la región codificadora completa de la TPmy (sonda vw 7-3) se desnaturalizó a 100°C durante 10 min e inmediatamente se colocó en hielo. El marcaje se llevó a cabo por el método de oligonucleótido aleatorio (random primer) usando el Random primer DNA labeling kit (USB Corporation). Se prepararon reacciones con un volumen final de 20 µl que contenían 1µl de dTTP, dCTP y dGTP, 2 µl de buffer 10x con el oligonucleótido aleatorio, 1 µl de enzima Klenow y 3 µl α -³²P-dATP (6000Ci/mmol, Amersham International, PLC). Se incubó durante 25 min a 37°C y la reacción se detuvo calentando a 65°C durante 10 min.

Búsqueda de clonas con el gen completo de la paramiosina en la biblioteca genómica de T. solium

TITULACIÓN DE LA BIBLIOTECA GENÓMICA

Se hizo una dilución 1:50 de un cultivo nocturno de la cepa JF 242 en medio Luria-Bertrani (LB) con 0.2% de maltosa. Se incubó a 37°C durante 2h y se centrifugó a 4000g durante 10 minutos a temperatura ambiente. El precipitado bacteriano se resuspendió en un décimo del volumen inicial en MgSO₄ al 0.01 M estéril. Estas bacterias se infectaron con diferentes diluciones de la biblioteca genómica. La infección se llevó a cabo a 37°C durante 20 minutos. Posteriormente, las células se sembraron en medio LB sólido formando un tapete con medio LB top-agar (0.75%) y se incubaron toda la noche a 37°C. Al día siguiente se contaron las placas formadoras de lisio (pfl) y se escogió la dilución adecuada para llevar a cabo los tamizajes (Sambrook et al 1989).

SONDAS. Para asegurar que las clonas contuvieran al gen completo de *T. solium*, se prepararon dos sondas más utilizando la misma estrategia descrita arriba, con la diferencia de que estas nuevas sondas solo contenían la región codificadora del extremo amino (sonda vw 2-1) o la región codificadora del extremo carboxilo (sonda vw 4-1) respectivamente. Los fragmentos amplificados en ambos casos fueron de aproximadamente 800 pb (Figura 9B). Las sondas se marcaron con α -³²P-dATP por el método de oligonucleótido aleatorio según el procedimiento descrito arriba y se seleccionaron las clonas genómicas que resultaron positivas con ambas sondas.

TAMIZAJE DE LAS BIBLIOTECAS DE DNA GENÓMICO (GDNA) EN λ SYRINX

Los tamizajes se realizaron siguiendo la técnica de Benton y Davis (1977). Las bacterias se infectaron y sembraron en medio LB sólido como se describió previamente. Las cajas se

incubaron toda la noche a 37°C. Los fagos obtenidos en las pfl se transfirieron a membranas de nylon (Amersham International, PLC) por duplicado. Los filtros se trataron con una solución desnaturalizante (NaOH 1.5M, NaCl 0.5M) durante 10 minutos y posteriormente neutralizados con una solución de Tris-HCl al 0.5M (pH 7.4) y NaCl al 0.5M. El DNA de los fagos se fijó a las membranas por exposición a luz UV (120 milijoules/cm²). Las sondas se usaron en un tamizaje de aproximadamente 176,000 fagos en condiciones de alta (65°C, SSC 2X) o baja (37°C, SSC 6X) astringencia. Las señales de hibridación se detectaron por autoradiografía después de la exposición de los filtros durante 12-24 h a -70°C, con pantalla amplificadora. Las placas se recuperaron directamente de las cajas de Petri por succión con pipeta Pasteur colocándolas en 200µl de SM (5.8G NaCl, 2g MgSO₄•7H₂O, 1M Tris-HCl, pH 7.5, gelatina al 2% y agua a 1L). Los fagos se dejaron difundir durante 2h a 37°C y se guardaron a 4°C para su análisis posterior.

PURIFICACIÓN DEL DNA DE FAGO LAMBDA

Se infectaron células JF 242 en medio SOBm (bacto triptona 20g, extracto de levadura 5g, NaCl 0.5g para 1L) con diferentes diluciones de las distintas clonas aisladas de fago lambda hasta obtener cajas confluentes. Se agregaron a cada caja 5 ml de SM, y se dejó en agitación suave 1 h a 37°C. El SM se colectó de las cajas de Petri, se transfirió a un tubo cónico y se le agregó cloroformo (2% v/v) agitando vigorosamente. Se centrifugó a 12,000 g 10 min para eliminar la agarosa residual. El sobrenadante se procesó siguiendo las instrucciones del Qiagen lambda DNA purification kit (Qiagen Lambda System, Qiagen). El DNA purificado se cuantificó en el espectrofotómetro y su integridad se verificó sometiendo una alícuota a electroforesis en un gel de agarosa.

Amplificación rápida de extremos 5' de cDNA (5' RACE)

El sitio de inicio de la transcripción se identificó utilizando el método de amplificación rápida de extremos 5' del cDNA (5' RACE por sus siglas en inglés) (Frohman 1993). Este método permite amplificar fragmentos específicos a partir de un templado de RNA, entre un sitio interno definido y una secuencia desconocida en el extremo 5'. De esta forma es posible aislar y caracterizar los extremos 5' de mensajeros específicos. Para ello se utilizó el 5' RACE system for rapid amplification of cDNA ends versión 2.0 (Invitrogen Life Technologies). Se realizaron dos experimentos independientes, RACE-A y RACE-B. Para la síntesis de cDNA se utilizaron dos oligonucleótidos específicos para paramiosina (GSP por sus siglas en inglés), G y X6. A estos oligonucleótidos antisentido se les denominó GSP1-A y GSP1-B respectivamente. El cDNA se

purificó y, mediante una transferasa terminal deoxinucleotídica (TdT), se agregó una cola homopolimérica de citocinas (dC) al extremo 3'. El cDNA-dC se amplificó por PCR utilizando una mezcla de tres oligonucleótidos: uno específico para el gen de paramiosina que anida 3' con respecto a GSP1 denominado GSP2, un segundo oligonucleótido que anida 3' con respecto a GSP2 y que se denominó GSP3 y una combinación de oligonucleótidos específicos para la cola homopolimérica de citocinas (Figura 12). En el caso del RACE-A se utilizaron los oligonucleótidos Race3 como GSP2 y E' como GSP3. Para el RACE-B se utilizaron los oligonucleótidos Race1 como GSP2, y Race2 como GSP3. Para la cola dC se utilizaron los oligonucleótidos AAP y AUAP incluidos en el estuche comercial.

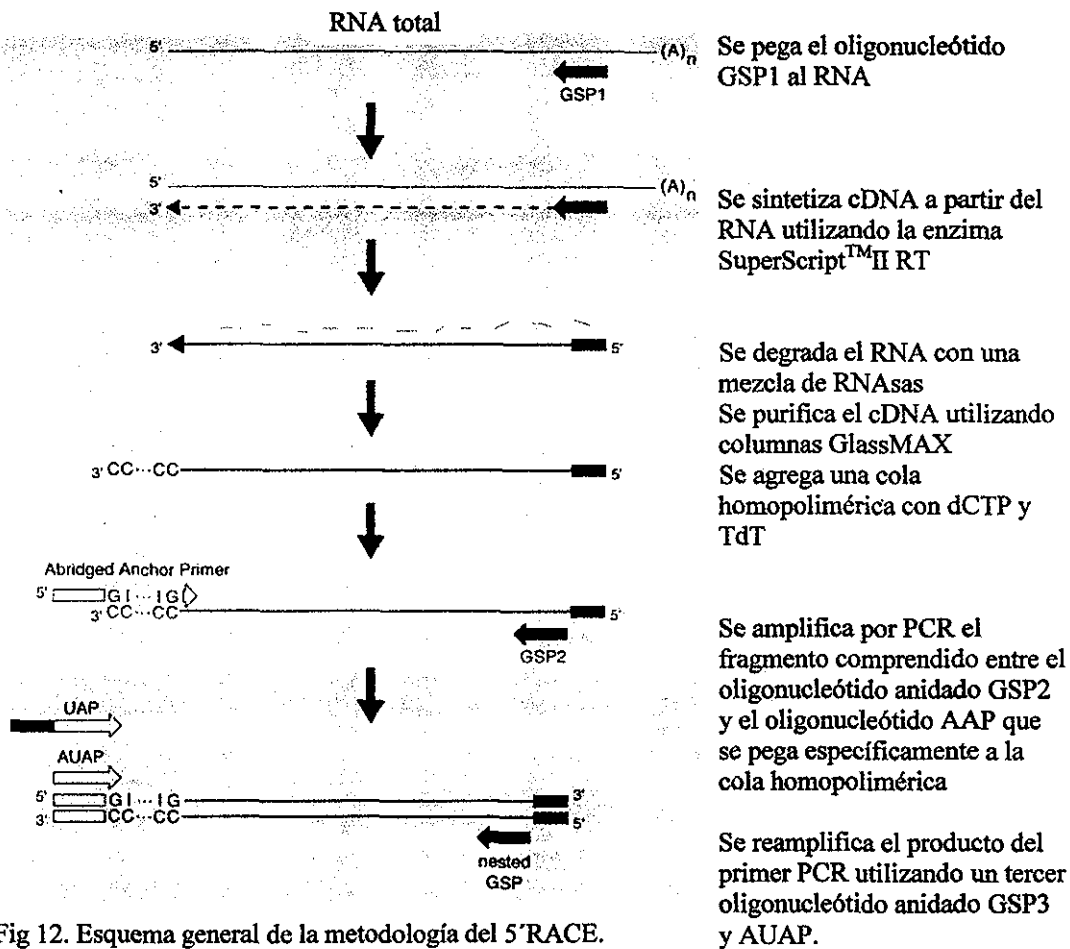


Fig 12. Esquema general de la metodología del 5'RACE.

SUBCLONACIÓN EN EL VECTOR pCR 2.1. Los fragmentos obtenidos por PCR en los ensayos de RACE-A y RACE-B se purificaron utilizando el Wizard PCR preps DNA purification system (Promega) siguiendo las instrucciones del proveedor para luego subclonarlos utilizando el TA Cloning Kit (Invitrogen) en el vector pCR2.1 entre sitios *EcoRI* (Figura 13). Para la subclonación

se ligó el fragmento de PCR al vector pCR2.1 durante toda la noche a 14°C, y la mitad de la ligación se utilizó para transformar células TOP 10 F'. Las colonias bacterianas transformadas se seleccionaron por el fenotipo de complementación del fragmento lacZα. El DNA del plásmido se purificó utilizando el SNAP miniprep kit (Invitrogen) y se secuenció utilizando los oligonucleótidos M13 reverso y T7 (Figura 13) específicos para los extremos del sitio de clonación.

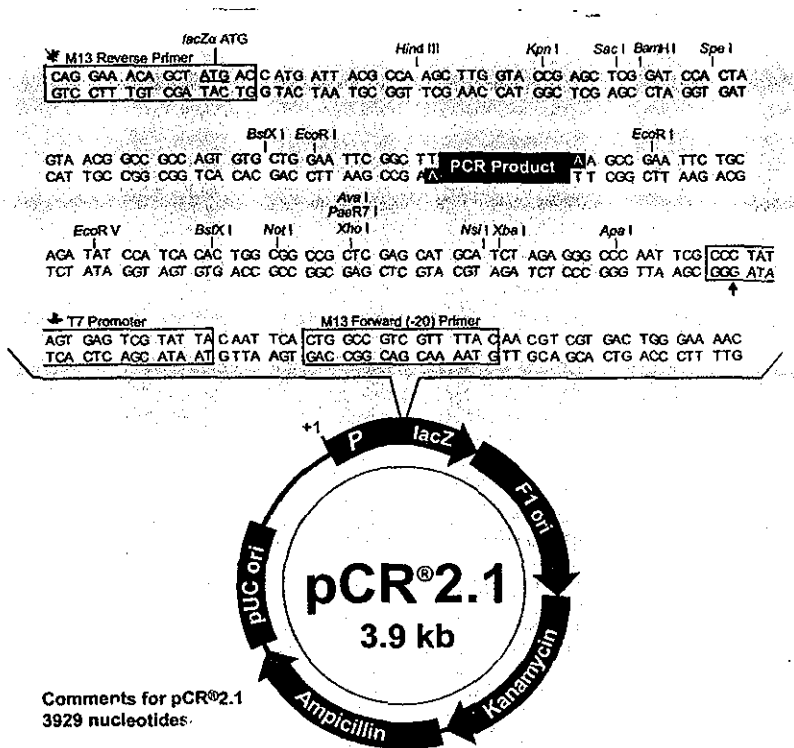


Fig 13. Mapa del vector de expresión pCR 2.1 mostrando sus principales características. Los sitios de unión para los oligos M13 Reverso y M13 -20 permiten la fácil secuenciación de los fragmentos clonados en este vector.

Análisis por Extensión del Oligonucleótido (Primer Extension)

El análisis por extensión del oligonucleótido permite determinar la localización del extremo 5' de un RNA específico. Se utilizó el primer extensión system AMV reverse transcriptase (Promega) siguiendo las instrucciones del proveedor. Para este ensayo se utilizaron oligonucleótidos (REV0 y REV1) que se encuentran a un máximo de 100 a 300 pb del sitio de inicio de la transcripción, los cuales se marcaron en sus extremos con [γ-³²P]ATP (6,000 Ci/mmol). Cada uno de los oligonucleótido marcados se hibridizó al RNA en ensayos por separado. El oligonucleótido hibridado funcionó como iniciador para la transcriptasa reversa, la cual, en presencia de

deoxinucleótidos, sintetiza un mensajero específico a partir del oligonucleótido radiactivo. El experimento se repitió tres veces para cada oligonucleótido. El cDNA resultante se analizó por electroforesis en un gel de poliacrilamida. Para determinar el tamaño del cDNA se usó, como punto de referencia, una reacción de secuencia sometida a la misma electroforesis. La reacción de secuencia se preparó con el oligonucleótido REV0. El tamaño del cDNA refleja el número de bases entre el oligonucleótido marcado y el extremo 5' del RNA.

Secuenciación de DNA

Todas las muestras se secuenciaron en ambas direcciones, utilizando distintas combinaciones de oligonucleótidos sintéticos (Cuadro 3). La reacción de secuenciación se llevó a cabo mediante el método de terminación de cadenas por dideoxinucleótidos (Sanger et al. 1977), para lo cual se utilizó el ThermoSequenase kit (Amersham Pharmacia Biotech) versión 2.0. Las reacciones de secuenciación se analizaron por electroforesis en geles de acrilamida (acrilamida 8%, bisacrilamida 0.4%, urea 50%) en un amortiguador de Tris Borato EDTA (TBE), a un voltaje de 1,400 a 2000 voltios (35-40mA). Algunas de las secuencias se obtuvieron con un secuenciador automático (Applied Biosystems 310) utilizando el estuche ABI prism dye terminator.

Análisis de las secuencias

Los análisis por computadora de las secuencias obtenidas se llevaron a cabo con el programa PC/GENE (Intelligenetics). Las secuencias usadas en la alineación se obtuvieron del GeneBank. Las secuencias de aminoácidos se alinearon usando el algoritmo Clustal implementado en el programa DNAMAN (Lynnon BioSoft, 1994-1997); posteriormente la alineación se optimizó manualmente. La identidad de secuencia es igual al número de posiciones de secuencia alineadas conteniendo residuos de aminoácidos idénticos dividido por el número de posiciones de secuencia comparadas. Se construyó un árbol filogenético a partir de la alineación de las secuencias de aminoácidos de las paramiosinas utilizando el programa MEGA (Kumar et al. 1993). Las distancias entre las secuencias se calcularon con la fórmula de Distancia-P y el árbol se construyó con el algoritmo de Neighbor-Joining con un Bootstrap de 1,000 réplicas.

RESULTADOS

Localización de los intrones en el gen de paramiosina

La región codificadora de la paramiosina se dividió en tres partes o tercios que se pueden amplificar selectivamente por medio de oligonucleótidos específicos diseñados a partir de la secuencia de cDNA (Figura 14). Con el fin de localizar las regiones no codificadoras, cada uno de los tercios se amplificó por PCR, usando como templado el DNA genómico de cisticercos de *T. solium*. Como control se amplificaron los mismos fragmentos usando el DNA del plásmido pRSET vw 7-3.

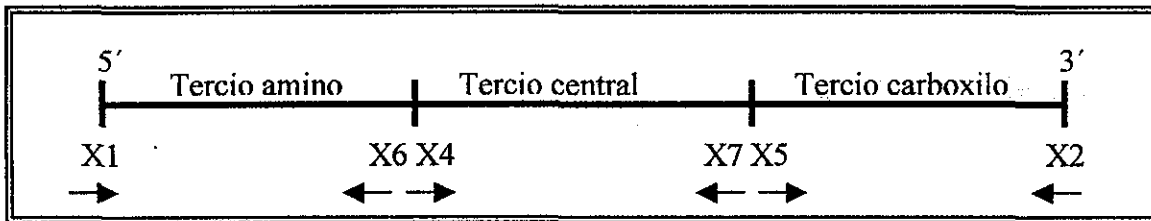


Figura 14. Esquema que muestra la localización y dirección de los seis oligonucleótidos que delimitan los tercios en los que se divide la región codificadora de la TPmy.

Una vez establecidas las condiciones de amplificación, cada tercio se dividió en regiones más pequeñas delimitadas por otros oligonucleótidos con el fin de localizar las regiones no codificadoras de una manera más precisa (Figura 15). Este procedimiento permitió localizar tentativamente los sitios donde se encuentran los intrones del tercio central y del tercio carboxilo. En el caso del tercio amino los ensayos de PCR resultaron negativos probablemente debido a la estructura secundaria del DNA, por lo que fue necesario clonar la región.

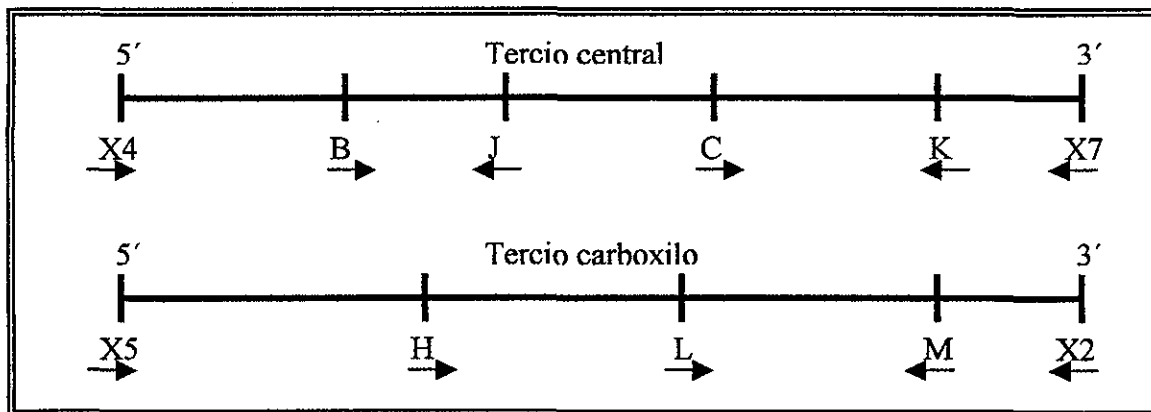


Figura 15. Esquema que muestra la localización y la dirección de los oligonucleótidos utilizados para mapear los tercios de la región codificadora de la TPmy.

En la figura 16A se muestran los fragmentos obtenidos como resultado de la amplificación de la región del tercio central (X4-X7). Se puede observar, que en todos los casos, el fragmento amplificado de las regiones genómicas es mayor que el esperado para la región codificadora sola, lo que sugiere la presencia de intrones. La amplificación del DNA genómico con los oligonucleótidos X4/X7 resultó en dos fragmentos de aproximadamente 1,500 y 2,000 pb. Para confirmar la especificidad de los fragmentos amplificados, el gel con los productos de PCR se transfirió a una membrana de nylon y se hibridó con una sonda específica para el gen de paramiosina (sonda vw 7-3) (Figura 16B). Todos los fragmentos de PCR hibridaron con la sonda de paramiosina con excepción del fragmento de 1,500 pb amplificado por X4/X7. Los resultados de la amplificación por PCR se pueden consultar en el cuadro 4.

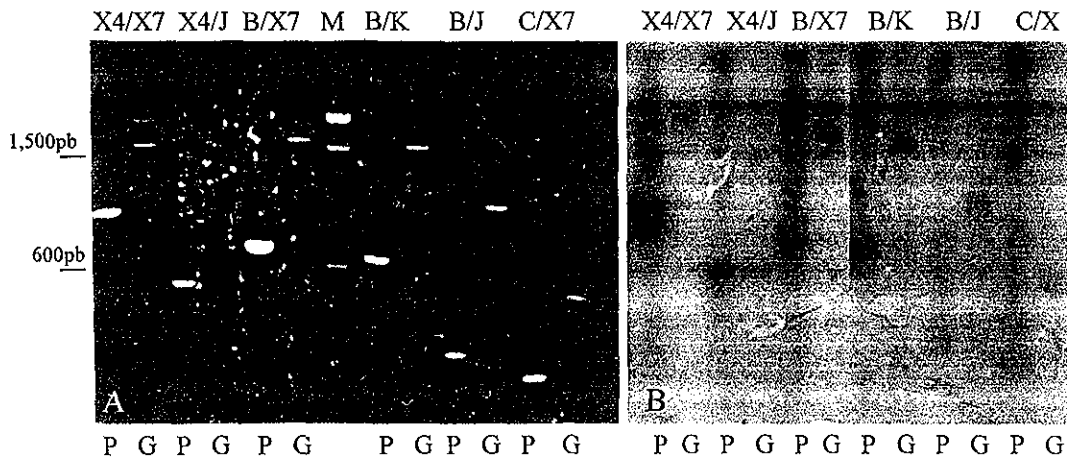


Figura 16A. Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio. Las columnas P muestran los productos de PCR obtenidos cuando el DNA del plásmido pRSET 7-3 se utiliza como templado para la reacción. Los carriles G muestran a los productos obtenidos cuando se utiliza como templado DNA genómico de *T. solium* de la región X4-X7. B. Análisis por Southern blot del mismo gel, hibridado con la sonda 7-3. M. Marcador de peso 100pb.

La figura 17 muestra los resultados de la amplificación por PCR del tercio carboxilo (X5-X2). Al igual que la región central, los fragmentos amplificados del DNA genómico son de mayor tamaño que los correspondientes de la región codificadora, indicando también la presencia de intrones.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

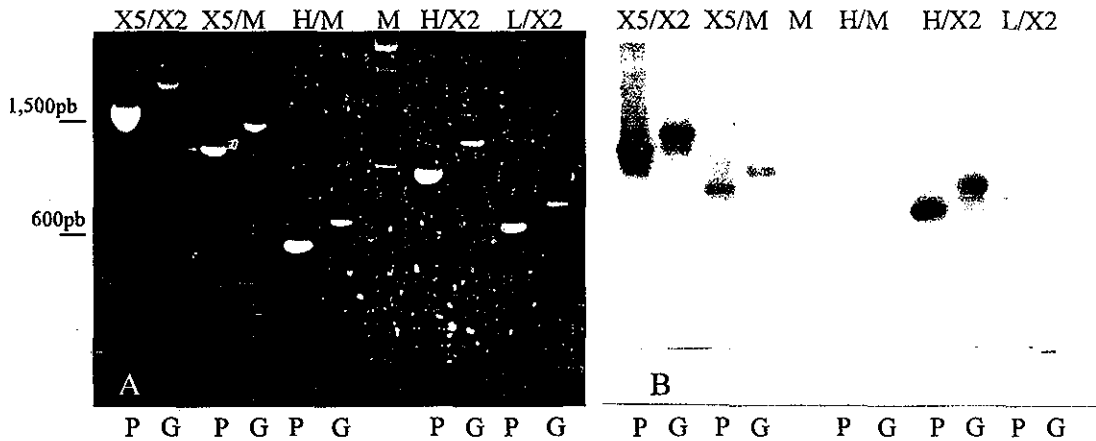


Figura 17A. Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio. Las columnas P muestran los productos de PCR obtenidos cuando el DNA del plásmido pRSET 7-3 se utilizó como templado para la reacción. Los carriles G muestran a los productos obtenidos cuando se utilizó como templado DNA genómico de *T. solium* de la región X5-X2. B. Análisis por Southern blot del mismo gel, hibridado con la sonda 7-3. M. Marcador de peso 100pb.

Cuadro 4. Resultado de la amplificación por PCR de regiones específicas del cDNA y del DNA genómico correspondientes al gen de paramiosina.

Tercio analizado	Tamaño del fragmento de PCR amplificado de la región codificadora (cDNA)	Tamaño del fragmento de PCR amplificado a partir de DNA genómico de <i>T. solium</i>
Tercio amino:		
X1-X6	788 pb	ND
X1-G	419 pb	ND
E-X6	531 pb	ND
E-G	162 pb	ND
N-X6	*ND	ND
Tercio central:		
X4-X7	833 pb	1,800 pb
X4-J	488 pb	1,200 pb
B-X7	665 pb	1,500 pb
B-J	320 pb	900 pb
B-K	628 pb	1,500 pb
C-X7	248 pb	500 pb
Tercio Carboxilo:		
X5-X2	921 pb	1,150 pb
X5-M	646 pb	800 pb
H-X2	540 pb	700 pb
H-M	249 pb	350 pb
L-X2	316 pb	400 pb

ND. No determinado.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Con los resultados mostrados en la cuadro 4, se hizo un mapa tentativo con la posición y tamaño aproximado de los intrones de la región central y carboxilo del gen de paramiosina (figura 18).

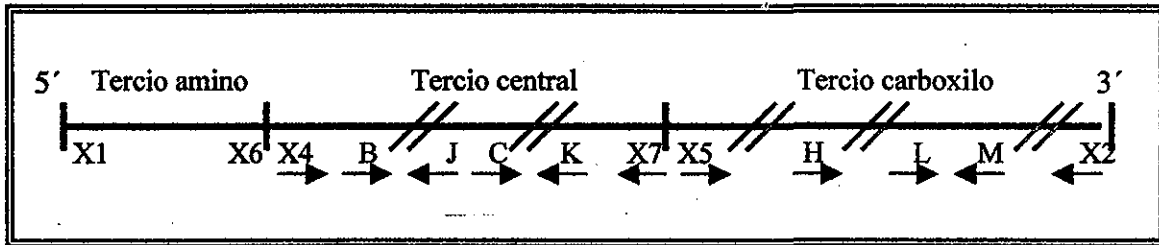
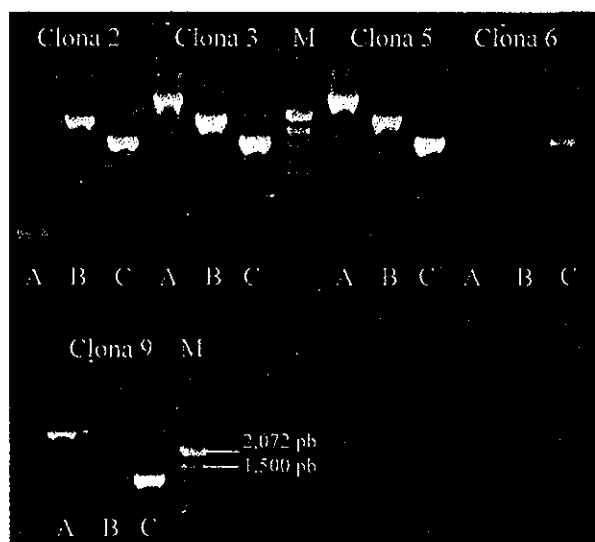


Figura 18. Localización tentativa de intrones en las regiones central y carboxilo del gen de la paramiosina. Las flechas indican la dirección de los oligonucleótidos y las barras rojas la localización de los intrones.

Tamizaje de la biblioteca genómica

A partir del tamizaje de la biblioteca genómica de *T. solium* se aislaron varias clonas que contenían el gen completo de la paramiosina. En el primer tamizaje, en el cual se utilizó la sonda vw 7-3 (región codificadora completa de la paramiosina), se obtuvieron 22 clonas positivas. De estas 22 clonas, solo nueve resultaron positivas en un segundo tamizaje con la sonda vw 2-1 (tercio amino de la región codificadora). Finalmente, de estas nueve clonas solo siete hibridaron con la sonda 4-1 (tercio carboxilo). Las siete clonas que resultaron positivas para ambas sondas se consideraron completas y se eligieron cinco para su caracterización (C2, C3, C5, C6 y C9).



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Figura 19. Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio. Las columnas muestran los productos de PCR amplificados a partir del DNA de las clonas genómicas conteniendo el gen de la TPmy. M. Marcador de peso 100 bp. A, fragmento amplificado con los oligonucleótidos X1-X6; B, fragmento amplificado con los oligonucleótidos X4-X7; C, fragmento amplificado con los oligonucleótidos X5-X2.

Las cinco clonas se analizaron mediante PCR (figura 19) usando los oligo que delimitan los tercios de la región codificadora en forma idéntica a como se mapeó el DNA genómico. Como control se utilizaron nuevamente el DNA del plásmido pRSET VW7-3. Los resultados se muestran en la cuadro 5.

Cuadro 5. Resultado de la amplificación por PCR de regiones específicas del cDNA y del gDNA de las clonas genómicas aisladas por tamizaje.

Clona	Región amplificada	Tamaño de los fragmento de PCR amplificados a partir de la construcción VW 7-3 (cDNA)	Tamaño de los fragmentos de PCR amplificados a partir de la clona genómica (gDNA)
Clona 2	X1-X6	788 pb	ND
	X4-X7	833 pb	1,700 pb
	X5-X2	921 pb	1,200 pb
Clona 3	X1-X6	788 pb	>2,000 pb
	X4-X7	833 pb	1,700 pb
	X5-X2	921 pb	1,200 pb
Clona 5	X1-X6	788 pb	2,000 pb
	X4-X7	833 pb	1,700 pb
	X5-X2	921 pb	1,200 pb
Clona 6	X1-X6	788 pb	800 pb
	X4-X7	833 pb	ND
	X5-X2	921 pb	1,200 pb
Clona 9	X1-X6	788 pb	>2,000 pb
	X4-X7	833 pb	ND
	X5-X2	921 pb	1,200 pb

ND. No determinado.

Análisis de la estructura del gen de la paramiosinas

De las cinco clonas genómicas analizadas, se seleccionaron las clonas 5 y 9 con el fin de determinar su estructura. Ambas clonas se secuenciaron 1,500 pb hacia el extremo 5' del codón de inicio y 1,000 pb hacia el extremo 3' del codón de terminación. Ambas resultaron idénticas por lo que el resto del trabajo se llevó a cabo con la clona 5. De las 1,000 pb secuenciadas río abajo, 366 resultaron ser parte de la secuencia del fago lambda, lo que indica que se llegó hasta el borde del sitio de clonación. La región secuenciada para el gen de la paramiosina comprende 8,253 pb en total de las cuales 1,506 son de la región corriente arriba del codón de inicio de la traducción, 6,106 pb comprenden la región codificadora y no codificadora del gen estructural y 641 pb corresponden a la región corriente abajo del codón de terminación (figura 20). El análisis de la región corriente abajo del codón de terminación no mostró señales convencionales para la poliadenilación de RNAm (AATAAA) (Fitzgerald and Shenk 1981). La señal de poliadenilación es una secuencia altamente conservada, aunque se han reportado variantes de la secuencia

Secuencia completa clona 5

```

1  GGTAACTACT TTCATACCCG GCGGACAAAT TGCCATAATA TTCTGTCTGT TTTCAAGCCC CCATTGCATT AAGGTATATT
81  GCTTCACGCC CTGGAGATTA ACAGTAATTT GGGGGTGGGA AAGGAACTTT AATGAAGTT TTCTCTCAGT TAACAGAGAC
161  TGCCCAAAAT GCGCGGTCAA AATCGAAATTT GTACCTTTCA TGCCAGTGAA AGAATGACT GTAATGGAT TAAATTAACG
241  TGAGCAAGTC CTTTTCCCTT TCCCTACCAA AAAAGCTCTA TTTTATGCTT CACTTATGAT TGGTCATAAC ACCTAACCGA
321  CTTGGTGTCA CTCTTGATAC TACTACTAGC TTGTTTTGCT ACTTTTGTCA TCTTTGGTGC CTGACAATAT TTCCTCAAC
401  ATGTTTCACT AATAGCATAA GGAAGTCTTT TCTTTTGAAC AAAAATGGGA GTTTTCAACT TTAATCTTTC ACTGTGCATT
481  TCCCAAAAAG CCACGGAAAG GTCTGCTTCA AGCGAACTTG ACAGTAGCAA GTGCAGTCTG AAGCTCTCTA ATGTGGAAGG
561  GCGACATGGA TTGAGGTCAG TGGATGCATA GGCAAGTGTG GCCTAGGTGA TACGGAACAC AGCTACACCC TGTTCCTGAA
641  TTTAACAGTG CACGCCACA GTGCACGCC CATCCATGTA GCGACAGCAA GTGTGAGTTG AAGGAGAATG GAGGGGGGTG
721  ATGCTTAAGA CGCCAAGTAA ATTAGAATTG GTCTTCAGTA TGTAGACCAC CTCGAGGTAA GGGTAGACCG CATTTAACAG
801  TCCACTTCGA TCTCTACTTC CAAAATCAA CCCTCTTAGT TGACTGTTTT TAGAAACCAT CTGCGTGCAT GATAGAAATG
881  ATGGCATTTA AGGGGTGGG GCATCCCTCC GAGGTGTCTG ATATCACAGT CATGGCATTG GCGGGGTGTG CGTGTGTGCA
961  CGTGTGTACA CTGCGGTCTT TCGCGCACAG ACCTTGGCCG GACTTGGCCG GACACAGCTAC CCATCCATG GAGGGGGGTG
1041  TCACGCTGT ATGCGCCGGA TCGTGCAGCA GTGCTGCACA GTGTGATCGT GCGTACAGCT TTATCGATTT GCAGTGGAAC
1121  GGGCAGTGT TTTGGGCAAT CGGCCAATGG GAGAGGAACG GCGATTTCTG ATAAACTCTG GTATTTGGCC GCGCCAGCGG
1201  CAGATTGTAC GCGTTTGGGC AAATAGGACG ACGTGCACGC CACTACACTC CATCCAGGAC TCGTTCTCGC TCTCCAGCTT
1281  TTTGATCCCT CCGTCCGATT AATTTTGCAT TTTTTTCCGT TAAGAGTCTG ACAAAGTCTG TAACTTTCGA ATTTTCCCTG TCTCCGCTT
1361  GACTAGGAAA GGAATTTTCT GAGCGGTCTG ATTCAATTGA GAATCCGGTC CGTTTTCTGA CTTTCGAATC TACTTCACGC
1441  ACACAACCAA TCCATTGCCG AGCTGCGCTG ATTCACCACA AAACGGGACC TATCAGAGAC GAAGAC
1521  AAAAAT TCTCGTACCA TCATACCGCG GACTTCCCCA AGTACTGTTC GACTTGAGGT ATTACCTTTC TACATCTTCC
1601  ATCTCATCTA TGTFTGTGGT TTGAAATAGT TTAGACTTT TTAATGGCGG TGATGAAAAC TGACGTCTTA ATTCACGTTG
1681  TCTGATAGTT CGTGTCTTTC GTGATTCTAG ATATTGACAC TTTTACCAGA TTGATTACTG CCATATGGAT CTAGCCTGAT
1761  GCATTGCTTA TAACCGCCTT ACATTCAAAA ACGGGGTCAA ACAATCTGAT CTGATAGACC AAAACTTAT TCAATTTATG
1841  CCCTCAGATG AAGTGGAGTC TTACGGCGTC TAGTGGTAAA ATGATCAAAC TATGTGATAA AGCTAAGAAG TGATGGCTCC
1921  ATAATACGAT GCGTCCGATT AATTTTGCAT TTTTTTCCGT TAAGAGTCTG CTAAGGCTGA AACCAGATGA GCATTCAGCT
2001  GAGCGAGATG CTCGCGTCCG GGTATGATTT TTCATTTGTC ATTATTATTT TTCTGGGATC CGATTGCCCTG TGCCTTTAAA
2081  ACGTATTTAA AATCGATGGC CTACTATCAT ATCACACACT GTGGACAAAA TAATCGCAAA ATTTCTATTC TTTGCTTAT
2161  TTGTCTGAAT AAGTGGGCAC TGACAGACTC TGGCAAAACA AAATGTCTCT TGGAAATAT GTTCGTGGAC GCATGGAAC
2241  TCTTGTATGT GGTACACATCA GGCTCACACG TTTTTTCCCT CTAAGGCTGA ACGCAATGCC AACGAGATGA GCATTCAGCT
2321  GGACACCATG GCTGAACGTC TTGACGAATT GAGTGGTACT TCCTCTCAGA CTGTAAGCTA AGTAATTTT AAATTAACAA
2401  AAATTCGGAT GAGATATTTA CCTGATTTTA AATCAACATG GCAGATTTCA TTCATTTGAT CATAACATAG CGCAAATCAA
2481  GATTTAAGTT CGTTTGGTCC AGTGGCCTCT TTAATGAAAA TGGGTGGTTT ATTTGCAAGC GGAGTTGGCC TTTGATGTGT
2561  AATCAATGGG TACTGAAAAG CAGTACCTAC TATTATTTAC TATTATTTT GAATACCTGG AATACTGACC TTTGCTGTGT
2641  TCTAGGTAGC TAATATGAGG GCCTGCGCGC TGTGTGCACT GCCAACACAT GAAGGTGAAG CCATACTTAG GCACGTAGGA
2721  TGGACTGACT TCTGGATGCA GATGTGACTT TCAGACATTC ACTGACGAAT GAATATATGT TGGACTTGGT GGTAACTATG
2801  AAAATAGCTA CCATPGCCAG TTTTGTCTG GTTTTTCCG AAATGAAATG GGATGGGTTG CAGCATAAT TGGCTTGTCT
2881  CATTAGCTTC TTATTTGGCC CTGAAATFCA GATTCTCCCA AGCTCACCCC TTATCTCCCA GTTTTGGAG CATTCCAG
2961  AAGATGACAG AGTGTGAAA TCGAAATFCA ACCTTTTAT TCGGATCAGC AAAGAGGAT TCAATGGCA TCTACCGGTA
3041  TTTAACCAA GTTCCGATAA CAACGTAAAG ATAGGACTC GTTTGTTCGA ACAGTGTCTT TCAATGACA GCTTACTTGA
3121  TAAGAGCTGA CGTATGACGA AAGCGTTTGC CGAACTCCTG TTTTTTTTCC CGTGTCTCTA CAGCAGATG CTATTGCCG
3201  TAAGGATATG GAGATCTCGA AGCTGCCCAA GATTCTGGAA CTGCTTTCGA AACTGCCGAG CCCTCTGTC
2881  GCCGCAACA CAACACCATG ATCTCCGAGA TCTCCAGCGA GGTGAGAAAT TTGCAGAGC AGAAGGGCAG GTAAGTCTT
3361  CTCGCCCTCT CTCTTCTCT GCTCCTTGTG TGAGATCCTT CAAAGTAATT GTTGAGACTT TTGCCAATG AGAACACCT
3441  GTGCTAACAC CTTAGAGGTG AGCGAGCTGA AGGTCAATCT GTAGTATCCA GAATCTGTAG TGGAAACATG GGAATATTTA
3521  AAAATACAT CCAGTACATT TTGAAGAAAT TAGCAATGTT ATTTTGTGAGG ATGTGAAACC CACAATCTG GAAGTGTCTG
3601  TAACCAAGC ATGCATGGCA TGGGTAGTTT TAACAGATCT ATATGTCACA AGGATAGAGA TAGAGGATTT ATGCGTAGTT
3681  AAACGTGAAA TCAGGGCTGA AGTAATTTAG CTTACAATTT TTGGTTTTTT AGGGCAGAGA AGGACAAGAG CCAGCTCATG
3761  CTTGAAATCG ATACGTTTCT TGGTCAACTT GATGGCCTT TAAAGGCCAA GGTAAATTTT CTCTTTTTG TATCAAATTT
3841  TTGTCTCAAG GTGCCAATTA ACTCCTCTTC ATTTAGCAGC AAAGGCATAG TCGAATCCAC TCGAATGAT ACTCAGATTC
3921  ATGAGGGGGG ATGAAACTAT TGTAGTGGGA TATTATAACA TTACCCTCAG CTTTCTCAA TATCAGGCCA ATGGTAATGA
4001  AGTTTTGTGC CGGAAGTGAA ACTGAAACAG GTGGAATTTG AAAAAAAGT TTATTTTGT TCACTTGAGA AGTTTCTATG
4081  GCTAAAACTA CGGTGCAAGA ATGCACAAGT CGGAATTATT TTGCCCGTTC CATTACTGAT TGAATCGATT TGATGCGCTG
4161  ATATPTGTTG CATTTCCGTT TTAGGCCPCA GCGGAGAGTA AACTGGAGGG CTTGGACAGC CAGCTGACGC CTTGAAGGC
4241  GCTGACCGAC GATCTTCAAC GCCAAATGGC CGACGCTAAC TCTGCCAAGT CCGTTTTGGC CGCAGAGAAC TTCGAATTGG
4321  TTCGCGTAAA TCAGGAGTAT GAAGCACAAG TCGTACCTT CTCTAAGACA AAGGCCGCTC TTGAAAGACA GCTGGATGAC
4401  CTTAAACGGG CCATGGATGA AGATGCACGC GTAAGTGGCA GTACTACACT TAGAATTTGG AGATCGCCGAG CCACACCTT
4481  CTATPTGCTT GCTPTGCTCT GTAGAATCGC CTAAGCTTTC AAACACAGTT TCGAGTCTG CAAATGGACT ACAGACAACCT
4561  GCAAGCACGT TACGAGGAGG AAGC
4641  CCCCAAGC CCGTCTTGAG AGAGAACTTA TGGCCAGAC FGAAGAGTTT GAAGAACTCA AGTAGGTGCT TTTTCACTT
4721  CCTCCATCTC TCGTTTGAAT TTGATTTTCA TTTCTCCGG TGTATGTACA TAGCTGAAAT GTGCCGATCA ACCCCACTC
4801  CTTCTGTAG ACTGCAAGCTG ACTGTTCCGA TTTCCAGATG GGAGGATATG GCTGAACTAG AGCCGACTCG TGCCAACAA
4881  CTGGAGAAGA CCAAGTAA GCTGACTCTT GAGATCAAGG ATCTACAGGC TGAAGACGAG GCGGTAGGTT CCGCAACGT
4961  CATCTGAAAT AAGTPTAAAT CCTAAAGAAA TCATATCAA CAAGTTAACT GAATGGATG AATCGAATGC ACAGTTCTGA
5041  ATGGCAGGAG GCTCGGTGGT CTTCTGTAG TATAATCGCT AAGTGAACAT TGAATAATAA GGTGAAATG TTTCTCTTA
5121  CAAGAACTCG ATTTCACTAG CTCATCTTGA CCGCTCTPTT TCGATTTTAA AATCCCTTGA CAGTTGGCAG CAGAGAAATG
5201  AGAGTTAACG CATCGGGCGA AGCAGGCAGA GAATCTTGCC AATGAGCTGC AGCGTCAAT AGACGAGATG ACAGTGGAAA
5281  TCAACACCTT CAATCGGCC AACAGCGCTC TAGAGCGCGA CAACATGCGC CTCAGGGGCG AGGTCCGGTA CCTCACCAG
5361  CGCATCGCCA ATCTCGACCG CAAAACCCG CAATTTGGC GTACGCTTTC CTCATAACTT ATTTCTCTT AGTGGCAGT
5441  ATGATGGCAG AAAAAACTCA TAACTTTGTG GGATTTGTG AACTCATCTT AAACAGACTT ATGTTCACTT TTTCCAGCGG AAAAGACTAA
5521  GCGGGGGAAG AATGCTCACC CAAAATGTTT GGTGCTAGTG GCGACAGAAG ATTTGGCCAGT TTGCATAGTT AAGCGTTGGA
5601  GTCATTTTGT TCAATTTATTT TATCCAAAAG CTACAACAGA ATATTTACCT CACGCATATT TTAGCATAGC TGCTTATTC

```

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

5681 AGGTATTTAA AACCAATTA AGACCATTG GACCTTAAAT CGGCAATCAA CCTGGCATGG AATAACCAA TAGTTTTTTT
5761 TATTATTTTT TTCCTTTTT TCCTACAAC CATCCACAGA TCAACTGAAG GAGACGAAAT CAGCCCTGCG TGATGCGAAT
5841 CGTCCGACTGA CCGATTTGGA GCCCCTGCGC AGTCAGTTGG AGGCAGAGCG TGACAACCTC GCCTCTGCTC TCCATGATGC
5921 TGAGGAGGCA CTGAAGGAGA TGGAAAGCAA GTACGTTGCC TCGCAGAACG CTCCTAATCA CCTCAAGTCC GAGATGGAAC
6001 AACGCTCTGC TGAGAAGGAC GAGGAAGTGG AGAATCTGAG GTCAGTCATC TTCATATATT TCACTTTACT GATTCCCAGT
6081 AAGTATCCAT AGGTAAAAGA GTAGCTTTT GATCTTTTAA AACTAAATAT CAGCGTTATC TGGTCTTCC AAATGGTTGT
6161 CGTTTAGGAG TCATAAGTAT AATTACGCAA ATTACTCCTA GCTCGTAAAA ACCAAAATT GGAACAAGG GTTTGGTTTT
6241 TATAAGTGA ATTAAGAGGT GTGCTGTGGA TATTGATGTT TTAGAAAGAG CAGACTGCG ACGATTGAGG AGTTGACAAC
6321 CACCATCTCA GAGATGGAGG TTCGCTTCAA GTCGGATATG TCTCGTCTGA AGAAGAAGTA CGAGCGGACA ATCAGCGAGC
6401 TAGAGGTGCA ACTAGACGTG GCGA GAGGCACTAA GAGGCACTAA GAGGCACTAA AAA CCTGGCTCA ACGAGTTCAA
6481 GAGCTGCAG CTGCGTTGGA GGACGAGCGA CGAGCTCGCG AAGTGCAGA GAGCAACTTG CAGGTGAGCG AGCGCAACG
6561 CATCGCCCTT GCTTCGGAAG TGGAAAGAGT TCGCAGCCAA CTGGAACTCA GTGACCAGCG TCACAAGAAC GCCGAGTCCG
6641 AACCAACGA TGCCAATGGA CGTATCTCGG AGCTCACCTC ATCGGTCAAC ACTCTTACCA ATGACAACG TCGACTGAA
6721 GCCGATATT GGTAGACGA GGGCATCTC GATCGGCCG TCAATGTCGCG CAAGGTATCA ATCATCTTA ATAATCATGT
6801 TCTCTGAAG CTTAATAGTA GTTAACTTAA AATGGATCTG CATTCTAAAG GCTGCTGAGG ATAGAGCTGA CCGTCTGAA
6881 GCTGAGGTAC TCCGCTGCG TGATGAGCTG CGACAGGAAC AAGAAAATTA CAAGCGTGTG GAGACTGCG GCAAGCAACT
6961 TGAGATCGAG ATCCGTGAGA TCACGGTCAA GTTGGAGGAG GCTGAGGCTT TCGCTACTCG TGAGGGTCCG CGTATGGTTT
7041 AAAAGCTCCA GGTAGACCT CCTGTCTCG GATCGCCCTA AAGTGTTTT CAAATGCATA GTCTATTTT TCTCCTTTA
7121 CCATTAGAA CCGGTGAGG AGCTTGAGG GGAGCTGGAC GGAGAAATTC GTCGCGCCAA GGAGCCCTC GCCAACGCGC
7201 GCAATACGA GCGTCAATC AAGGAAGTGC AGACAGAGAG CGAGGATGAT AAACGCATGA TTTTGGAGCT TCAAGACCTG
7281 CTAGACAAGA CTCAGATCAA GATGAAAGCC TACAACCTC AGCTTGAGGA ACAGGTGCG TCGTTAACTT AAGTTATAAG
7361 GTATATGAGA GTGTAGATTG GTACTGACGC GAGAACTTTA TGCCTGTGCT ATAGGAAGAG GTGTCTCAG TGACGATGAG
7441 CAAGTACCGT AAGGCGCAGC AACAGATTGA GGAGGCGGAA CATCGTGCTG ACATGGCGGA GAGGACGATC ACCATTAGA
7521 GGACAATTGG TGGACCGGT TCCCGCGCGG TTTCCGGTGT TCGGGAGATC AACAGTGTCT CCGTGGTAA CCGT
7601 ATGTCCTC AAAAGGGCAG AACTCGTGA TTTTATTAG CCTTATCCA CCCAGTTC CCTCCATCC
7681 CTACCCTTCC AGCACACTT TTTCCGGTGT TACGTCCGCA TAAACCCATA TACTATTCAA AAGGAGGAG AGGGGAGG
7761 TAATGAAAGA GAAAGAGAGC ACTCTTTGTC CATGCCCTAT GCCGTCCTT TCTACTTTGC TTTTCTCAAC TCTGCCCTC
7841 CTCCCTCCTT TGTCAATTC GGGTTTTTCT TCTCTCTCC ACCATGTCG GTTCTTCCC TTACTTAAAC TGTCTCTGCC
7921 GCCACAGAAG ACTCTAGGAT GTTTCTCTA CCATGCTAC CACCTAAGCA GGTGGCTTCT TGCTTTCCG TGCGCAGTTT
8001 CCCCACCTC TTTCTCTAT TTTCTTTCG GTTTATTTA ATGCTCTGCG TGCCAACTCA ATCAACACCA ATCAACACCA
8081 CGCTGCCACT ACCACTCTG AGTTGTTATG TTTTAGTAT TAGAAATGTT TCAG AAAAG TGTGTCTC TCTCTGTTT
8161 TATTATGATG TGCCATTGAG GCGCGAGTTG TTTGGCCCTT AACACCTTGC CTCCAAAGG TGTGTACAG ATCAATGCC
8241 TATTGTCAGA TGA

Figura 20. Secuencia de la clona 5 conteniendo el gen completo de la paramiosina de *T. solium*. En rojo se muestran los codones de inicio y terminación de la traducción y en verde se muestran los oligonucleótidos que delimitan los tercios en que se dividió la región codificadora. Los intrones se muestran en azul. La secuencia subrayada en lila es posiblemente una señal de poliadenilación y la base marcada en lila es el sitio donde se agrega la cola poli(A) deducido de la secuencia de RNAm. Las bases marcadas en amarillo muestran los cambios identificados en la secuencia genómica con respecto a la secuencia reportada del cDNA.

Alineamiento de la secuencia de aminoácidos

PMYTSKP	MSESHVKISRTIIRGTSPTVRLSRVLELEDLLDLERDARVRAERNANE	50
PMYTSGP	MSESHVKISRTIIRGTSPTVRLSRVLELEDLLDLERDARVRAERNANE	50
PMYTSAGP	MSESHVKISRTIIRGTSPTVRLSRVLELEDLLDLERDARVRAERNANE	50
PMYEGP	MSESHVKISRTIIRGTSPTVRLSPVRELEDLLDLERDARVRSERNANE *****	50
PMYTSKP	MSIQLDTMAERLDELSTSSQTHDAIRRKDMEISKLRKDLENANAAFETA	100
PMYTSGP	MSIQLDTMAERLDELSTSSQTHDAIRRKDMEISKLRKDLENANAAFETA	100
PMYTSAGP	MSIQLDTMAERLDELSTSSQTHDAIRRKDMEISKLRKDLENANAAFETA	100
PMYEGP	LSIQLDTMTERLDELSTSSQTDAIRRKDMEIANVRKDLENANAAFETA *****	100
PMYTSKP	EATLRRKHNTMISEISSEVENLQKQKRAEKDKSQLMLEIDNVLGQLDGA	150
PMYTSGP	EATLRRKHNTMISEISSEVENLQKQKRAEKDKSQLMLEIDNVLGQLDGA	150
PMYTSAGP	EATLRRKHNTMISEISSEVENLQKQKRAEKDKSQLMLEIDNVLGQLDGA	150
PMYEGP	EATLRRKHNTMISEISSEVENLQKQKRAEKDKSQLMLEIDNVLGQLDGA *****	150
PMYTSKP	LKAKASAEKLEGLDLSQTRLKALTDDLQRMADANSAKSRLAAENFELV	200
PMYTSGP	LKAKASAEKLEGLDLSQTRLKALTDDLQRMADANSAKSRLAAENFELV	200
PMYTSAGP	LKAKASAEKLEGLDLSQTRLKALTDDLQRMADANSAKSRLAAENFELV	200
PMYEGP	LKAKASAEKLEGLDLSQTRLKALTDDLQRMADVNSAKSRLAAENFELV *****	200
PMYTSKP	RVNQEYEAQVVTFSKTKAALESQDLDDLKRAMDEDARNRSLQTLQSSLQM	250
PMYTSGP	RVNQEYEAQVVTFSKTKAALESQDLDDLKRAMDEDARNRSLQTLQSSLQM	250
PMYTSAGP	RANQEYEAQVVTFSKTKAALESQDLDDLKRAMDEDARNRSLQTLQSSLQM	250
PMYEGP	RVNQEYEAQVVTFSKTKVLEGLDLDLDDLKRAMDEDARNRSLQTLQSSLQM * . ***** . ***** . * . ***** . ***** . ***** . *****	250

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

PMYTSCP	DYDNLQARYE E E E A A G N L R N Q V A K F N A D M A A L K T R L E R E I M A K T E E F E E	300
PMYTSGP	DYDNLQARYE E E E A A G N L R N Q V A K F N A D M A A L K T R L E R E I M A K T E E F E E	300
PMYTSAGP	DYDNLQARYE E E E A A G N L R N Q V A K F N A D M A A L K T R L E R E I M A K T E E F E E	300
PMYEGP	DYDNLQARYE E E E A A G N L R N Q V A K F N A D M A A L K T R L E R E I M A K T E E F E E	300
PMYTSCP	L K R K L T V R I T E L E D M A E H E R T R A N N L E K T K V K L T L E I K D L Q A E N E A L A A E	350
PMYTSGP	L K R K L T V R I T E L E D M A E H E R T R A N N L E K T K V K L T L E I K D L Q A E N E A L A A E	350
PMYTSAGP	L K R K L T V R I T E L E D M A E H E R T R A N N L E K T K V K L T L E I K D L Q A E N E A L A A E	350
PMYEGP	L K R K L T V R I T E L E D I A E H E R T R A N N L E K T K V K L T L E I K D L Q A E N E A L A A E	350
PMYTSCP	NGELTHRANE A E N L A N E L Q R R I D E M T V E I N T L N S A N S A L E A D N M R L K G Q V	400
PMYTSGP	NGELTHR A K Q A E N L A N E L Q R R I D E M T V E I N T L N S A N S A L E A D N M R L K G Q V	400
PMYTSAGP	NGELTH R V K Q A E N L A N E L Q R R I D E M T V E I N T L N S A N S A L E A D N M R L K G Q V	400
PMYEGP	NGELTH R A K Q A E N L A N E L Q R R V D E M T V E I N T L N S A N N A L E G D N M R L K G Q V	400
PMYTSCP	G D L T D R I A N L D R E N R Q L G D Q L K E T K S A L R D A N R R L T D L E A L R S Q L E A E R D	450
PMYTSGP	G D L T D R I A N L D R E N R Q L G D Q L K E T K S A L R D A N R R L T D L E A L R S Q L E A E R D	450
PMYTSAGP	G D L T D R I A N L D R E N R Q L G D Q L K E T K S A L R D A N R R L T D L E A L R S Q L E A E R D	450
PMYEGP	G D L T D R I A N L D R E N R Q L G D Q L K E T K S A L R D A N R R L T D L E A L R S Q L E A D G D	450
PMYTSCP	N L A S A L H D A E E A L K E M E A K Y V A S Q N A L N H L K S E M E Q R L R E K D E E L E N L R K	500
PMYTSGP	N L A S A L H D A E E A L K E M E A K Y V A S Q N A L N H L K S E M E Q R L R E K D E E L E N L R K	500
PMYTSAGP	N L A S A L H D A E E A L K E M E A K Y V A S Q N A L N H L K S E M E Q R L R E K D E E L E N L R K	500
PMYEGP	N L A S A L H D A E E A L K E L E V K Y V A S Q N A L N H L K S E M E Q R L R E K D E E L E N L R K	500
PMYTSCP	S T T R T I E E L T T T I S E M E V R F K S D M S R L K K K Y E A T I S E L V Q L D V A N K A N V	550
PMYTSGP	S T T R T I E E L T T T I S E M E V R F K S D M S R L K K K Y E A T I S E L V Q L D V A N K A N V	550
PMYTSAGP	S T T R T I E E L T T T I S E M E V R F K S D M S R L K K K Y E A T I S E L V Q L D V A N K A N A	550
PMYEGP	S T T R T I E E L T T T I S E M E V R F K S D M S R L K K K Y E A T I S E L V Q L D V A N K A N A	550
PMYTSCP	N L N R E N K T L A Q R V Q E L Q A A L E D E R R A R E A A E S N L Q V S E R K R I A L A S E V E E	600
PMYTSGP	N L N R E N K T L A Q R V Q E L Q A A L E D E R R A R E A A E S N L Q V S E R K R I A L A S E V E E	600
PMYTSAGP	N L N R E N K T L A Q R V Q E L Q A A L E D E R R A R E A A E S N L Q V S E R K R I A L A S E V E E	600
PMYEGP	S I N R E N K A L A Q R V Q E L Q T A L E D E R R A R E A A E S N L Q V S E R K R I A L T S E V E E	600
PMYTSCP	I R S Q L E L S D R A R K N A E S E L N D A N G R I S E L T L S V N T L T N D K R R L E G D I G V M	650
PMYTSGP	I R S Q L E L S D R A R K N A E S E L N D A N G R I S E L T L S V N T L T N D K R R L E G D I G V M	650
PMYTSAGP	I R S Q L E L S D R A R K N A E S E L N D A N G R I S E L T L S V N T L T N D K R R L E G D I G V M	650
PMYEGP	I R S Q L E L S D R A R K N A E S E L N D A N G R I S E L T M S V N T L T N D K R R L E G D I G V M	650
PMYTSCP	Q G D L D E A V N A R K A A E D R A D R L N A E V L R L A D E L R Q E Q E N Y K R A E T L R K Q L E	700
PMYTSGP	Q G D L D E A V N A R K A A E D R A D R L N A E V L R L A D E L R Q E Q E N Y K R A E T L R K Q L E	700
PMYTSAGP	Q G D L D E A V N A R K A A E D R A D R L N A E V L R L A D E L R Q E Q E N Y K R A E T L R K Q L E	700
PMYEGP	Q G D L D E A V N A R K A A E D R A D R L N A E V L R L A D E L R Q E Q E N Y K R A E T L R K Q L E	700
PMYTSCP	I E I R E I T V K L E E A E A F A T R E G R R M V Q K L Q N R V R E L E A D L D G E I R R A K E A F	750
PMYTSGP	I E I R E I T V K L E E A E A F A T R E G R R M V Q K L Q N R V R E L E A D L D G E I R R A K E A F	750
PMYTSAGP	I E I R E I T V K L E E A E A F A T R E G R R M V Q K L Q N R V R E L E A D L D G E I R R A K E A F	750
PMYEGP	I E I R E I T V K L E E A E A F A T R E G R R M V Q K L Q N R V R E L E A D L D G E I R R A K E A F	750
PMYTSCP	A N A R K Y E R Q F K E L Q T Q S E D D K R M I L E L Q D L L D K T Q I K M K A Y K R Q L E E Q E E	800
PMYTSGP	A N A R K Y E R Q F K E L Q T Q S E D D K R M I L E L Q D L L D K T Q I K M K A Y K R Q L E E Q E E	800
PMYTSAGP	A N A R K Y E R Q F K E L Q T Q S E D D K R M I L E L Q D L L D K T Q I K M K A Y K R Q L E E Q E E	800
PMYEGP	A S A R K Y E R Q F K E L Q T Q S E D D K R M I L E L Q D L L D K T Q I K M K A Y K R Q L E E Q E E	800
PMYTSCP	V S Q L T M S K Y R K A Q Q Q I E E A E H R A D M A E R T I T I K R T I G G P G S R A V S V V R E I	850
PMYTSGP	V S Q L T M S K Y R K A Q Q Q I E E A E H R A D M A E R T I T I K R T I G G P G S R A V S V V R E I	850
PMYTSAGP	V S Q L T M S K Y R K A Q Q Q I E E A E H R A D M A E R T I T I K R T I G G P G S R A V S V V R E I	850
PMYEGP	V S Q L T M S K Y R K A Q Q Q I E E A E H R A D M A E R T I T I K R T I G G P G S R A V S V V R E I	850
PMYTSCP	N S V S R G N R A T S I M	863
PMYTSGP	N S V S R G N R A T S I M	863
PMYTSAGP	N S V S R G N R A T S I M	863
PMYEGP	N S V S R G N R A T S I M	863

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Figura 21. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos deducida a partir de las secuencias reportadas para las paramiosinas de estos organismos. PMYTSCP, paramiosina de *T. solium*, cDNA; PMYTSGP, paramiosina de *T. solium*, gDNA; PMYTSAGP, paramiosina de *T. saginata*; PMYEGP, paramiosina de *E. granulosus*. Los aminoácidos subrayados en amarillo muestran la diferencia entre las secuencias de cDNA y gDNA de *T. solium*. El (*) indica que el mismo aminoácido se encuentra en todas las especies. El (.) indica la presencia de aminoácidos distintos.

Cuadro 6. Secuencia de nucleótidos en los límites intrón/exón del gen de paramiosina de *T. solium*. Los números entre paréntesis especifican la longitud de cada exón e intrón en pares de bases; los números para los exones I a XIV incluyen solo la secuencia codificadora. Las áreas sombreadas muestran secuencias conservadas para la escisión de intrones.

INTRÓN		EXÓN		INTRÓN	
		I (72)	CTTGAG	GTATTA	(386)
GTTAAG	AGTCGC	II (57)	GTCCGG	GTATGA	(264)
TCTAAG	GCTGAA	III (87)	CAGACT	GTAAGC	(811)
CTACAG	CACGAT	IV (167)	GGGCAG	GTAAGT	(382)
TTTTAG	GGCAGA	V (79)	GCCAAG	GTAATT	(373)
TTTTAG	GCCTCA	VI (246)	GCACGC	GTAAGT	(74)
CTGTAG	AATCGC	VII (197)	ACTCAA	GTAAGT	(109)
TTGTAG	ACGCAA	VIII (133)	GAGGCG	GTAAGT	(240)
TGACAG	TTGGCA	IX (217)	TTGGCG	GTACGC	(399)
CCACAG	ATCAAC	X (241)	TCTGAG	GTCAGT	(244)
TTTTAG	AAAGAG	XI (490)	CGCAAG	GTATCA	(76)
CTAAG	GCTGCT	XII (201)	CTCCAG	GTTAGA	(76)
CATTAG	AATCGG	XIII (207)	GAACAG	GTGCAG	(80)
CTATAG	GAAGAG	XIV (198)	TAG		

Identificación del sitio de inicio de la transcripción

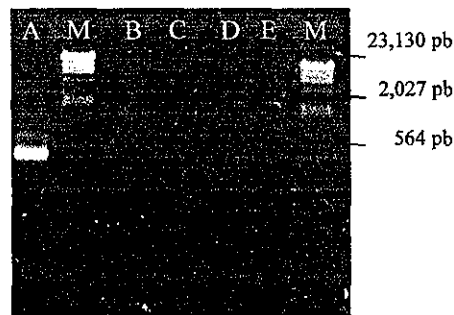
La integridad del RNA total purificado a partir de cisticercos de *T. solium* se verificó mediante electroforesis y tinción con bromuro de etidio. Se observaron dos bandas nítidas que corresponden a las dos especies ribosomales más prominentes de 28S y 18S (Figura 22), lo que confirma que la muestra no sufrió degradación durante su preparación. Este RNA se utilizó para los ensayos de 5'RACE y de extensión del oligonucleótido.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 22. Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio que muestra alícuotas del RNA purificado por TRIZOL y columnas de RNeasy. Cada carril contiene 10 µg de RNA total de cisticercos de *T. solium*. Se pueden observar las especies ribosomales 28S y 18S.

Se llevaron a cabo dos ensayos diferentes de 5' RACE utilizando combinaciones diferentes de oligonucleótidos. Para el RACE-A se utilizaron los oligonucleótidos G, Race3 y E' que se unen 419, 367 y 291 pb corriente arriba del codón de inicio de la traducción (ATG) (ver más adelante). El oligo G se utilizó para sintetizar el cDNA específico para la paramiosina, el oligonucleótido Race3 se utilizó para amplificar el producto del RACE y el oligonucleótido E' sirvió para reamplificar el producto de la PCR. Para verificar que el cDNA sintetizado es específico para la paramiosina, se amplificó la región comprendida entre los oligonucleótidos X1 y Race3 como control, resultando en un producto con el tamaño esperado de 386 pb (Figura 23 carril A). El carril B (Figura 23) muestra el cDNA tratado con TdT amplificado con los oligonucleótidos AAP y Race3, dando como resultado un producto de aproximadamente 700 pb. Este resultado sugiere que el sitio de inicio de la transcripción se encuentra localizado a una distancia aproximada de 300 pb del codón de inicio de la traducción. Como control se amplificó cDNA, que no fue tratado con TdT, con los oligonucleótidos AAP y Race3. Los carriles C, D y E muestran reacciones a las que sólo se agregó uno de los oligonucleótidos con el fin de descartar amplificación inespecífica. Como se esperaba, no hubo reacción en ninguno de los ensayos control.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 23. Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio que muestra los productos de 5' RACE-A. A. cDNA amplificado con los oligonucleótidos X1-RACE3; M Marcador de peso, fago lambda digerido con *Hind* III; B, cDNA tratado con TdT y amplificado con los oligonucleótidos AAP-RACE3; C, cDNA sin tratamiento con TdT amplificado con los oligonucleótidos AAP-RACE3; D, cDNA tratado con TdT y amplificado con el oligo AAP; E, cDNA tratado con TdT y amplificado con el oligo RACE3.

Para verificar el resultado obtenido en el RACE-A se repitió el ensayo utilizando un juego diferente de oligonucleótidos. En el RACE-B se utilizaron los oligonucleótidos X6, Race1 y Race2 localizados a 789, 774 y 714 pb río arriba del codón de inicio. Con el oligo X1 se sintetizó el cDNA específico para paramiosina y los oligonucleótidos Race1 y Race2, se utilizaron para amplificar y reamplificar respectivamente el producto del RACE-B. Se verificó que el cDNA

sintetizado fuera específico para la paramiosina, amplificando la región comprendida entre los oligonucleótidos X1 y Race3, resultando en un producto con el tamaño esperado de 700 pb (Figura 24 carril A). En esta ocasión se predijo que el tamaño del producto del RACE debería ser de aproximadamente 1,100 pares de bases, predicción que se confirmó al obtener un producto de alrededor de 1,100 pb al amplificar el cDNA tratado con TdT (Figura 24, carril B). Con este resultado se confirmó que el sitio de inicio de la transcripción se localiza a unos 300 pb del sitio de inicio de la traducción. Los controles fueron los mismos que para el RACE-A, y a diferencia de éste, en el RACE-B se observaron algunos amplificados muy pequeños que migraron cerca del frente del corrimiento (Figura 24, carriles C, D y E). En el caso del PCR, donde sólo se agregó el oligo GSP2, aunque se observó un fragmento inespecífico de unos 300 pb, no se observa ninguna banda en la región de las 1,000 pb (Figura 24 carril F).

Como el producto de los ensayos de RACE fue escaso, en cada caso se prepararon reacciones de reamplificación y de estos ensayos se eligió el producto de 300 pb del RACE-A para subclonarlo en el vector pCR2.1. De la subclonación se aislaron ocho clonas que contenían el inserto (Figura 25) y se secuenciaron.

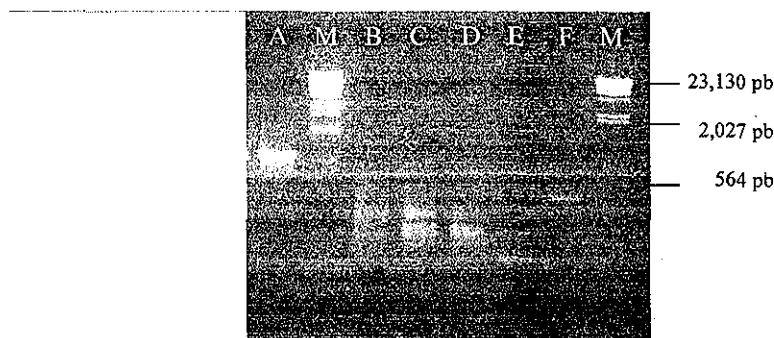


Figura 24. Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio que muestra los productos de 5' RACE-B. A. cDNA amplificado con los oligonucleótidos X1-RACE1; M Marcador de peso, fago lambda digerido con *Hind* III; B, cDNA tratado con TdT y amplificado con los oligonucleótidos AAP-RACE1; C y D, cDNA sin tratamiento con TdT amplificado con los oligonucleótidos AAP-RACE1; E, cDNA tratado con TdT y amplificado con el oligo AAP; F, cDNA tratado con TdT y amplificado con el oligo RACE1.

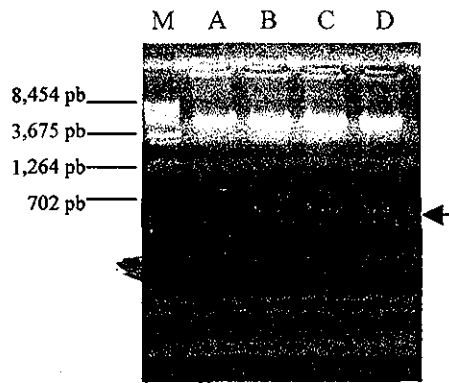


Figura-25. Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio que muestra la digestión del plásmido pCR2.1 transformado con el producto de 300 pb del RACE-A. M Marcador de peso, fago lambda digerido con *Bst*II A, plásmido pCR2.1 sin digerir; B-D, diferentes clonas de pCR2.1 digeridas con *Eco*RI. La flecha muestra el fragmento de aproximadamente 300 pb liberado por la digestión del plásmido.

De las ocho clonas que se secuenciaron, en seis se localizó el sitio de inicio de la transcripción 303 pb corriente arriba del codón de inicio de la traducción (Figura 26A), mientras que las otras dos, el sitio de inicio de la transcripción se localizó a 301 pb (Figura 26B) ó 306 pb (Figura 26C) del codón de inicio respectivamente. Para confirmar este resultado se decidió identificar el sitio de inicio de la transcripción utilizando un segundo método, el de extensión del oligonucleótido.

Para el ensayo de extensión del oligonucleótido se utilizaron los oligonucleótidos, REV0 y REV1, los cuales se marcaron radiactivamente para usarse como iniciadores en la síntesis de cDNA. Aunque ambos oligonucleótidos se marcaron adecuadamente, sólo REV1 permitió obtener productos en el ensayo de extensión. El cDNA resultante se corrió en un gel de acrilamida junto a una reacción de secuencia preparada con REV0. La figura 27 muestra un fragmento del gel de secuencia donde se localizan dos productos de la reacción, que difieren entre sí por una base. El tamaño de los productos se calculó usando la reacción de secuencia con REV0 como referencia y contando el número de bases desde el oligonucleótido hasta el sitio donde migran los productos con respecto a la secuencia. El tamaño de ambos productos es de 133 y 135 pb respectivamente.

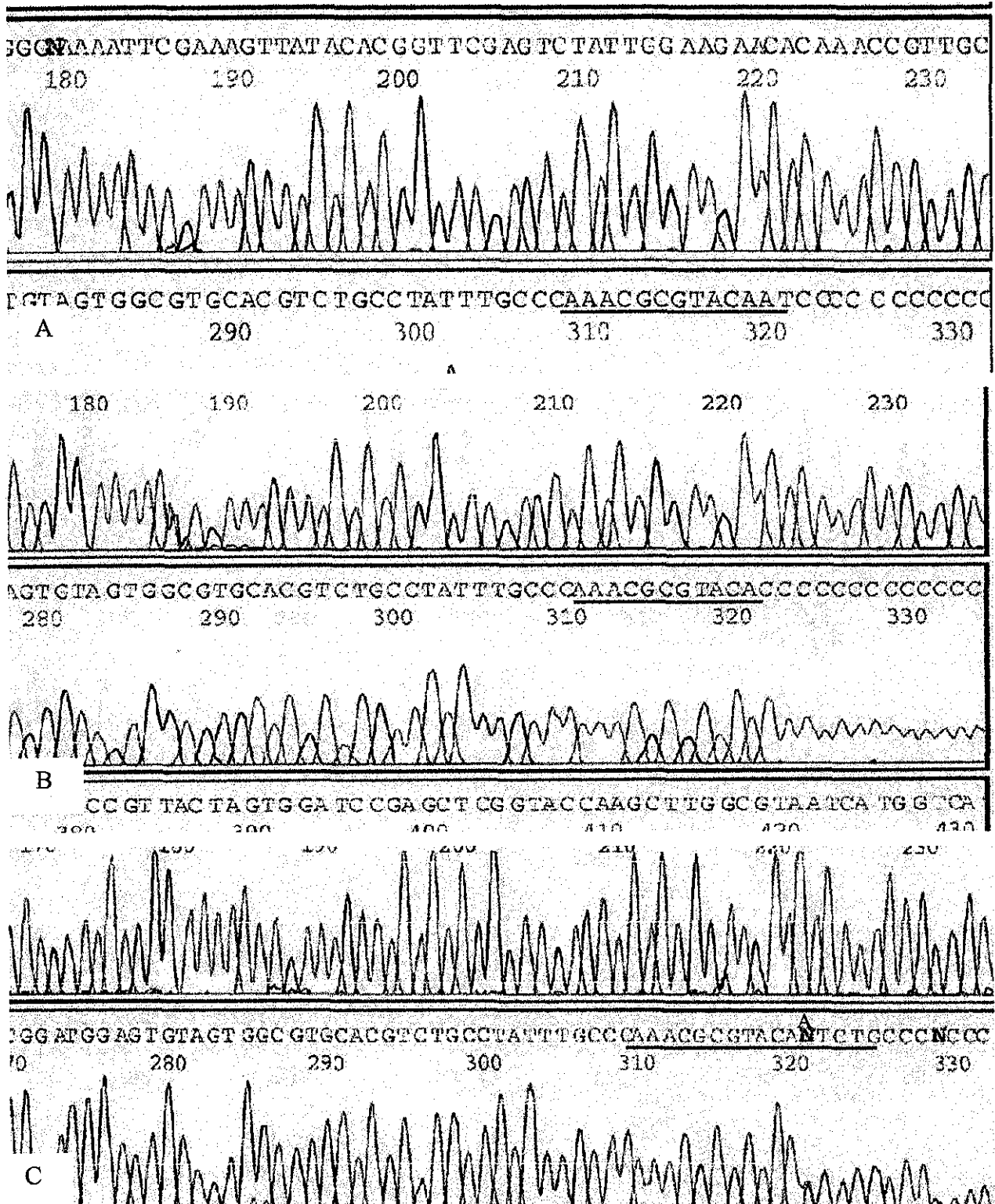


Figura 26. Electroferograma mostrando los resultados de la secuenciación de tres distintas clonas de pCR2.1 que contienen el fragmento de 300 pb producto del *RACE-A*. A. Clona que ubica el sitio de inicio de la transcripción 303 pb río arriba del codón de inicio de la traducción. B. Clona que ubica el sitio de inicio de la transcripción en la posición 301 pb. C. Clona que localiza el sitio de inicio de la transcripción en la posición 306 pb. Se muestra subrayada la región adyacente a la cola homopolimérica dC.

A partir del oligonucleótido REV1, el sitio de inicio de la transcripción se encuentra 133 ó 135 pb río arriba, ubicación que coincide con la localización que se hizo previamente mediante 5'RACE, confirmando un sitio de inicio de la transcripción centrado entre las posiciones 302 y 304 corriente arriba del sitio de inicio de la traducción.

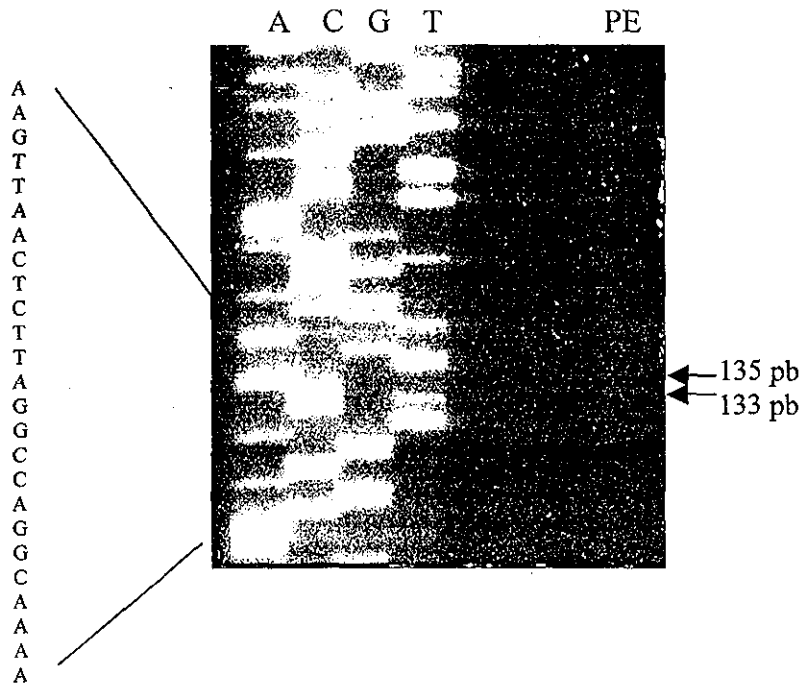


Figura 27. Fragmento del gel de secuencia que muestra la ubicación de los fragmentos del ensayo de extensión del primer con respecto a la secuencia de DNA preparada con el oligo REV0. PE, cDNA producto de la extensión del oligonucleótido. Las flechas señalan la ubicación de los productos.

La figura 28 muestra la secuencia corriente arriba del codón de inicio, e indica el sitio de inicio de la transcripción. Además se muestra la posición de los principales oligonucleótidos utilizados tanto para el 5' RACE como para la extensión del oligonucleótido, así como algunos elementos potenciales del promotor.

TTCTTTTGAA CAAAATTGG AGTTTTCAAC TTTAATTCTT CACTGTGCAT TTCCCAAAA -1018
 Ebox GCCACGGAAA GGTCTGCTTC AAGCGAACTT GACAGTAGCA AGTGCAGTCT GAAGCTCTCT -968
 Ebox AATGTGGAAG GGCGACATGG ATTGAGGTCA GTGGATGCAT AGGCAAGTGT CGCCTAGGTG -898
 ATACGGAACA CAGCTACACC CTGTTTCTGA ATTTAACAGT GCACGCCCAC AGTGCACGCC -838
 Ebox CCATCCATGT AGCGACAGCA AGTGTGAGTT GAAGGAGAAT GGAGGGGGGT GATGCTTAAG -778
 ACGCCAAGTA AATTAGAATT GGTCTTCAGT ATGTAGACCA CCTCGAGGTA AGGGTAGACC -718
 GCATTTAACA GTCCACTTCG ATCTCTACTT CCCAAAATCA ACCCTCTTAG TTGACTGTTT -658
 TTAGAAACCA TCTGCGTGCA TGATAGAAAT GATGGCATTT AAGGGGTGG GGCATCCCTC -598
 CGAGGTGCTG AATATCACAG TCATGGCATT GGGCGGTTGT GCGTGTGTGC ACGTGTGTAC -538
 ACTCGGGTCT TTCGCGCACA GACACTGGGC GACCAATGGG CGACAAGCTA CCCATCGATT -478
 GCTCCGCGGT GTCACGCCTG TATGCGCCGG ATCGTGCGGC AGTGTGCAC AGTGTGATCG -418
 CCAAT TGCGTACAGC TTTATCGATT TGCAGTGGAA CGGGCAGTGT TTTGGGGCAA TCGG GAG -358
 GGAGAGGAAC GGCGATTTCT GATAAACTCT GGTATTGGCC CGGCCGACGG GAG GTA -298
 CGCGTTTGGG CAAATAGGCA GACGTGCACG CCACTACACT CCATCCAGGA CTCGTTCTCG -238
 CTCTCCAGCT TTTGATCCCT CTGCAACGGT TTGTGTTCTT CCAATAGACT CGAACCGTGT -178
 REV1 ATAACCTTTCG AATTTTCCCT GTGACTGCTT TGACTAGGAA AGGAATTTTC TGAGCGGTTCG -118
 CCAAT CATTCAA TTG AGAATCCGGT CCGTTTTCTG ACTTTCGAAT CTACTTCACG CACACAACCA -58
 Ebox ATCCATTGCG CAGCTGCGCT GATTCACCAC AAAACGGGAC CTATCAGAGA CGAAGAC G 3
 X1, REV0 TCTGAATCAC ACGTCAAAAT TTCTCGTACC ATCATACGCG GGACTTCCCC AAGTACTGTT 63
 CGACTTGAGA GTCGCGTACG AGAACTGGAG GACCTGCTCG ATCTTGAGCG AGATGCTCGC 123
 GTCCGGGCTG AACGCAATGC CAACGAGATG AGCATTACG TGGACACCAT GGCTGAACGT 183
 CTTGACGAAT TGAGTGGTAC TTCCTCTCAG ACTCACGATG CTATTCGCCG TAAGGATATG 243
 E' GAGATCTCGA AGCTGCGCAA GGATCTGGAA AATGCCAACG CTGCTTTCGA AACTGCCGAG 303
 GCCACTCTGC GCCGCAAACA CAACACCATG ATCTCCGAGA TCTCCAGCGA GGTGAGAAT 363
 RACE3 TTGCAGAAGC AGAAGGGCAG GGCAGAGAAG GACAAGAGCC AGCTCATGCT TGAAATCGAT 423
 G AACGTCTTTG GTCAACTTGA TGGCGCTTTA AAGGCCAAGG CCTCAGCGGA GAGCAAACCTG 483
 GAGGGCTTGG ACAGCCAGCT GACGCGCTTG AAGGCGCTGA CCGACGATCT TCAACGCCAA 543
 ATGGCCGACG CTAACTCTGC CAAGTCGCGT TTGGCCGAG AGAACTTCGA ATTGGTTCGC 603
 GTAAATCAGG AGTATGAAGC ACAAGTCGTC ACCTTCTCTA AGACAAAGGC CGCTCTTGAA 663
 RACE2 AGCCAGCTGG ATGACCTTAA ACGGGCCATG GATGAAGATG CACGCAATCG CCTAAGCCTT 723
 RACE1 CAAACACAGT TGTCGAGTCT GCAAATGGAC TACGACAACC TGCAAGCACG TTACGAGGAG 783
 X6 GAAGCCGAGG CAGCCGAAA TCTGCGCAAC CAAGTTGCCA AATTCAACGC CGATATGGCT 843

Figura 28. Localización de los elementos potenciales del promotor del gen de paramiosina de *T. solium*. En rojo se indica el codón de inicio de la traducción al cual se identifica en esta figura con el +1. En amarillo se indican los oligonucleótidos utilizados en el 5'RACE y el ensayo de extensión. Los oligonucleótidos X1 y X6 que definen el tercio amino del gen se muestran subrayados en verde. Las secuencias consenso para cajas CCAAT se encuentran subrayadas en azul marino, las regiones ricas en GC en azul turquesa, las regiones ricas en AT en rojo oscuro y las secuencias consenso para cajas E en anaranjado. Los sitios 301, 303 y 305, identificados como sitios de inicio de la transcripción, se muestran subrayados en rosa, mientras que las posiciones 302 y 304 identificadas en el ensayo de extensión del primer están subrayadas en morado. La zona subrayada con rosa indica un sitio potencial Inr o CAP. Las bases subrayadas en gris indican la posición de los productos de extensión del oligonucleótido a partir de la secuencia obtenida con el oligo REV0.

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Identificación de elementos del promotor

El análisis de la región río arriba del codón de inicio permitió localizar elementos potenciales del promotor (figura 29) (Bucher 1990). En la región río arriba del gen de la paramiosina se identificaron dos regiones potenciales TATA 319 (-622) y 445 (-748) pb corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción (figura 28). Normalmente la caja TATA suele localizarse a tan solo 15 a 25 pb arriba del sitio de inicio de la transcripción, por lo que las regiones 319 y 445 no parecen formar parte de esta estructura. La secuencia iniciadora Inr normalmente se encuentra situada sobre el propio origen de la transcripción, 3 pb arriba del sitio de inicio y 5 pb río abajo. A esta secuencia también se le conoce como señal CAP y se localiza en el sitio de inicio de la transcripción en alrededor del 60% de los genes. De los múltiples sitios potenciales, uno coincide con la localización del inicio de la transcripción del gen de la paramiosina, en la posición 307 corriente arriba del ATG (figura 28). En el Inr, la base que comúnmente se encuentra al principio de la transcripción es una adenina, y en la secuencia de la paramiosina, se localiza una adenina en el sitio de inicio de la transcripción (-303). Algunos trabajos recientes han mostrado que en los genes que no tienen una caja TATA, la secuencia Inr actúa en forma análoga, a través de su interacción con el complejo TFIID es capaz de dirigir la transcripción basal de la RNA polimerasa II, determinando el sitio preciso de inicio de la transcripción (Purnell et al 1994, Kaufmann y Smale 1994). Dentro de las secuencias caracterizadas para el promotor proximal, las dos más características son la caja o secuencia CAAT normalmente localizada -60 a -80 pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción (Santoro et al. 1988) y la caja GC, que aparece como copias múltiples en ambas orientaciones y lados de la caja CAAT. De las cinco cajas CAAT identificadas, una se encuentra situada a una distancia apropiada del sitio de inicio de la transcripción (a 65 pb, -368). Los elementos CAAT pueden ser reconocidos por diferentes factores de transcripción. En algunos casos pueden estimular la transcripción, mientras que en otros pueden reprimirla (Dorn et al 1987). Se identificaron seis posibles cajas GC, de las cuales solo una parece estar cercana al sitio de inicio de la transcripción (a 267 pb del sitio de inicio (-570). Las cajas E (CANNTG) han sido propuestas como sitios consenso de unión para factores de transcripción, de la familia MyoD, específicos de proteínas musculares (Olson 1990), en la región corriente arriba del gen de la paramiosina se identificaron cuatro posibles cajas E a 515 (-818), 610 (-913) y 685 (-988) pb corriente arriba del inicio de transcripción y una más 257 (-47) pb corriente abajo del mismo sitio

(figura 28). Como no todos los tipos musculares expresan MyoD, es posible que otros factores adicionales estén involucrados en la regulación de la expresión de genes musculares (Thompson et al 1991, Navankasattusas et al 1992, Shimizu et al 1993).

ANÁLISIS PARA IDENTIFICAR ELEMENTOS DEL PROMOTOR EUCARIOTA

Resultados para la búsqueda de la caja TATA

Valor de referencia: -8.16

No.	De	A	Secuencia	Valor
1	758	772	GTATGTAGACCACCT	-7.33
2	884	898	GCATTTAAGGGTTG	-6.21
3	1637	1651	CTTTTAAATGGCGT	-7.21



Resultados para la búsqueda de la señal Cap

Valor de referencia: -3.75

No.	De	A	Secuencia	Valor
60	1136	1143	GCAATCGG	-3.29
61	1200	1207	GCAGATTG	-2.41
62	1227	1234	GCAGACGT	-1.78



Resultados para la búsqueda de la caja CCAAT

Valor de referencia: -4.54

No.	De	A	Secuencia	Valor
1	1139	1150	ATCGGCCAATGG	-2.28
2	1442	1453	CACAACCAATCC	-4.32
3	3419	3430	TTTGCCCAATGA	-3.33
4	5233	5244	TCTTGCCCAATGA	-3.63
5	6692	6703	TCTTACCAATGA	-4.24



Resultados para la búsqueda de la caja GC

Valor de referencia: -4.9

No.	De	A	Secuencia	Valor
1	937	950	ATTGGGCGGGTGTG	-4.08
2	5333	5346	AAGGGCAGGTCCG	-3.28



Figura 29. Elementos potenciales del promotor. Las flechas indican las secuencias mencionadas en el texto. El análisis se llevó a cabo sobre la secuencia completa de la región corriente arriba del codón de inicio de la traducción, de las bases 1 a la 1,506.

Comparación de la paramiosina de *T. solium* con otras paramiosinas

Se compararon las secuencias de aminoácidos de las paramiosinas de 9 especies diferentes. Para ello se calcularon las distancias con el programa MEGA (Kumar et al 1993) que determina la identidad y similitud entre las secuencias, la que varía desde 96.5% entre *T. solium* y *E. granulosus* hasta 34.5 y 30.8 % con las de *D. melanogaster* y *C. elegans*, respectivamente (cuadro 7).

Cuadro 7. Identidad en la secuencia de aminoácidos de varias paramiosinas. Los valores representan porcentajes. Platyhelminthes: *T. solium*, *Echinococcus granulosus*, *Schistosoma japonicum* y *S. mansoni*; Mollusca: *Mytilus galloprovincialis*; Nematoda: *Anisakis simplex*, *Brugia malayi*, *Onchocerca volvulus* y *C.elegans*; Arthropoda: *D.melanogaster*.

	<i>E.g</i>	<i>S.j</i>	<i>S.m</i>	<i>M.g</i>	<i>A.s</i>	<i>B.m</i>	<i>O.v</i>	<i>C.e</i>	<i>D.m</i>	Accession No.
<i>T. solium</i>	96.52	73.04	72.23	48.35	30.23	31.14	31.71	30.76	34.54	AYO34087
<i>E.granulosus</i>		73.40	72.36	51.33	31.96	31.66	32.28	31.84	34.65	Z21787
<i>S.japonicum</i>			96.19	52.00	33.25	32.48	33.22	32.83	32.45	D28811
<i>S.mansoni</i>				51.88	32.77	32.13	32.75	32.36	32.56	M35499
<i>M.galloprovincialis</i>					35.40	35.56	36.82	34.64	34.33	BAA36517
<i>A. simplex</i>						89.50	91.19	85.95	47.35	AF173004
<i>B. malayi</i>							95.67	87.34	47.15	AAC18613
<i>O. volvulus</i>								88.98	47.66	A48575
<i>C.elegans</i>									48.90	XO8068
<i>D.melanogaster</i>										X58722

A partir de la alineación de las secuencias de aminoácidos de las paramiosinas se construyó un árbol filogenético utilizando el algoritmo de Neighbor-Joining. El árbol resultante se muestra en la Figura 30. Es interesante observar como el alineamiento de las paramiosinas permite separar claramente al grupo de los platelmintos (que agrupa en dos ramas separadas a los céstodos y los tremátodos), de los moluscos y los nemátodos. Además, en el grupo de los nemátodos se distinguen los parásitos y los de vida libre.

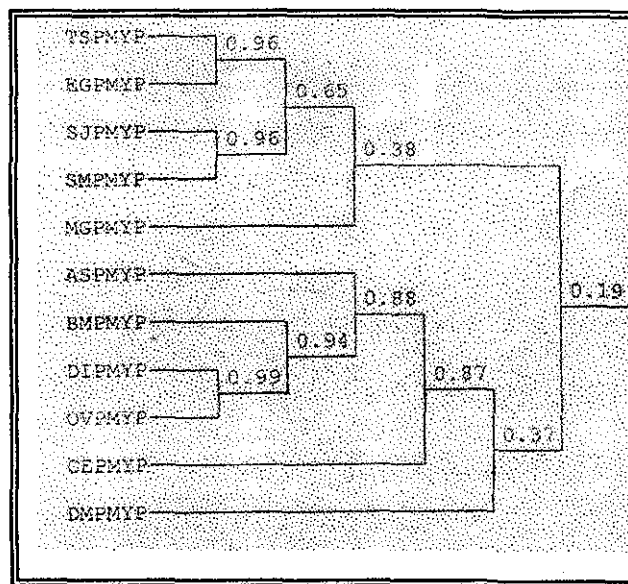


Figura 30. Árbol filogenético construido a partir de la alineación de las secuencias de aminoácidos de las paramiosinas utilizando el programa MEGA. Las distancias entre las secuencias se calcularon con la fórmula de Distancia-P y el árbol se construyó con el algoritmo de Neighbor-Joining con un Bootstrap de 1,000 réplicas.

Comparación entre genes de paramiosina

La secuenciación de la clona genómica mostró que el gen de la paramiosina de *T. solium* tiene una longitud de 6,106 pb desde el codón de iniciación hasta el codón de terminación y se encuentra dividido en 14 exones interrumpidos por 13 regiones no codificadoras, que en total comprenden un 57% del gen estructural. Los únicos genes de paramiosina para los cuales también se conoce su secuencia genómica son los de *D. melanogaster* (Maroto et al. 1995) y *C. elegans* (Kagawa et al. 1989). El gen de *D. melanogaster* tiene 9,003 pb y se encuentra organizado en diez exones, nueve de los cuales codifican para la paramiosina. Un exón (exón 1B) localizado entre los exones siete y ocho, codifica para el extremo 5' del gen de la miniparamiosina, una isoforma que se sintetiza por escisión alterna del RNAm. Ambas proteínas comparten los dos últimos exones del gen, y cada una cuenta con un promotor distinto. Las secuencias no codificadoras de *D. melanogaster* comprenden el 70% de su secuencia. El gen de la paramiosina de *C. elegans* tiene una longitud de 11,432 pb y comprende once exones y 10 intrones, estos últimos representan el 76.0% de la secuencia. Con el fin de comparar la estructura del gen de paramiosina en estos tres organismos, se alinearon las secuencias de aminoácidos, agrupándolos por exones, utilizando para ello el programa MEGA. El resultado de este alineamiento se presenta en la Figura 31.

La comparación de la estructura de los genes entre *T. solium* y *D. melanogaster* mostró que el tamaño de los exones II-IV es idéntico mientras que los demás exones parecen haberse fusionado o escindido. La comparación con la estructura de *C. elegans* muestra que los exones II y III de *D. melanogaster* corresponde a los exones III y IV del nemátodo, mientras que el exón IV corresponde a los exones V y VI de *C. elegans*. Es interesante notar que la secuencia del exón 1B, específico para la miniparamiosina no está presente en ninguna región (exón/intrón) de las secuencias de paramiosina de *T. solium* ni de *C. elegans*. De hecho, los exones VII y VIII del gen de paramiosina de *D. melanogaster*, los cuales flanquean al exón 1B, se encuentran fusionados en un solo exón en el gen de *C. elegans*.

Alineamiento por Exones

<p> SSSQAVRSKSKYSYRATSTGPGTADVNIYIQ.....DISSLSRLE ERLESLEPLELMERMELQELLIVSLESKSPSOAAFQAFPGSMSVADLGSILTRLE SESHVKISRTIIRGTSPSTV.....RLE </p>	<p> D.m. Exon 1 41AA C.e. Exon 1/2 29/26AA T.s. Exon 1 24AA </p>
<p> DKRRLDQDLEVEREISQK DKRRLDQDLEVEREISQK SRVLEEDLLDLERDARVR </p>	<p> D.m. Exon 2 19AA C.e. Exon 3 19AA T.s. Exon 2 19AA </p>
<p> IEFEKADLSVYVQMSERIEEATSGAEOH VERERADLSVQVHALTDRIEDALSTTDSQ AERNANEMSIILDTMAERIDELSCISSQT </p>	<p> D.m. Exon 3 29AA C.e. Exon 4 29AA T.s. Exon 3 29AA </p>
<p> FANPKRDAALKLRRLLEDVHIESSETTLLEKKHNEITDFQEQVITNKKA IQSNKREGESKLRRLLESQSESADAMNVLRKQDSCLDYDQIEQOKNA HDALRKMFIKLRADLENANAAFTEATLRKNTMSEISSEVENLOKNG </p>	<p> D.m. Exon 4 55AA C.e. Exon 5/6 37/18AA T.s. Exon 4 55AA </p>
<p> RAEKYAKFOTEVYRISQIESYNKEIVSERHISKLEVSISENVKIEEIRTM KIDRERQRVQHEVIRITATIDQLQNDHTAEKAAERFPAQANLANKVEDLNKHV RAKKDKSQLMLEIDNVVIGLDGALKAKASAEKSKLEIGDSOLTRIKALTDDEOROM </p>	<p> D.m. Exon 5 291AA C.e. Exon 7/p9 74/35/182AA T.s. Exon 5/9 27/82/65/45/72AA </p>
<p> IISSHRSRISQENIETKDVODLVQLEIVSFSKQVISQIEDARREDEDR NELAQQRQLQAEENDLKEVHDQVQEDNLQHVYITLQDIEEARREDEAERE AAANSAKSLAARENFEIVRVNQEYEAQVVIFSKTAAAEKSIDDLKAMDEDARN </p>	
<p> RSLESSRHOVEIFLQSVRNQIEEESARIDIERQIVKANADATSWONKWNSEVA RSQLOSOLHOVQLELQSVRTALDEESIARSLAEBHKINLANTEITQWKSQFDAEVA RLSLOTQSSLOMDYENLQARYEESAABAAGNIRNOVAKFNADMAALKTRLERELM </p>	
<p> ARAEVEEIRRRKYQVRIEIEEHEESLIVKVMNLEKMKTRDASSVEVITIDLEKS LHHEEVEDRRKMLQQAAYEQEIMLOKISQLEKANSREQSEVEVIVDLEKA AKTEEFELKPKLTVRIEEDMAAHERTRANLEKTKVKITLIDKIQAEAL </p>	
<p> MNSCRELTKSVNTIEKHNVELKSELDETIILYTISORDIKNKHADIVRTVHIELDK QNTIALERAREQIERQVGLKVRIDEIIMVELBAAQREIRAVNDELQMKHLYEK AAENGELTHRANAENLANELORRIDEIMIVEINILNSANSALEIDNMRLKGVGD </p>	
<p> VKDNNNQITRENKKLQ AVEQKEALARENKSLH LTDRIANIDRENROIG </p>	
<p> EDHHAAGAINELNRRLIEEIEELRRINEERDELTAAAYKTH-ER EMHHAENEPLAVANPKHELDLENARLAGEIRELQTAKEA-D QOKKETISHERDANERLTDLEALRSQEAERDNHASLHDHEE </p>	<p> D.m. Exon 6 43AA C.e. Exon 9 43AA T.s. Exon 10 44AA </p>
<p> GRK-ASEQRGQRADAFNQYRHAERRLAEKDEEIEAI QRDAENRAQRALHELQALRIEMERLQEKSEMEEAI LKEMEAKYVASQNLNHLKSEMEQ-RLREKDEELENL </p>	<p> D.m. Exon 7 36AA C.e. Exon 9 37AA T.s. Exon 10 36AA </p>
<p> RKQTSIEIEQINARVIEAETRLKTVTEIKKLOIQITELEMSLEVANKTIDLO RKNLQFEIDRIHAALADAEAKMSEIISERKKNYQAEIAELEMTVINLNRAIEAQ RNSHTRTIEEETTTISEMEVREESDMSRISKMEATISELEVQIVANKAVNIN </p>	<p> D.m. Exon 8 206AA C.e. Exon 9/11 48,44,114AA T.s. Exon 11/12 164/42AA </p>

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

KVTKKOSLOTELOAHYELVOROLOATIDOVAVAKRLAGNGEVEVSHLISA
 KTKKROSEQKILQASTEDTOROLOOVLEDOYALAGKVAALSAELEECKTALDNA
 RENKTLAORVOELQAALDERRAREAAESNLOVSEKRIALASEVEEIRSOLELS

NRARKTVELQYEEAASRINELITANVSVSTKSKLEQELSYVASLYEEVSKELRI
 IRARQOAEVDLLEEANGRISDIIISIMNETSINKKLETELSTACALDEVTKELHA
 DRARKNAESELNDANGRISELILSVNTLINDSRRLGDIIGVMOGELTEAVNARKA

SDEYQKVQVELKHVVLEQVHLEOERIVKLETIKKSLEVEVK
 ADERANRALADAARAVEQHEEOHSMKIDALRASLEEQVK
 AEDADRLNAEVLRLADELROCOENYKRASTIRKOLEIIR

NLSIRLEEVELNAVAGSKETISKLEARIRDELELEEEKRRHAFIIKIIRKKTERT D.m. Exon 9 158AA
 QLOVQIQEAFAAALLGCKKVIKLETRPELELTALEDETRKKEIQNALPKKDRR C.e. Exon 11 147AA
 EITVKLEEFATAFATREGRMVOKLQNVRELEADVGEIRRAKEAFANAKHYERO T.s. Exon 12/13/14
 25/69/65AA

VKEVLVQCEEEQKNLILLOALDKSANKINLYRROLSELEGVSOOITTRVYRFOR
 IREVOQLVDEEHKAFVMAQNTARLREKLNQKQOLAESSEVTMONLQVRYCH
 FKELOTQSEDDKRMILELQLEKTOIKMKAKKROLEEQEVSQLIMSKYKKAQ

ELEEAEDRADTAESSINIRAKHRTFVTTISTVPGSQVYIQETTRTITE
 ELEDAGRADQAESSLHLRAKHSVMVIGKSSSKVF
 QIEEAHKAALMAERTITIKKTIGGPGSRAVSVVREINSVSRGNRATSIM

Figura 31. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos deducida a partir de las secuencias reportadas para las paramiosinas de *Drosophila melanogaster* (D.m.), *Caenorhabditis elegans* (C.e.) y *Taenia solium* (T.s.). El alineamiento se elaboró utilizando el programa MEGA. Las zonas en negro indican las zonas conservadas para todas las secuencias, mientras que en gris se muestran aquellas compartidas por algunas de las secuencias, y en blanco las diferentes. En la columna derecha se indica a que exones corresponde cada alineamiento y el número de aminoácidos que conforman ese exón.

En el caso de *T. solium*, aunque ambos exones están separados e integrados a los exones X y XI de *T. solium*, el intrón que separa estos dos exones es tan pequeño (244 bp) en comparación con el intrón de *Drosophila* (aproximadamente de 4,000 pb) que no deja espacio para contener la secuencia necesaria para codificar para una isoforma de la proteína. Así que para el caso de la miniparamiosina, o no se encuentra expresada en todos los invertebrados ó es transcrita de algún otro gen aun no identificado en *T. solium* y *C. elegans*.

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

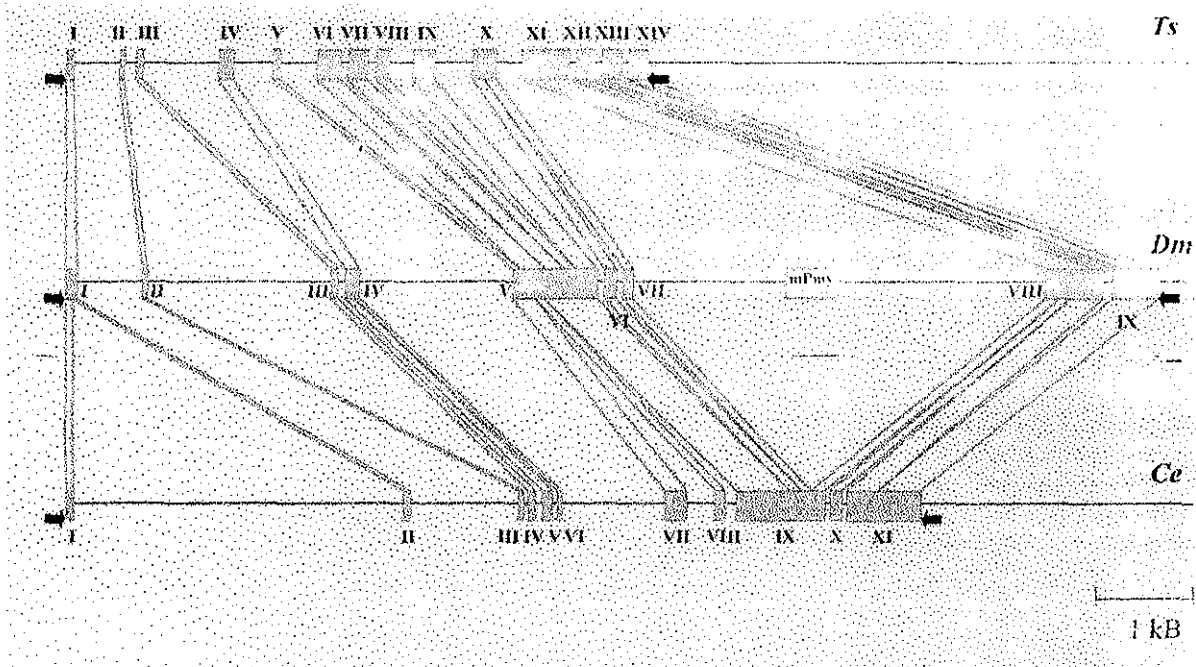


Figura 32. Estructura de los genes de paramiosina de *T. solium* (Ts), *D. melanogaster* (Dm) (Maroto et al. 1995) y *C. elegans* (Ce) (Kagawa et al. 1989). Los exones están representados por cajas y los intrones por líneas. La homología entre las regiones codificadoras se indica por líneas que unen a los exones. Las flechas indican los codones de inicio y terminación.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DISCUSIÓN

Una de las grandes interrogantes surgida durante el estudio de la paramiosina y su posible papel en la vacunación, ha sido el hecho de que se trata de una proteína muscular para la cual no se ha encontrado un péptido señal que indique su posible secreción al medio exterior. La ausencia de un péptido señal en la secuencia de la paramiosina, descarta la idea de que se trate de una proteína secretoria (Laclette et al. 1991), y si la paramiosina no se encuentra en la superficie del parásito o es secretada, es difícil explicar la inmunidad protectora. En el caso de la esquistosomiasis, se han sugerido diversas hipótesis para explicar su importancia como antígeno. Por ejemplo, en esquistosómulas de *S. mansoni*, se reportó una respuesta específica de células T en contra de paramiosina, lo que sugiere la liberación de epítomos de paramiosina (Pearce et al. 1988). Otra posibilidad es la reactividad cruzada con otras proteínas parecidas a la paramiosina. Se ha reportado reacción cruzada entre la paramiosina y la GP38, una glicoproteína de membrana que es liberada por la esquistosómula y que tienen un alto grado de homología en su secuencia de aminoácidos con la paramiosina. La GP38 podría ser el blanco de superficie contra el cual se desarrolla la respuesta inmune en la vacunación con paramiosina, ya que es capaz de inducir una respuesta inmune específica, mediada por anticuerpos y células T, en contra de paramiosina (Sher et al. 1989). Otro antígeno de 200kDa (IrV5), que también se encuentra en la superficie de la esquistosómula y que tiene homología parcial con secuencias de la cadena pesada de la miosina, muestra reactividad cruzada con anticuerpos contra paramiosina (Amory Soisson et al. 1992). Una explicación menos plausible sería que durante el recambio constante del tegumento, se podría liberar paramiosina al medio de manera pasiva, o la paramiosina podría ser liberada a través de regiones dañadas del tegumento. Otra posible explicación sería la existencia de isoformas alternas de paramiosina, que puedan llevar a cabo distintas funciones a las descritas para la paramiosina estándar.

Muchas proteínas musculares existen como múltiples isoformas, dentro del mismo organismo o incluso dentro de la misma célula, y el desarrollo muscular está asociado con cambios en la expresión de éstas distintas isoformas (Caplan et al. 1983). Se han propuesto varias hipótesis para explicar el papel de estas isoformas en la estructura muscular. Por ejemplo, que las diferencias en la secuencia de aminoácidos entre isoformas, permite distintos tipos de asociación entre proteínas idénticas o con otras proteínas (Epstein et al. 1985), que las diferentes isoformas pueden exhibir distintas funciones en distintos ambientes biológicos (Barany 1967), que la expresión de un grupo de isoformas se encuentra coregulada con la expresión de otros genes o

por transcritos alternos del mismo gen (McKeown y Firtell 1981), o que en las familias de genes, en las cuales cada gen codifica para una isoforma, el efecto de las mutaciones deletéreas es menor (Greenwald y Horvitz 1980; Waterston et al. 1984). La expresión de isoformas distintas de proteínas musculares se debe a la existencia de familias de genes, la escisión alterna de mensajeros, o por modificaciones postranscripcionales. La diversidad puede aún ser mayor con la elección de sitios alternos de poliadenilación o por modificaciones postraduccionales (Smith et al. 1989; Bandman 1992; Fyrberg y Beall 1990). En *Dictyostelium* se han identificado 17 genes de actina que codifican para proteínas con la misma secuencia de aminoácidos, pero cuya expresión difiere considerablemente durante el desarrollo (McKeown y Firtell 1981). El análisis de la estructura de varios genes de actina sugiere la pérdida de algunos intrones a partir de un ancestro común que originalmente tenía muchos intrones (ver antecedentes) (Fyrberg et al 1981; da Silva 1993). En contraste, la gran diversidad de isoformas de tropomiosina, se genera por escisión alterna del RNAm a partir de un número limitado de genes (McLeod et al. 1985). La comparación de la organización de los genes de tropomiosina de *Drosophila* y mamíferos, sugirió la existencia de un gen ancestral que aparece antes de la separación de vertebrados e invertebrados (Lemmonier et al. 1990), lo que explica su gran conservación a lo largo de la escala evolutiva. En tremátodos, se demostró la conservación de epitopos entre la tropomiosina de *S. mansoni* y la de su hospedero gastrópodo *Biomphalaria glabrata* (Xu et al. 1989; Dissous et al. 1990; Weston y Kemp 1993; Weston et al. 1994), sugiriendo un mimetismo molecular como resultado de la adaptación genética al parasitismo (Damian 1987). En *D. melanogaster*, se reportó que el gen de tropomiosina II puede codificar para una isoforma muscular y otra citoplasmática (Hanke y Storti 1988). Los filamentos gruesos de *C. elegans* contienen dos isoformas de miosina, que son expresadas de manera diferencial a nivel transcripcional (Honda y Epstein 1990) y se han reportado isoformas no musculares (Guo y Kempfues 1996). En el caso de la paramiosina, ésta ha sido reportada como un gen de copia única en *C. elegans* (Kagawa et al. 1989), *Drosophila* (Vinos et al. 1991), *T. solium* (Landa et al. 1993) y *S. mansoni* (Gohr et al. 1995), aunque algunos reportes contradictorios sugieren la existencia de más de un gen de paramiosina en *S. japonicum*, además de que podría haber heterogeneidad entre los genes de distintas cepas (Hooker et al. 1995). En *S. mansoni*, *C. elegans* y *Drosophila*, se han reportado isoformas de paramiosina fosforiladas diferencialmente (Schriefer y Waterston 1989; Vinos et al. 1991; Deitiker y Epstein 1993; Schmidt et al. 1996) y en *D. melanogaster* se reportó una isoforma de bajo peso molecular,

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

la miniparamiosina, sintetizada a partir la de escisión alterna del mensajero de paramiosina (Becker et al. 1992; Maroto et al. 1995).

Para determinar si existen isoformas del gen de la paramiosina de *T. solium* que se sintetizan a partir de la escisión alterna del gen, se clonó y secuenció, a partir de DNA cromosómico, una región de 8 kb que contiene el gen completo de la paramiosina. La región codificadora se encuentra interrumpida por 13 intrones, que en los límites exón-intrón, presentan las regiones consenso descritas para sitios donadores y aceptores en la escisión de intrones (Senapathy et al. 1990). En la región corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción se identificaron varios elementos CCAAT, que son críticos en el funcionamiento de numerosos promotores eucariotas (Santoro et al. 1988), así como una probable caja GC. Ambos elementos suelen estar relacionados con la frecuencia con la que se produce el inicio de la transcripción y son reconocidos por los factores de transcripción CTF (o NF1) y SP1 respectivamente (Bucher 1990). También se identificaron cuatro posibles cajas E, propuestas como sitios consenso de unión de factores específicos de transcripción de la familia MyoD, (Olson 1990). Los factores de transcripción MyoD participan en la regulación de la transcripción de genes musculares. Aunque no fue posible localizar una caja TATA tradicional, el gen de la paramiosina parece contener una secuencia iniciadora (Inr) también llamada señal CAP. Tanto la caja TATA como la secuencia Inr permiten definir el punto de inicio de la transcripción. Debe aclararse que todos estos elementos son potencialmente reguladores y que para demostrar su actividad se requieren ensayos funcionales del promotor. No fue posible identificar una secuencia de poliadenilación convencional en el extremo 3' del gen. Sin embargo, es común que existan variantes para la secuencia consenso, como se ha reportado para *Schistosoma* y *Drosophila*. Una posible variante podría ser la secuencia (ATTAGA) localizada 504 pb río abajo del codón de terminación, justo 15 pb antes del sitio de poliadenilación. Es necesario identificar un mayor número de secuencias genómicas de *Taenia* para poder establecer la existencia de secuencias consenso de poliadenilación alternas.

El sitio de inicio de la transcripción del mRNA del gen de la paramiosina se identificó mediante ensayos combinados de 5'RACE y de extensión del oligonucleótido. El análisis de la secuencia del producto del RACE identificó tres posibles sitios de inicio de la transcripción (que difieren entre si en unos cuantos pares de bases), siendo el más común el localizado en la posición 303 pb río arriba del codón de inicio de la traducción. El ensayo de extensión del oligonucleótido confirmó dos de estos sitios. Llama la atención la existencia de dos posibles

sitios alternos para el inicio de la transcripción. Ambos sitios difieren entre sí por solo un par de bases, lo que explicaría el hecho de que en el análisis por Northern blot sólo se identificó un transcrito discreto de aproximadamente 3.6 kb (Landa et al. 1993). En el caso de *D. melanogaster* se reportaron dos posibles sitios de inicio de la transcripción para el gen de la paramiosina, adicionales al sitio de inicio descrito previamente. Estos dos sitios de inicio también difieren entre sí por un par de bases (Vinós et al. 1992; Maroto et al. 1996). Faltaría comprender el papel que desempeñan dos mensajeros con secuencias que varían en unos cuantos nucleótidos.

La comparación de las secuencias de aminoácidos predichas para las nueve paramiosinas analizadas muestra una clara correlación entre la identidad de la secuencia de aminoácidos y la distancia filogenética entre las especies, como por ejemplo, la cercana relación entre los nemátodos y los artrópodos (Aguinaldo et al. 1997). Más interesante aún resultó el análisis comparativo entre las estructuras de los genes de paramiosina de *T. solium*, *D. melanogaster* y *C. elegans*, ya que aunque los exones II y III son idénticos en tamaño entre las tres especies, y el exón IV lo es entre *T. solium* y *D. melanogaster*, la mayoría de los exones parecen haberse fusionado o fragmentado entre las tres especies. Esta falta de conservación en la organización general de la estructura del gen contrasta con lo reportado para la tropomiosina, en donde la organización de los exones se conserva entre vertebrados e invertebrados (Hanke y Sorti 1988). Si consideramos que los platelmintos emergieron más tempranamente que el resto de los protostomados (Aguinaldo et al. 1997), la estructura de los tres genes sugeriría una tendencia a la disminución en el número de intrones durante la evolución de la paramiosina, de manera similar a lo propuesto para la actina (Fyrberg et al. 1981; da Silva 1993). Sin embargo, para corroborar esta hipótesis, sería necesario caracterizar la estructura de un mayor número de genes de paramiosina. Con la publicación de nuevas secuencias de paramiosina, provenientes de distintos grupos que han aparecido a lo largo de la evolución, quizás incluso sea posible establecer una fecha probable de origen del género *Taenia*.

En este trabajo, no se encontró evidencia de escisión alterna del gen de paramiosina de la *T. solium*. Además, la secuencia del exón 1B específico de la miniparamiosina, no se encontró en ninguna región (codificadora o no codificadora) de la secuencia del gen de paramiosina de *T. solium*. La comparación de la estructura de ambos genes muestra, que el exón 1B que se localiza en el intrón flanqueado por los exones VII y VIII en el gen de *D. melanogaster*, corresponde al intrón flanqueado por los exones X y XI en *T. solium*, de 244 pb de longitud. En esta región, no hay espacio suficiente para acomodar al exón de la miniparamiosina de 524 pb. La estructura del

gen de paramiosina de *C. elegans*, tampoco muestra evidencia de la existencia del exón 1B. Es posible que, a diferencia de la paramiosina, la miniparamiosina no se expresa en estos organismos o se transcribe de algún otro gen aún no identificado en *T. solium* y *C. elegans*.

Como se mencionó previamente, existe poca información sobre la organización genómica del género *Taenia* y sobre la regulación de su expresión génica, así como sobre los mecanismos de regulación de la expresión de genes en las distintas especies del género. Para comprender mejor la organización genómica de los genes de *T. solium*, es necesario caracterizar las estructuras involucradas en la regulación de la expresión de genes. En este trabajo se clonó y determinó la secuencia genómica del gen de paramiosina, se identificó la probable región promotora y el sitio de inicio de la transcripción, se localizaron las regiones no codificadoras, y se analizó la estructura del gen, comparándola con las estructuras de otros genes conocidos.

La caracterización del gen de la paramiosina es de interés por tres principales razones: (i) el análisis de la secuencia es importante para identificar elementos que participan en la regulación de la expresión del gen; (ii) el análisis de la estructura del gen será de ayuda en estudios concernientes a la relación evolutiva entre genes de protostomados; (iii) con la información contenida en este trabajo, se podrán diseñar ensayos de transfección para evaluar la capacidad de la región promotora para promover la transcripción, y mediante ensayos de eliminación, demostrar la actividad funcional de las distintas regiones reguladoras descritas. Así, en un futuro no muy lejano, será posible la construcción de vectores de expresión para estudios de transfección en cisticercos, que nos permitirán estudiar de manera detallada los genes de interés del parásito, abriendo una nueva era en el estudio de los ténidos.

REFERENCIAS

- Acevedo-Hernández A** (1982) Economic impact of porcine cysticercosis in México. En: *Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives*. Academic Press, Inc. New York, pag. 63-68
- Acevedo-Hernández A.** (1989). Epidemiología de la cisticercosis porcina. En: Cisticercosis humana y porcina. Su conocimiento e investigación en México. Flisser A., Malagón F. (eds). Limusa, México, p.251.
- Adams MD et al.** (2000) The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287:2185-2195
- Aguinaldo AMA, Turbeville JM, Linford LS, Rivera MC, Garey JR, Raff RA, Lake JA** (1997) Evidence for a clade of nematodes, arthropods and other moulting animals. *Nature* 387:489-493
- Albores-Saavedra J, Altamirano Dimas M** (1971) Algunas consideraciones sobre 9 412 autopsias realizadas en el Hospital General de México. *Gac Med Mex* 102:193-203
- Aluja A, Vargas G** (1988) The histopathology of porcine cysticercosis. *Vet Parasitol* 28:65-77
- Ambrosio J, Landa A, Merchant MT, Laclette JP** (1994) Protein uptake by cysticerci of *Taenia crassiceps*. *Archives Med Res* 25:325-330
- Amory Soisson LM, Masterson CP, Tom TD, McNally MT, Lowell GH y Strand M** (1992) Induction of protective immunity in mice using a 62kDa recombinant fragment of *Schistosoma mansoni* surface antigen. *J Immunol* 149:3612-3620
- Arechavaleta F, Molinari JL, Tato P**(1998) A *Taenia solium* metacestode factor nonspecifically inhibits cytokine production. *Parasitol Res* 84:117-122
- Arme C** (1988). Ontogenic changes in helminth membrane function. *Parasitol* 96:S83-S104
- Arredondo JJ, Marco Ferreres R, Maroto M, Cripps RM, Marco R, Bernstein SI, Cervera M** (2001) Control of *Drosophila* paramyosin/miniparamyosin gene expression: Differential regulatory mechanisms for muscle-specific transcription. *J Biol Chem* 276:8278-8227
- Barany M** (1967) ATPase activity of myosin correlated with speed of muscle shortening. *J Gen Physiol* 50:197-218
- Barany M** (1967) Studies on actin-actin and actin-myosin interaction. *Biochem Biophys Acta* 27:208-221
- Becker KD, O'Donnell PT, Heitz JM., Vito M, Bernstein SI** (1992) Analysis of *Drosophila* paramyosin: identification of a novel isoform which is restricted to a subset of adult muscles. *J. Cell Biol.* 116:669-681
- Becker MM, Kalinna BH, Yang W, Harrop SA, Scott JC, Waine GJ, Kurtis JD, McManus DP** (1995) Gene cloning and complete nucleotide sequence of Philippine *Schistosoma japonicum* paramyosin. *Acta Trop* 59:143-147
- Benitez L, Harrison LJ, Parkhouse RM, Garate T** (1998) Sequence and preliminary characterisation of a *Taenia saginata* oncosphere gene homologue of the small heat shock protein family. *Parasitol Res* 84:423-425
- Benoist C, O'Hare K, Breathnach R, Chambon P** (1980). The ovalbumin gene-sequence of putative control regions. *NAR* 8: 127-132
- Benton D, Davis R** (1977) Screening lambda-gt recombinant clones by hybridization to single plaques *in situ*. *Science* 18:180-182
- Breathnach R, Chambon P** (1981). Organization and expression of eucaryotic split genes coding for proteins. *Ann Rev Biochem* 50:349-383
- Brehm K, Hubert K, Sciutto E, Garate T, Frosh M** (2002) Characterization of a spliced leader gene and of *trans*-spliced mRNAs from *Taenia solium*. *MBP* 112:105-110

- Bucher P** (1990) Weight Matrix Descriptions of Four Eukaryotic RNA Polymerase II Promoter Elements Derived from 502 Unrelated Promoter Sequences. *J Mol Biol* 212: 563-578
- Cai X, Chai Z, Jing Z, Wnag P, Luos, Chen J, Dou Y, Feng S, Su C, Jin J** (2001) Studies on the development of DNA vaccine against *Cysticercus cellulosae* infection and its efficacy. *South Asian J Trop Med Pub Health* 32:105-110
- Cai Y, Langley JG, Smith DI, Boros DL** (1996) A cloned major *Schistosoma mansoni* egg antigen with homologies to small heat shock proteins elicits Th1 responsiveness. *Infect Immun* 64:1750-1755
- Campos A, Bernard P, Fauconnier A, Landa A, Gómez E, Hernández R, Willms K y Laclette JP** (1990). Cloning and sequencing of two actin genes from *Taenia solium* (Cestoda) *MBP* 40: 87-94.
- Candido EP** (2002) The small heat shock proteins of the nematode *Caenorhabditis elegans*: structure regulation and biology. *Prog Mol Subcell Biol* 28:61-78
- Candido EP, Jones D, Dixon DK, Graham RW, Russnak RH y Kay RJ** (1989) Structure, organization, and expression of the 16-kDa heat shock gene family of *Caenorhabditis elegans*. *Genome* 31:690-697
- Caplan AI, Fiszman MY, Eppenberger HM** (1983) Molecular and cell isoforms during development. *Science* 221:921-927
- Cárdenas-Ramírez L, Zaragoza AM, González del Pliego M** (1982) Neural and Excretory Structures of *Cysticercus cellulosae*. En: Flisser A, Willms K, Laclette JP, Larralde C, Ridaura C, Beltran F (eds). *Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives*, New York, Academic Press, Inc. New York, 281-306.
- Centers for Disease Control and Prevention** (1993) Recommendations for the International Task Force for Disease Eradication, *MMWR* 42:1-38
- Chenoweth D** (1986) Complement mediators of inflammation. En: *Immunobiology of the complement system*. GD Ross (ed.). Orlando, Academic Press 63-86
- Chung YY, Ko RC** (1999) A novel cDNA clone encoding a specific excretory/secretory antigen of larval *Trichinella pseudospiralis*. *Parasitol Res* 85:685-691
- Cohen C, Lanar DE, Parry DA** (1987) Amino acid sequence and structural repeats in schistosome paramyosin match those of myosin. *Biosci Rep* 7:11-16
- Cohen C, Parry DA** (1990) Alpha-helical coiled-coil bundles: how to design an alpha helical protein. *Proteins* 7:1-15
- Cohen C, Szent-Györky AG, Kendrick-Jones J** (1971) Paramyosin and the filaments of molluscan "catch" muscles. I. Paramyosin: Structure and assembly. *J Mol Biol* 56:223-237
- Conraths FJ, Harnett HW, Worms MJ, Parkhouse RM** (1992). Immunological cross-reaction between an *Onchocerca paramyosin*-like molecule and a microfilaria surface antigen *Trop. Med. Parasitol.* 43:135-138
- Correa MD, Flisser-Steinbruch A, Sarti-Gutiérrez E** (1994) Teniasis y cisticercosis. En: Valdespino Gómez JL, Del Tió-Zolezzi A, Velasco-Castrejón D, Escobar A, Ibáñez-Bernal S, Magos-López E, ed. *Enfermedades Tropicales en México*. México DF Secretaria de Salud 8:335-345
- Csank C, Taylor FM, Martindale DW** (1990) Nuclear pre-mRNA introns: analysis and comparison of intron sequences from *Tetrahymena thermophila* and other eukaryotes. *NAR* 18: 5133-5141
- da Silva Claudia MD, Ferreira Henrique B, Picón M, Gorfinkiel N, Ehrlick R, Zaha A** (1993). Molecular cloning and characterization of actin genes from *Echinococcus granulosus*. *MBP* 60:209-220.

- Dahmen A, Gallin M, Schumacher M, Erttmann KD** (1993) Molecular cloning and pre-mRNA maturation of *Onchocerca volvulus* paramyosin. *Mol. Biochem. Parasitol.* 57:335-338
- Dalley BK, Golomb M** (1992) Gene expression in the *Caenorhabditis elegans* dauer larva: developmental regulation of Hsp90 and other genes. *Dev Biol* 151:80-90
- Damian RT** (1987) Presidential address: The exploitation of host immune responses by parasites. *J Parasitol* 73:3-13
- Damian RT** (1997) Parasite immune evasion and exploitation: reflections and projections. 115:S169-175
- Deitiker PR, Epstein HF** (1993) Thick filament substructures in *Caenorhabditis elegans*: evidence of two populations of paramyosin. *J Cell Biol* 123:303-311
- Del Brutto OH, Sotelo J** (1988) Neurocysticercosis: an update. *Rev Infect Dis* 10:1075-1087.
- Desser SS** (1963) Calcium accumulation in larval *Echinococcus multilocularis*. *Can J Zool* 41:1055-1059
- Dey CS, Deitiker PR, Epstein HF** (1992) Assembly-dependent phosphorylation of myosin and paramyosin of native thick filaments in *Caenorhabditis elegans*. *Biochem Biophys Res Comm* 186:1528-1532
- Diaz A, Ferreira A, Sim RB** (1997) Complement evasion by *Echinococcus granulosus*: sequestration of host factor H in the hydatid cyst wall. *J Immunol* 158:3779-3786
- Díaz de León L., Arcos L, Willms K** (1982) The uses of cell-free systems for the characterization of cysticercus cellulosa antigens. En: Flisser A, Willms K, Lacleste JP, Larralde C, Ridaura C, Beltran F (eds): *Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives*, New York, Academic Press, 465-475.
- Díaz S, Candil R, Uribe M, Willms K** (1990) Serology as an indicator of *Taenia solium* tapeworm infections in rural community in Mexico. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 84:563-566
- Ding L, Candido EP** (2000a) HSP43, a small heat-shock protein localized to specific cells of the vulva and spermatheca in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Biochem J* 349(Pt 2):409-412
- Ding L, Candido EP** (2000b) HSP25, a small heat shock protein associated with dense bodies and M-lines of body wall muscle in *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem* 275(13):9510-9517
- Efstratiadis A, Posakony JW, Maniatis T, Lawn RM, O'Connell C, Spritz RA, De Riel JK, Forget BG, Weissman SM, Slightom JL, Blechl AE, Smithies O, Baralle FE; Shoultz CC y Proudfoot NJ** (1980). The structure and evolution of the human globin gene family. *Cell* 21, 653-668
- Elfvin M, Levine RJC, Dewey MM** (1976) Paramyosin in invertebrate muscles. *J Cell Biol* 71:261-272
- Epstein HF, Miller DM III, Ortíz I, Berliner GC** (1985) Myosin and paramyosin are organized about a newly identified core structure. *J Cell Biol* 100:904-915
- Epstein HF** (1986) *UCLA Symp Mol Cell Biol New Ser* 29:653
- Epstein HF, Ortiz I, Mackinnon LA** (1986) The alteration of myosin isoform compartmentation in specific mutants of *Caenorhabditis elegans*. *J Cell Biol* 103:985-993
- Ardizzi JP, Epstein HF** (1987) Immunochemical localization of myosin heavy chain isoforms and paramyosin in developmentally and structurally diverse muscle cell types of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J Cell Biol* 105:2763-2770
- Ernani FP, Teale JM** (1993) Release of stress proteins from *Mesocostoides corti* is a brefeldin A-inhibitable process: evidence for active export of stress proteins. *Infect Immun* 61(6):2596-2601
- Escobar-Izquierdo A** (1989) Patología de la neurocisticercosis. En: *Cisticercosis humana y porcina. Su conocimiento e investigación en México*. Flisser A y Malagón F (eds). Limusa, México, 89-95.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- Espinoza B, Ruiz-Palacios G, Tovar A, Sandoval MA, Plancarte A, Flisser A (1986)** Response in patients with neurocysticercosis and its application in immunodiagnosis *J Clin Microbiol* 24:536
- Estañol B, Corona T, Abad PJ (1986)** A prognostic classification of cerebral cysticercosis: therapeutic implications. *Neurol Neurosurg Psychiatry* 49:1131
- Estes DM, Teale JM (1991)** Biochemical and functional analysis of extracellular stress proteins of *Mesocestoides corti*. *J Immunol* 147:3926-3934
- Ferreira CA, Barbosa MC, Silveira TC, Valenzuela JG, Vaz Ida S Jr, Masuda A (2002)** cDNA cloning, expression and characterization of a *Boophilus microplus* paramyosin. *Parasitology* 125:265-274
- Ferrer E, Moyano E, Benitez L, Gonzalez LM, Foster M, Davila I, Cortez MM, Harrison LJS, Parkhouse MRE, Garate T (2002)** Cloning and characterization of *Taenia saginata* paramyosin cDNA. Unpublished
- Fisher DA, Bode HD (1989)** Nucleotide sequence of an actin-encoding gene from *Hydra attenuata*: structural characteristics and evolutionary implications. *Gene* 84:55-44
- Fitzgerald M, Shenk T (1981)** The sequence 5'-AAUAAA-3' forms part of the recognition site for polyadenylation of late SV40 mRNAs. *Cell* 24:251-260
- Flanigan TP, King CH, Lett, RR, Nanduri J y Mahmoud AAF (1989)** Induction of resistance to *Schistosoma mansoni* infection in mice by purified parasite paramyosin. *J Clin Invest* 83:1010-1014
- Flisser A (1982)** *Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives*. Academic Press, Inc. New York
- Flisser A (1983)** Immunology of human cysticercosis. *Bol Estud Med Biol.* 32:143-176
- Flisser A, González D, Shkurovich M, Madrazo I, Correa D, Rodríguez-Carbajal J (1990)** Praziquantel treatment of porcine brain and muscle *Taenia solium* cysticercosis. *Parasitol Res* 76:263-269
- Flisser A (1994)** Teniosis and cysticercosis due to *T. solium*. *Progress in clinical parasitology*. Boca Ratón (FL): CRC Press Inc, 4:77-116
- Flisser A, Madrazo I, Delgado H (1997)** Cisticercosis Humana. En: *Manual Moderno*, México. p. 1-176
- Flisser A (1988)** Neurocysticercosis in México. *Parasitology Today* 4:131-137
- Flisser A, Plancarte A, Correa D (1991)** *Taenia solium* cysticercosis: a review. *Res Rev Parasitol* 51(1-4):17-23.
- Flisser A, Plancarte A, Espinoza B, Woodhouse E, Rivera L, Trueba T, Yakoleff-Greenhouse V, Sierra A, Laclette JP, Cañedo L, Larralde C (1984)** The immune status of patients with cysticercosis. *Afr Clin Exp Immunol* 3:183
- Flisser A, Woodhouse E, Larralde C (1980)** Human cysticercosis: antigens, antibodies and non responders. *Clin Exp Immunol* 3:27-37
- Flisser A, Correa D, Plancarte A, Sandoval MA, Avila G, Vallejo V (1990)** New approaches for the diagnosis of *Taenia solium* taeniosis /cysticercosis. *Ann Parasitol Hum Comp* 65:95-98
- Fornwald JA, Kuncio G, Peng I, Ordahl CP (1982)** The complete nucleotide sequence of the chick α -actin gene and its evolutionary relationship to the actin gene family. *NAR* 10:3861-3876
- Frohman MA (1993)** Rapid amplification of complementary DNA ends for generation of full-length complementary DNAs: Thermal RACE. *Methods Enzymol* 218:340-356
- Fyrberg EA, Kindle KL, Davidson N (1980)** The actin genes of *Drosophila*: a dispersed multigene family. *Cell* 19: 365-378
- Fyrberg EA, Goldstein LS (1990)** The *Drosophila* cytoskeleton. *Ann Rev Cell Biol* 6:559-596

- Fyrberg EA, Bond BJ, Hershey ND, Mixer KS, Davidson N (1981). The actin genes of *Drosophila*: protein coding regions are highly conserved but intron positions are not. Cell 24:107-116
- Garrido E, Tato P, Molinari JL (2001) A factor isolated from *Taenia solium* metacestodes stimulates T lymphocytes to proliferate and produce gamma interferon. Parasitol Res 87:956-962
- Gauci CG, Lightowlers MW (2001) Alternative splicing and sequence diversity of transcripts from the oncosphere stage of *Taenia solium* with homology to the 45W antigen of *Taenia ovis*. MBP 112:173-181
- Gemmel M (1983) Guidelines for surveillance, prevention and control of taeniasis/cysticercosis. Geneva, World Health Organization, 1983
- Gimba ERP, Chemale G, Farias SS, Zaha A (2000) Cloning and characterization of Echinococcus granulosus (Cestode) EgactI and EgactII actin gene promoters and their functional analysis in the NIH3T3 mouse cell line. Braz J Med Biol Res 33:1283-1292
- Gobert GN (1998) The role of microscopy in the investigation of paramyosin as a vaccine candidate against *Schistosoma japonicum*. Parasitol Today 14:115-118
- Gobert GN, Stenzel DJ, Jones MK, Allen DE, McManus DP (1997) *Schistosoma japonicum*: immunolocalization of paramyosin during development. Parasitol 114:45-52.
- Gohr L, Maniak M, Kunz W (1995) Paramyosin of *Schistosoma mansoni*: multifunctionality and host parasite interactions. Z Bakteriologie 282: 148
- Granda AG III, Tuyen LK, Asikin N, Davis TB, Philipp M, Cohen C, McReynolds LA (1989) A lambda gt11 cDNA recombinant that encodes *Dirofilaria immitis* paramyosin. MBP 35:31-41
- Greenwald I, Horvitz HR (1980) unc-93(e1500): A behavioral mutant of *Caenorhabditis elegans* that defines a gene with a wild-type null phenotype. Genetics 96:147-164
- Guerra C, Flisser A, Cañedo L, Laclette JP (1982) Biochemical and immunological characterization of antigen B purified from cysticerci of *Taenia solium*. En: Flisser A, Willms K, Laclette JP, Larralde C, Ridaura C, Beltran F (eds): *Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives*, New York, Academic Press, 437-451
- Hammerberg B, Dangler C, Williams J (1980) *Taenia taeniaeformis*: chemical composition of parasite factors affecting coagulation and complement cascades. J Parasitol 66:569-576
- Hammerberg B, Williams JF (1978a) Physicochemical characterization of complement-interacting factors from *Taenia taeniaeformis*. 120:1039-1045
- Hammerberg B, Williams JF (1978b) Interaction between *Taenia taeniaeformis* and the complement system. J Immunol 120:1033-1038
- Hanke PD, Storti RV (1988) The *Drosophila melanogaster* tropomyosin II gene produces multiple proteins by use of alternative tissue-specific promoters and alternative splicing. Mol Cell Biol 8: 3591-3602
- Hayunga EG, Sumner MP, Letonja T (1989) Evidence for selective incorporation of host immunoglobulin by strobilocerci of *Taenia taeniaeformis*. J Parasitol 75:638-642
- Hedstrom R, Culpepper J, Harrison RA, Agabian N, Newport G (1987) A major immunogen in *Schistosoma mansoni* infections is homologous to the heat-shock protein HSP70. J Exp Med 165:1430-1435
- Herrera L, Santiago P, Rogja G, Salazar P, Tato P, Molinari JL, Schiffmann D, Ostrosky-Wegman P (1994) Immune response impairment genotoxicity and morphological transformation induced by *Taenia solium* metacestode. Mutation Res 305:223-228
- Heschl MF, Baillie DL (1990) The HSP70 multigene family of *Caenorhabditis elegans*. Comp Biochem Physiol B. 96:633-637
- Hockertz MK, Clark-Lewis I, Candido EP (1991) Studies of the small heat shock proteins of *Caenorhabditis elegans* using anti-peptide antibodies.

- Honda S, Epstein HF** (1990) Modulation of muscle gene expression in *Caenorhabditis elegans*: differential levels of transcripts, mRNAs, and polypeptides for thick filament proteins during nematode development. *PNAS* 87:876-880
- Hongli Y, Shuhan S, Ruiwen C, Yingjun G** (2002). Cloning and functional identification of a novel annexin subfamily in *Cysticercus cellulosae*. *MBP* 119:1-5
- Hooker CW, Brindley PJ** (1999) Cloning of a cDNA encoding SjIrV1, a *Schistosoma japonicum* calcium-binding protein similar to calnexin, and expression of the recombinant protein in *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* 1429:331-341
- Hooker CW, Yang W, Becker MM, Waine GJ, Kalinna BH, Nimmo KA, McManus DP, Brindley PJ** (1995) *Schistosoma japonicum*: heterogeneity in paramyosin genes *Acta Trop.* 59:131-141
- Horowitz DS, Krainer AR** (1994) Mechanisms for selecting 5' splice sites in mammalian pre-mRNA splicing. *Trends Genet* 10:100-105
- Hustead SA, Williams JO** (1977) Permeability studies on taeniid metacestodes: II. Antibody-mediated effects on membrane permeability in larvae of *Taenia taeniaeformis* and *Taenia crassiceps*. *J Parasitol* 63:322-326
- Jayasena SM, Chandrasekharan NV, Karunanayake EH** (1999) Molecular characterization of a hsp70 gene from the filarial parasite *Setaria digitata*. *Int J Parasitol* 29:581-591
- Jecock RM, Devaney E** (1992) Expression of small heat shock proteins by the third-stage larva of *Brugia pahangi*. *MBP* 56:209-217
- Johnson KS, Wells K, Bock JV, Nene V, Taylor DW, Cordingley JS** (1989) The 86-kilodalton antigen from *Schistosoma mansoni* is a heat-shock protein homologous to yeast HSP90. *MBP* 36:19-28
- Kagawa H, Gengyo K, McLachlan AD, Brenner S, Karn J** (1989) Paramyosin gene (unc-15) of *Caenorhabditis elegans*. Molecular cloning, nucleotide sequence and models for thick filament structure. *J Mol Biol* 207: 311-333
- Kalinna BH, Becker MM, McManus DP** (1997) Engineering and expression of a full length cDNA encoding *Schistosoma japonicum* paramyosin. *Acta Trop* 65:11-115
- Kalinna, B, McManus, D.P** (1993) An IgG (Fc gamma)-binding protein of *Taenia crassiceps* (Cestoda) exhibits sequence homology and antigenic similarity with schistosome paramyosin *Parasitology* 106:289-296
- Ko RC, Fan L** (1996) Heat shock response of *Trichinella spiralis* and *T. pseudospiralis*. *Parasitol* 112:89-95
- Kohlmetz C, Epe C, Schnieder T** (1998) In vitro expression of a recombinant paramyosin of *Ancylostoma caninum*. *Int J Parasitol* 28:1229-1233
- Kojima S** (1987) Production and properties of a mouse monoclonal IgE antibody to *Schistosoma japonicum*. *J Immunol* 139:2044-2049
- Kumar S et al.** (1993) MEGA: Molecular evolutionary genetic analysis, version 1.0. *The Pennsylvania State University*, University Park, PA 16802
- Laclette JP, Ornelas Y, Merchant MT, Willms K** (1982). Ultrastructure of the surrounding envelopes of *Taenia solium* eggs. En: *Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives*. Academic Press, Inc. New York, pg. 375-387
- Laclette JP, Alagón A, Willms K y Torre-Blanco A** (1990) Purification of antigen B from *Taenia solium* cysticerci by affinity to mammalian collagen. *J Parasitol* 76:273-275
- Laclette JP, Landa A, Arcos L, Willms K, Davis AE, Shoemaker CB** (1991) Paramyosin is the *Schistosoma mansoni* (Trematoda) homologue of antigen B from *Taenia solium* (Cestoda). *Mol Biochem Parasitol* 44:287-296

- Laclette JP, Landa A, Arcos L, Willms K, Davis AE, Shoemaker, CB (1991) Paramyosin is the *Schistosoma mansoni* (Trematoda) homologue of antigen B from *Taenia solium* (Cestoda) Mol Biochem Parasitol 44:287-295
- Laclette JP, Merchant MT y Willms K (1987) Histological and ultrastructural localization of antigen B in the metacestode of *Taenia solium* J Parasitol 73:121
- Laclette JP, Rodriguez M, Landa A, Arcos L, de Alba P, Mancilla R, Willms K (1989) The coexistence of *Taenia solium* cysticerci and the pig: role of antigen B. Acta Leiden 57:115-122
- Laclette JP, Shoemaker C, Richter D, Arcos L, Pante N, Cohen C, Bing D, Nicholson-Weller A (1992) Paramyosin inhibits complement C1. J Immunol 148:124-128
- Laclette JP, Skelly PJ, Merchant MT, Shoemaker CB (1995) Aldehyde fixation dramatically alters the immunolocalization pattern of paramyosin in platyhelminth parasites. Exp Parasitol 81:140-143
- Lanar DE, Pearce EJ, James SL, Sher A (1986) Identification of paramyosin as a schistosome antigen recognized by intradermally vaccinated mice. Science 234:593-596
- Landa A, Laclette JO, Nicholson-Weller A, Shoemaker CB (1993) cDNA cloning and recombinant expression of collagen-binding and complement inhibitor activity of *Taenia solium* paramyosin (AgB). MBP 60: 343-347
- Langy S, Plichart C, Luquiaud P, Williams SA, Nicolas L (1998) The immunodominant *Brugia malayi* paramyosin as a marker of current infection with *Wuchereria bancrofti* adult worms Infect. Immun. 66:2854-2858
- Larralde C, Padilla A, Hernández M, Govezensky T, Sciutto E, Gutiérrez G, Tapia-Conyer R, Salvatierra B, Sepúlveda J (1992) Seroepidemiología de la Cisticercosis en México. Salud Pública de México 34:197-210
- Leid RW (1988) Parasites and Complement. Adv Parasitol 27:131-168
- Leid RW, Grant RF, Suquet CM (1987a) Inhibition of equine neutrophil chemotaxis and chemokinesis by a *Taenia taeniaeformis* proteinase inhibitor, taeniaestatin. Parasite Immunol 9:195-204
- Leid RW, Grant RF, Suquet CM (1987b) Inhibition of neutrophil aggregation by taeniaestatin, a cestode proteinase inhibitor. Int J Parasitol 17:1349-1353
- Leid RW, Suquet CM, Bouwer HG, Hinrichs DJ (1986) Interleukin inhibition by a parasite proteinase inhibitor, taeniaestatin. J Parasitol 137:2700-2702
- Leid RW, Suquet CM, Perryman LE (1984) Inhibition of antigen and lectin-induced proliferation of rat spleen cells by a *T. taeniaeformis* proteinase inhibitor. Clin Exp Immunol 57:187-194
- Leid RW, Suquet CM, Tanigoshi L (1987) Parasite defense mechanisms for evasion of host attack : a review. Vet Parasitol 25:147-162
- Letonja T, Hammerberg B (1983) Third component of complement, immunoglobulin deposition, and leukocyte attachment related to surface sulfate on larval *Taenia taeniaeformis*. J Parasitol 69:637-644
- Li BW, Chandrashekar R, Alvarez RM, Liftis F, Weil GJ (1991) Identification of paramyosin as a potential protective antigen against *Brugia malayi* infection in jirds Mol. Biochem. Parasitol. 49:315-323
- Lightowlers MW, Rickard MD (1988) Excretory-secretory products of helminth parasites: effects on host immune responses. Parasitology 96:S123-166
- Lillibridge CD, Rudin W, Philipp MT (1996) *Dirofilaria immitis*: ultrastructural localization, molecular characterization, and analysis of the expression of p27, a small heat shock protein homolog of nematodes. Exp Parasitol 83: 30-45
- Limberger RJ, McReynolds LA (1990) Filarial paramyosin: cDNA sequences from *Dirofilaria immitis*, and *Onchocerca volvulus*. Mol Biochem Parasitol 38:271-280

- Lindquist S** (1986) The heat-shock response. *Ann Rev Biochem* 55:1151-1191
- Lombardo L, Mateos JH, Estañol B** (1982) La cisticercosis cerebral en México. *Gac Med Mex* 118:1
- Lumsden R** (1972) Cytological studies on the absorptive surfaces of cestodes. VI. Cytochemical evaluation of electrostatic charge. *J Parasitol* 58:229-234
- Lumsden R** (1975). Surface ultrastructure and cytochemistry of parasitic helminths. *Exp Parasitol* 37:267-339
- Lumsden RD, Hildreth MB** (1982) The fine structure of adult tapeworms. En: *Biology of the Eucestoda Vol 1*. Academic Press London. pag. 177-233
- Lutz CT, Hollifield WC, Seed B, Davie JM, Huang HV** (1987) Syrinx 2A: An improved λ phage vector designed for screening DNA libraries by recombination in vivo. *Proc Natl Acad Sci, USA* 84:4379-4383
- Macnish MG, Morgan-Ryan UM, Monis PT, Behnke JM, Thompson RCA** (2001) A molecular phylogeny of nuclear and mitochondrial sequences in *Hymenolepis nana* (Cestoda) supports the existence of a cryptic species. Unpublished.
- Maizels** (1993) Immunological modulation and evasion by helminth parasites in human populations. *Nature* 365:797-805
- Maresca B, Carratu L** (1992) The biology of the heat shock response in parasites. *Parasitol Today* 8:260-266
- Maroto M, Arredondo J, Goulding D, Marco R, Bullard B, Cervera M** (1996) *Drosophila* paramyosin/miniparamyosin gene products show a large diversity in quantity, localization and isoform pattern: A possible role in muscle maturation and function. *J Cell Biol* 134:81-92
- Maroto M, Arredondo JJ, San Roman M, Marco R, Cervera M** (1995) Analysis of the paramyosin/miniparamyosin gene. Miniparamyosin is an independently transcribed, distinct paramyosin isoform, widely distributed in invertebrates. *J Biol Chem* 270: 4375-4382
- Martinez J, Perez-Serrano J, Bernadina WE, Rodríguez-Caabeiro F** (2000) Detection of heat shock protein 70 from *Trichinella spiralis* larvae using a modification of the routine western blotting procedure. *J Parasitol* 86:637-639
- Martinez J, Perez-Serrano J, Bernadina WE, Rodríguez-Caabeiro F** (2001) HSP60, HSP70 and HSP90 from *Trichinella spiralis* as targets of humoral immune response in rats. *Parasitol Res* 87:453-458
- Martinez J, Perez-Serrano J, Bernadina WE, Rodríguez-Caabeiro F** (1999) *Echinococcus granulosus*: in vitro effects of ivermectin and praziquantel on hsp60 and hsp70 levels. *Exp Parasitol* 93:171-180
- Martinez J, Perez-Serrano J, Bodega G, Casado N, Rodríguez-Caabeiro F** (1999) Heat shock proteins HSP70 and HSP60 in *Echinococcus granulosus* protoscolices. *Folia Parasitol (Praha)* 46:76-78
- Matsumoto Y, Perry G, Levine RJC, Blanton R, Mahmoud AAF, Aikawa M** (1988). paramyosin and actin in schistosomal teguments. *Nature* 333:76-78
- Mattsson JG, Ljunggren EL, Bergstrom K** (2001) Paramyosin from the parasitic mite *Sarcoptes scabiei*: cDNA cloning and heterologous expression. Unpublished
- McKeown M, Firtel RA** (1981) Differential expression and 5' end mapping of actin genes in *Dyctiostelium* *Cell* 24:799-807
- Medina MT** (1990) Neurocysticercosis as the main cause of late-onset of epilepsy in Mexico. *Archives of Internal Medicine* 150:325-327
- Merchant MT, Aguilar L, Avila G, Robert L, Flisser A, Willms K** (1998) *Taenia solium* description of the intestinal implantation sites in experimental hamster infections. *J Parasitol* 84:681-685 (1998)

- Molinari JL, Mejia H, White AC Jr, Garrido E, Borgonio VM, Baig S, Tato P (2000)** *Taenia solium*: a cysteine protease secreted by metacestodes depletes human CD4 lymphocytes *in vitro*. *Exp Parasitol* 94:133-142
- Molinari JL, Tato P, Reynoso OA, Cazares JM (1990)** Depressive effect of a *Taenia solium* cysticercus factor on cultured human lymphocytes stimulated with phytohaemagglutinin. *Ann Trop Med Parasitol* 84:205-208
- Molinari JL, Tato P, Rodriguez D, Solano S, Rubio M, Sepulveda J (1998)** Impairment of the inflammatory reaction on implanted *Taenia solium* metacestodes in mice by a *T. solium* RNA-peptide: a scanning electron microscopy study. *Parasitol Res* 84:173-180
- Morimoto RI (1990)** The stress response, function of the proteins and perspectives. En: *Stress Proteins in Biology and Medicine* (ed. Morimoto RI, Tissieres A & Georgopoulos C). pag.1-36. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Morimoto RI, Line MP, Bimson DN, Cotto JJ (1997)** The heat shock response: regulation and function of heat-shock proteins and molecular chaperones. *Essays in Biochemistry*32:17-29
- Moser D, Doumbo O, Klinkert MQ (1990)** The humoral response to heat shock protein 70 in human and murine Schistosomiasis mansoni. *Parasite Immunol* 12(4):341-352
- Muhlschlegel F, Frosch P, Castro A, Apfel H, Muller A, Frosch M (1995)** Molecular cloning and characterization of an *Echinococcus multilocularis* and *Echinococcus granulosus* stress protein homologous to the mammalian 78kDa glucose regulated protein. *MBP* 74(2): 245-250
- Mühlschlegel F, Sygulla L, Frosch P, Massetti P, Matthias F (1993)** Paramyosin of *Echinococcus granulosus*: cDNA sequence and characterization of a tegumental antigen. *Parasitol Res* 79:660-666
- Nanduri J, Kazura JW (1989)** Paramyosin-enhanced clearance of *Brugia malayi* microfilaremia in mice. *J Immunol* 143: 3359-3363
- Nara T, Matsumoto N, Janecharut T, Matsuda H, Yamamoto K, Irimura T, Nakamura K, Aikawa M, Oswald I, Sher A, Kita K, Kojima S (1994)** Demonstration of the target molecule of a protective IgE antibody in secretory glands of *Schistosoma japonicum* larvae. *Int Immunol* 6:963-971
- Nene V, Dunne DW, JohnsonKS, Taylor DW, Cordingley JS (1986)** Sequence and expression of a major egg antigen from *Schistosoma mansoni*. Homologies to heat shock proteins and alpha-crystallins. *MBP* 21:179-188
- Neumann S, Ziv E, Lantner F, Chechter I (1993)** Regulation of HSP70 gene expression during the life cycle of the parasitic helminth *Schistosoma mansoni*. *Eur J Biochem* 212(2):589-596
- Neumann S, Ziv E, Lantner F, Schechter I (1992)**. Cloning and sequencing of an hsp70 gene of *Schistosoma mansoni*. *MBP* 56:357-360
- Niak CH, Su KW, Ko RC (2001)** Identification of some heat-induced genes of *Trichinella spiralis*. *Parasitol* 123:293-300
- Oaks J, Lumsden RD (1971)** Cytological studies on the absorptive surface of cestodes. V. Incorporation of carbohydrate containing macromolecules into tegument membranes. *J Parasitol* 57:1256-1268.
- Olson EN (1990)** MyoD family: a paradigm for development? *Genes Dev* 4: 1454-1461
- Organización Panamericana de Salud (1994)** Epidemiología y control de la taeniasis/cysticercosis en Latinoamérica.
- Pappas PW, Read L (1975)** Membrane transport in the helminth parasites: a review. *Exp Parasitol* 37:469-530
- Pearce EJ, James SL, Dalton J, Barral A, Ramos C, Strand M, Sher A (1986)** Immunochemical characterization and purification of Sm-97, a *Schistosoma mansoni* antigen monospecifically

- recognized by antibodies from mice protectively immunized with a nonliving vaccine. *J Immunol.* 137: 3593-3600.
- Pearce EJ, James SL, Hieny S, Lanar DE, Sher A (1988)** Induction of protective immunity against *Schistosoma mansoni* by vaccination with schistosome paramyosine (Sm 97), a non surface parasite antigen. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 85: 5678-5682
- Pearce EJ, James SL, Hieny S, Lanar DE, Sher A (1988)** Induction of protective immunity against *Schistosoma mansoni* by vaccination with schistosome paramyosine (Sm 97), a non surface parasite antigen. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 85:5678-5682
- Perez-Perez J, Fernandez-Caldas E, Maranon F, Sastre J, Bernal ML, Rodríguez J, Bedate CA (2000)** Molecular cloning of paramyosin, a new allergen of *Anisakis simplex*. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 123:120-129
- Podack ER (1980)** Assembly and function of the terminal components. En: *Immunobiology of the complement system*. GD Ross (ed.). Orlando, Academic Press 115-137
- Proudfoot NJ, Brownlee GG (1976).** 3' non coding region sequences in eukaryotic messenger RNA. *Nature* 263: 211-214.
- Rabiela MT, Rivas HA, Rodríguez IJ (1979)** Consideraciones anatomopatológicas sobre la cisticercosis cerebral como causa de muerte. *Patología* 17:119-136.
- Raghavan N, Ghosh I, Eisinger WS, Pastrana D, Scott AL (1999)** Developmentally regulated expression of a unique small heat shock protein in *Brugia malayi*. *MBP* 104:233-246
- Ramírez BL, Kurtis JD, Wiest PM, Arias P, Aligui F, Acosta L, Peters P, Olds GR (1996)** Paramyosin: a candidate vaccine antigen against *Schistosoma japonicum*. *Parasite Immunol* 18:49-52
- Ramírez Bon E, Merchant M, González del Pliego M, Cañedo L (1982)** Ultrastructure of the bladder wall of the metacestode of *Taenia solium*. En: Flisser A, Willms K, Laclette JP, Larralde C, Ridaura C, Beltran F (eds). *Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives*, New York, Academic Press, Inc. New York, 261-280.
- Ramos JD, Cheong N, Lee BW, Chua KY, Nge C, Wah LB, Yan CK (2001)** cDNA cloning and expression of Blot 11, the *Blomia tropicalis* allergen homologous to paramyosin. *Int Arch Allergy Immunol* 126:286-293
- Rao KV, Chen L, Gnanisekar M, Ramaswamy K (2002)** Cloning and characterization of a calcium-binding protein from *Schistosoma mansoni*. *J Biol Chem* 277:31207-31213
- Read CP, Rothman AH, Simmons JE (1963)** Studies on membrane transport with special reference to parasite-host integration. *Ann NY Acad Sci* 113:154-205
- Roberts T, Murrel KD, Marks S (1994)** Economic losses caused by foodborne parasitic diseases. *Parasitol Today* 10:419-423
- Rodríguez JJS, Ferreira HB, Farias SE, Zaha A (1997)** A protein with a novel calcium-binding domain associated with calcareous corpuscles in *Echinococcus granulosus*. *Biochem Biophys Res Commun* 237:451-456
- Román G, Sotelo J, Del Brutto O, Flisser A, Dumas M, Wadia N, Botero D, Cruz M, Garcia H, de Bittencourt PRM, Trelles L, Arraigada C, Lorenzana P, Nash TE, Spina-França A (2000)** A proposal to declare neurocysticercosis and international reportable disease. *Bull World Health Org* 78:399-406
- Rothstein N, Rajan TV (1991)** Characterization of an hsp70 gene from the human filarial parasite *Brugia malayi* (Nematoda). *MBP* 49:229-237
- Rothstein NM, Higashi G, Yates J, Rajan TV (1989)** *Onchocerca volvulus* heat shock protein 70 is a major immunogen in amicrofilaremic individuals from a filariasis-endemic area. *MBP* 33:229-235

- Ruiz de Eguino AD, Machin A, Casais R, Castro AM, Boga JA, Martin-Alonso JM, Parra F** (1999) Cloning and expression in *Escherichia coli* of a *Fasciola hepatica* gene encoding a calcium-binding protein. *MBP* 101:13-21
- Russnak RH, Jones D, Candido EP** (1983) Cloning and analysis of cDNA sequences coding for two 16 kilodalton heat shock proteins (hsps) in *Caenorhabditis elegans*: homology with the small hsps of *Drosophila*. *NAR*
- Sako Y, Nakao M, Ikejima T, Piao XZ, Nakaya K, Ito A** (2000) Molecular characterization and diagnostic value of *Taenia solium* low-molecular-weight antigen genes *J Clin Microbiol* 38:4439-44
- Sako Y, Nakao M, Ikejima T, Piao XZ, Nakaya K, Ito A** (2000) Molecular characterization and diagnostic value of *Taenia solium* low-molecular-weight antigen genes *J Clin Microbiol* 38:4439-44
- Sambrook J, Fritsch, EF, Maniatis T** (1989) *Molecular cloning. A laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson, AR** (1977) DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *PNAS* 74:5463-5465
- Santoro C, Mermod N, Andrews PC, Tjian R** (1988) A family of human CCAAT-box-binding proteins active in transcription and DNA replication: cloning and expression of multiple cDNAs. *Nature* 334: 218-224
- Sarti E** (1986) La taeniosis y cisticercosis en México. *Salud Pública Mex* 28:556-563.
- Sarti E** (1997) Taeniasis and cysticercosis due to *Taenia solium*. *Salud Publica México* May-Jun 39:225-31.
- Sarti E, Schantz P, Plancarte A, Wilson M, Gutiérrez I, Aguilera J** (1994) Epidemiological investigation of *Taenia solium* teniosis and cysticercosis in a rural village of Michoacan State, Mexico. *R Soc Trop Med Hyg* 68:49-52
- Sarti E, Schantz P, Plancarte A, Wilson M, Gutiérrez I, López A** (1992a) Prevalence and risk factors for *Taenia solium* teniosis and cysticercosis in humans and pigs in a village in Morelos México. *Am J Trop Med Hyg* 46:677-684
- Sarti E, Schantz P, Aguilera J, López A** (1992b) Epidemiological observations in a rural community of Michoacan State, México. *Vet Parasitol* 41:195-201
- Schantz PM, Sarti E, Plancarte A, Wilson M, Criales JL, Roberts J, Flisser A** (1994) Community-based epidemiological investigations of cysticercosis due to *Taenia solium*: comparison of serological screening tests and clinical findings in two populations in Mexico. *Clin Infect Dis* 18:879-85.
- Schmidt J, Bodor O, Gohr L, Kunz W** (1996) Paramyosin isoforms of *Schistosoma mansoni* are phosphorylated and localized in a large variety of muscle types. *Parasitol* 112:459-467
- Schriefer LA, Waterson RH** (1989) Phosphorylation of the N-terminal region of *Caenorhabditis elegans* paramyosin. *J Mol Biol* 207:451-454
- Sciutto E, Fragoso G, Baca, De la Cruz V, Lemus L y Lamoyi E** (1995). Depressed T-cell proliferation associated with susceptibility to experimental *Taenia crassiceps* infection. *Infect Immun* 63(6):2277-2281
- Sciutto E, Fragoso G, Baca, De la Cruz V, Lemus L, Lamoyi E** (1995) Depressed T-cell proliferation associated with susceptibility to experimental *Taenia crassiceps* infection. *Infect Immun* 63:2277-2281
- Sciutto E, Fragoso G, Fleury A, Laclette JP, Sotelo J, Aluja A, Vargas L, Larralde C** (2000) *Taenia solium* disease in humans and pigs: an ancient parasitic disease rooted in developing countries and emerging as a major health problem of global dimensions. *Microbes Infect* 2:1-17

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

- Scott JC, McManus DP** (1999a) Identification of novel 70 kDa heat shock protein-encoding cDNAs from *Schistosoma japonicum*. *Int J Parasitol* 29:437-444
- Scott JC, McManus DP** (1999b) Molecular cloning and functional expression of a cDNA encoding the major endoplasmic reticulum-associated calcium-binding protein, calreticulin, from Philippine strain *Schistosoma japonicum*. *Parasitol Int* 48:35-46
- Secretaría de Salud**, Boletín Semanal de Epidemiología, 1994-1996, México D.F. Dirección General de Epidemiología, 1996
- Seif I, Khoury G, Dhar R** (1979) BKV splice sequences based on analysis of preferred donor and acceptor sites. *NAR* 6: 3387-3397
- Selkirk ME, Denham DA, Partono F, Maizels RM** (1989) Heat shock cognate 70 is a prominent immunogen in Brugian filariasis. *J Immunol* 143(1):299-308
- Seltman AK, Steel C, Ottesen EA, Nutman TB**. *Wuchereria bancrofti* L3 cDNA sequences Unpublished
- Senapathy P, Shapiro MB, Harris NL** (1990). Splice junctions, branch point sites and exons: sequence statistics, identification and applications to the genome project. *Methods Enzimol* 183:252-278
- Sharp PA** (1994) Split genes and RNA splicing. *Cell* 77:805-815
- Sharp PA** (1985) On the origin of RNA splicing and introns. *Cell* 42:397-400
- Shepherd JC, Aitken A, Mc Manus DP** (1991) A protein secreted in vivo by *Echinococcus granulosus* inhibits elastase activity and neutrophil chemotaxis. *Mol Biochem Parasitol* 44:81-90
- Sher A, James SL, Correa-Oliveira R, Hieny S, Pearce EJ** (1989) Schistosome vaccines : current progress and future prospects. *Parasitology* 98: S61-S68
- Shustov AV, Kotelkin AT, Sorokin AV, Ternovoi VA, Loktev VB** (2002) The *Opisthorchis felinus* paramyosin: cDNA sequence and characterization of its recombinant fragment. *Parasitol Res* 88:724-730
- Shustov AV, Sorokin AV, Ternovoi VA, Kotelkin AT, Loktev VB**. Phylogenetic analysis of *Opisthorchis felinus* paramyosin gene reveals almost equal distance of this species from Trematoda and Cestoda classes. Unpublished
- Siebert AE Jr, Blitz RR, Morita CT, Good AH** (1981) *Taenia crassiceps*: serum and surface immunoglobulins in metacestode infections in mice. *Exp Parasitol* 51:418
- Slais J**(1970) The morphology and pathogenicity of the bladder worms. *Czechoslovak Academy of Sciences*. Czechoslovakia, pg. 13-50
- Smyth JD** (1969) *The physiology of cestodes*. University Reviews in Biology. Oliver and Boyd. 1-225
- Smyth SD** (1994). *Introduction to Animal Parasitology*. 3rd ed. Cambridge University Press, Gran Bretaña. pag. 277-367
- Sogandares-Bernal F, Voge M** (1978) Immunoglobulins on the surfaces of tetrathyridia of *Mesocestoides corti* Hoenpli 1925 (Cestoda), from laboratory infections of UCR mice. *J Parasitol* 64:620-624
- Sotelo J, Brutto OH** (2000) Brain cysticercosis. *Arch Med Res* 31:3-14
- Sotelo J, Guerrero V, Rubio-Donnadieu F** (1985) Neurocysticercosis: a new classification based on active and inactive forms. Study of 752 cases. *Arch Intern Med* 145:442
- Southern EM** (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98:503
- Suquet CM, Green-Edwards C, Leid RW** (1984). Isolation and partial characterization of a *Taenia taeniaeformis* metacestode proteinase inhibitor. *Int J Parasitol* 14:165-172

- Tato P, Castro AM, Rodriguez D, Soto R, Arechavaleta F, Molinari JL (1995)** Suppression of murine lymphocyte proliferation induced by a small RNA purified from the *Taenia solium* metacestode. *Parasitol Res* 81:181-187
- Tato P, White AC Jr, Willms K, Rodriguez D, Solano S, Sepulveda J, Molinari JL (1996)** Immunosuppression and inhibition of inflammation in mice induced by a small *Taenia solium* RNA-peptide to implanted *T. solium* metacestodes. *Parasitol Res* 82:590-597
- Thompson FJ, Cockrofts AC, Wheatley I, Briotton C, Devaney E (2001)**. Heat shock and developmental expression of hsp83 in the filarial nematode *Brugia pahangi*. *Eur J Biochem* 268:5808-5815
- Thompson FJ, Martin SA, Devaney E (1996)** *Brugia pahangi*: characterization of a small heat shock protein cDNA clone. *Exp Parasitol* 83:259-266
- Threadgold LT, Befus AD (1977)** *Hymenolepis diminuta*: ultrastructural localization of immunoglobulin-binding sites on the tegument. *Exp Parasitol* 43:169
- Tielens AG, van den Heuvel HM, van Eden W (1993)** *Schistosoma mansoni*: an HSP60 homologue is constitutively expressed in cercariae, adults and sporocysts. *Exp Parasitol* 77(4): 495-497
- Tort J, Brindley PJ, Knowx D, Wolfe KH, Dalton JP (1999)** Proteinases and associated genes of parasitic helminths.
- Trap C, Boireau P (2000)** Proteases in helminthic parasites. *Vet Res* 31:461-471
- Trimble III JJ, Lumsden RD (1975)** Cytochemical characterization of tegument membrane-associated carbohydrates in *Taenia crassiceps* larvae. *J Parasitol* 61(4):665-676
- Tsai LC, Chao PL, Shen HD, Tang RB, Chang TC, Chang ZN, Hung MW, Lee BL, Chua KY (1998)** Isolation and characterization of a novel 98-kd *Dermatophagoides farinae* mite allergen J. *Allergy Clin. Immunol.* 102:295-303
- Tsai LC, Sun Y, Chao PL, Ng H, Hung MW, Hsieh K, Liaw S, Chua KY (1999)** Sequence analysis and expression of a cDNA clone encoding a 98kDa allergen in *Dermatophagoides farinae*. *Clin Exp Allergy* 29:1583-1587
- Tsang V, Wilson M (1995)** *Taenia solium* cysticercosis: an under-recognized but serious public health problem. *Parasitol Today* 11:124-126.
- Tsuji N, Ohta M, Fujisaki K (1997)** Expression of a 70kDa heat shock related protein during transformation from free-living infective larvae to the parasitic stage in *Strongyloides venezuelensis*. *Parasitol Res* 83: 99-102
- Tweedie S, Grigg ME, Ingram L, Selkirk ME (1993)** The expression of a small heat shock protein homologue is developmentally regulated in *Nippostrongylus brasiliensis*. *MBP* 61(1):149-153
- van Leeuwen MA (1995)** Heat shock and stress response of the parasitic nematode *Haemonchus contortus*. *Parasitol Res* 81: 706-709
- Vargas-Parada L, Laclette JP (1999)** Role of the Calcareous Corpuscles in Cestode Physiology: A Review. *Rev Lat Microbiol* 41:303-307
- Vargas-Parada L, Merchant MT, Willms K, Laclette JP (1999)** Formation of calcareous corpuscles in the lumen of excretory canals of *Taenia solium* cysticerci. *Parasitol Res* 85:88-92
- Vargas-Parada L, Solís CF, Laclette JP (2001)** Heat shock and stress response of *Taenia solium* and *T. crassiceps* (Cestoda). *Parasitol* 122(Pt5):583-588
- Vargas-Parada Laura, Laclette JP (2001)** El cerdo no tiene la culpa. *¿Cómo ves?* 3(33):10-14
- Vargas-Parada L, Laclette JP (2002)** Gene structure of *Taenia solium* paramyosin. *Parasitol Res.* en prensa
- Vayssier M, Le Guerhier F, Fabien JF, Philippe H, Vallet C, Ortega-Pierres G, Soule C, Perret C, Liu M, Vega-Lopez M, Boireau P (1999)**. Cloning and analysis of *Trichinella britovi* gene encoding a cytoplasmic heat shock protein of 72 kDa. *Parasitol* 119:81-93

- Vázquez-Talavera J, Solís CF, Medina-Escutia E, Morales López Zoila, Proaño J, Correa D, Lacleste JP** (2001) Human T and B cell epitope mapping of *Taenia solium* paramyosin. *Parasite Immunol* 23:575-579
- Vázquez-Talavera J, Solís CF, Terrazas LI, Lacleste JP** (2002) Characterization and protective potential of the immune response to *Taenia solium* paramyosin in a murine model of cysticercosis. *Infect Immun* 69:5412-5416
- Velasco-Suárez M, Bravo MA, Quirasco F** (1982) Human cisticercosis: medical implication and economic impact. En: *Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives*. Academic Press, Inc. New York, pag. 47-52.
- Verster A** (1969) A taxonomic revision of the genus *Taenia* Linnaeus 1758 s. str. *Onderstepoort J Vet Res* 36:3-58
- Vinos J, Domingo A, Marco R, Cervera M** (1991) Identification and characterization of *Drosophila melanogaster* paramyosin. *J Mol Biol* 220: 687-700
- Vinos J, Maroto M, Garesse R, Marco R, Cervera M** (1992) *Drosophila melanogaster* paramyosin: developmental pattern, mapping and properties deduced from its complete coding sequence. *Mol Gen Genet* 231:385-394
- Vogelstein B, Gillespie D** (1979). Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc Natl Acad Sci USA* 76:615
- Watabe S, Hartshorne DJ** (1990) Paramyosin and the catch mechanism. *Comp Biochem Physiol* B96:639-646
- Watabe S, Iwasaki K, Funabara D, Hirayama Y, Nakaya M, Kikuchi K** (2000) Complete amino acid sequence of *Mytilus* anterior byssus retractor paramyosin and its putative phosphorylation site *J. Exp. Zool.* 286:24-35
- Watabe S, Tsuchiya T, Hartshorne DJ** (1989) Phosphorylation of paramyosin *Comp. Biochem. Physiol* B94:813-821
- Waterkeyn J, Gauci C, Cowman A, Lightowlers M** (1997). Sequence analysis of a gene family encoding *Taenia ovis* vaccine antigens expressed during embryogenesis of egg. *MBP* 86:75-84
- Waterston RH, Hirsh DI, Lane TR** (1984) Dominant mutations affecting muscle structure in *Caenorhabditis elegans* that map near the actin gene cluster. *J Mol Biol* 180:473-496
- Weiss L, Reinberg D** (1992) Transcription by RNA polymerase II: initiator-directed formation of transcription-competent complexes. *FASEB J* 6:3300-3309
- Weiss L, Reinberg D** (1997) Accurate positioning of RNA polymerase II on a natural TATA-less promoter is independent of TATA-binding-protein-associated factors and initiator-binding proteins. *Mol Cell Biol* 17:2973-2984
- White A Jr, Molinari JL, Pillai A, Rege A** (1992) Detection and preliminary characterization of *Taenia solium* metacestode proteases. *J Parasitol* 78:281-287
- White AC Jr, Baig S, Chapell CL** (1997) Characterization of a cysteine proteinase from *Taenia crassiceps* cysts. *MBP* 85:243-253
- White AC Jr, Molinari JL, Pillai AV, Rege AA** (1992) Detection and preliminary characterization of *Taenia solium* metacestode proteases. *J Parasitol* 78:281-287
- White AC Jr, Robinson P, Jun R** (1997) *Taenia solium* cysticercosis: host-parasite interactions and the immune response. *Chem Immunol* 66:209-230.
- White AC Jr, Tato P, Molinari JL** (1992) Host-parasite interactions in *Taenia solium* cysticercosis. *Infect Agents Dis* 1:185-193
- White AC Jr.** (2000) Neurocysticercosis: updates on epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and management. *Annu Rev Med* 51:187-206.
- Willms K, Arcos L** (1977) *Taenia solium*: Host serum proteins on the cysticercus surface identified by an ultrastructural immunoenzyme technique. *Exp Parasitol* 43:396-406

- Willms K, Merchant MT** (1980) The inflammatory reaction surrounding *Taenia solium* larvae in pig muscle: Ultrastructural and Light Microscopic Observations. *Parasite Immunol* 2:261-275
- Willms K, Merchant MT, Díaz S, Arcos L** (1982) Host-parasite interface in the metacystode of *Taenia solium*. En: Flisser A, Willms K, Lacleste JP, Larralde C, Ridaura C, Beltran F (eds): *Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives*, New York, Academic Press, 1982; 397-411
- Wilson RA, Webster L** (1974) Protonephridia. *Biol Rev* 49:127-160
- Woodhouse E, Flisser A, Larralde C** (1982) Seroprevalence of human cysticercosis in México. En: Flisser A, Willms K, Lacleste JP, Larralde C, Ridaura C, Beltran F (eds): *Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives*, New York, Academic Press, p.11
- Wu Y, Egerton G, Ball A, Tanguay RM, Bianco AE** (2000) Characterization of the heat-shock protein 60 chaperonin from *Onchocerca volvulus*. *MBP* 107:155-168
- Yang W, Waine GJ, Sculley DG, Liu X, McManus DP** (1992) Cloning and partial nucleotide sequence of *Schistosoma japonicum* paramyosin: a potential vaccine candidate against schistosomiasis. *Int. J. Parasitol.* 22:1187-1191
- Zakut R, Shani DG, Neuman DY, Nudel V** (1982). Nucleotide sequence of the rat skeletal muscle actin gene. *Nature* 298:857-859.
- Zenteno G** (1965) Aspectos quirúrgicos de 2 000 personas internadas en la Unidad de Neurología y Neurocirugía, Hospital General de México, SSA, 1959-1963. *Rev Med Hosp Gral Mex* 28:515-521
- Zhang D, Miller DJ** (1995) Characterization of a novel non-muscle myosin-related protein from *Onchocerca gibsoni*. *Int. J. Parasitol.* 25:1385-1391
- Zhou JC, Yi XY, Kalinna BH, McManus DP** (2000) Expression and purification of recombinant *Schistosoma japonicum* paramyosin. *Hunan Yi Ke Da Xue Xue Bao* 25:106-108
- Zhou S, Liu S, Song G, Xu Y, Sun W** (2000) Protective immunity induced by the full-length cDNA encoding paramyosin of Chinese *Schistosoma japonicum*. *Vaccine* 15 (18), 3196-3204
- Zhou SH, Liu SX, Song GC, Xu YX** (1999) Cloning, sequencing and expression of the full-length cDNA encoding paramyosin of Chinese *Schistosoma japonicum*. *Chung Kuo Chi Sheng Chung Hsueh Yu Chi Sheng Chung Ping Tsa Chih*

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

APÉNDICE A1

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Original Paper

Gene structure of *Taenia solium* paramyosin

Laura Vargas-Parada · Juan Pedro Laclette (✉)

L. Vargas-Parada · J.P. Laclette

Department of Immunology, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, A.P. 70228, 04510 Mexico City, Mexico

✉ E-mail: laclette@servidor.unam.mx
Phone: +525-622-3862
Fax: +525-550-6447

Received: 23 March 2002 / Accepted: 23 September 2002 / Published online:

Abstract. Paramyosin is a muscle protein that probably plays a role in the survival of the larval stage of *Taenia solium* during its prolonged host-parasite relationship. Here we describe the structure of the gene coding for the paramyosin of *T. solium*. The characterization of two clones obtained from a genomic library showed that the complete gene of paramyosin contains 13 introns delimited by conventional eukaryotic splice signals. Comparison with the paramyosin genes of *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans* showed a lack of conservation of the exon/intron organization in contrast to other muscle genes. No evidence of alternative splicing sites were found, excluding the possibility that *T. solium* expresses a mini-paramyosin like *D. melanogaster*.

Introduction

Paramyosin is a major structural component of thick filaments in the muscles of many invertebrates (Elfvin et al. 1976). Paramyosin filaments interact strongly with myosin, suggesting that this provides the foundation for the assembly of the thick filament (Epstein et al. 1985; Cohen et al. 1987). About 95% of the complete amino acid sequence of this protein shows the distinctive heptad repeat of α -helical structures that form homodimeric coiled-coils (Cohen et al. 1971; Cohen and Parry 1990). Paramyosin can be phosphorylated, generally on the serine residues, but the number and location of phosphorylation sites varies in different species (Vinós et al. 1991; Dey et al. 1992).

Paramyosin has been identified as an antigen in several parasitic diseases caused by helminths (Pearce et al. 1986; Limberger and McReynolds 1990; Laclette et al. 1991; Mühlischlegel et al. 1993), and is the target of protective immunity in some of them (Pearce et al. 1988; Nanduri and Kazura 1989; Gobert 1998). *Taenia solium* paramyosin (TPmy) is a prominent antigen in human cysticercosis that shows the ability to bind collagen (Laclette et al. 1990) and inhibits, in vitro, the classical pathway of complement through the inhibition of the C1 function (Laclette et al. 1992; Landa et al. 1993).

Recently, human T and B cell epitopes of TPmy have been mapped (Vazquez-Talavera et al. 2001a) and its protective potential tested in the murine model of cysticercosis (Vazquez-Talavera et al. 2001b).

The paramyosin genes of only two organisms have been characterized: the roundworm *Caenorhabditis elegans* (Kagawa et al. 1989) and the fruit fly *Drosophila melanogaster* (Maroto et al. 1995). In the *Drosophila* gene, an isoform called miniparamyosin (mPmy) can be produced through alternative splicing. Here we present the complete sequence of the TPmy gene. Comparison between the three genes shows some degree of conservation of the exon/intron organization only near the 5' end. A tendency towards decreasing the number of introns during the evolution of paramyosin may be inferred from the gene comparison.

Materials and methods

Isolation and characterization of TPmy genomic clones

A *T. solium* genomic library containing about 8×10^4 independent recombinants with insert sizes of 5-15 kb, constructed in the vector λ Syrix 2A (Lutz et al. 1987) was kindly provided by A. Landa. Approximately 30,000 recombinant plaques of the genomic library were initially screened using a cDNA 32 P-labelled probe containing the full length coding sequence of TPmy. The probe was obtained through PCR amplification with oligonucleotides (5' -ATGTCTGAATCACACGTC-3', 5' -CTACATGATGCTGGTTGC-3'), using as a template the total DNA from a pRSET cDNA library (Landa et al. 1993). To ensure that the genomic clones contained the complete TPmy gene, secondary and tertiary screening of duplicate nitrocellulose filters were carried out in parallel using probes containing DNA fragments corresponding to the 5' and 3' ends of the coding sequence of TPmy. These probes were obtained through PCR amplification with oligonucleotides (5' -ATGTCTGAATCACACGTC-3', 5' -ATTTCCGGCTGCCTCG-3') for the 5' -end probe and (5' -CTCAACCGCGAGAACA-3', 5' -CTACATGATGCTGGTTGC-3') for the 3' -end probe, using as a template the DNA from the pRSET cDNA library. Hybridisation was performed in $6 \times$ SSC (150 mM NaCl/15 mM sodium citrate, pH 7.0), $5 \times$ Denhardt's solution, 25% formamide and 0.1% SDS at 37°C overnight (Sambrook et al. 1989). Several plaques that hybridised with both probes were selected.

DNA from positive clones was isolated using a phage lambda DNA isolation kit (Qiagen lambda system, Qiagen). Both strands of the purified lambda phage DNA were sequenced with an Applied Biosystems 310 automatic sequencer using ABI Prism dye terminator sequencing kits and with primers designed ad hoc.

To characterize the transcriptional start-point for paramyosin, a 5' -end analysis (Frohman 1993) was performed with the 5' RACE system for rapid amplification of cDNA ends version 2.0 (Invitrogen Life Technologies), using three specific primers: (5' -GACCAAGAACGTTATCG-3'), (5' -GCCCTGCCCTTCTGCTTCTG-3'), (5' -GTGGCCTCGGCAGTTTCG-3'), and following the manufacturer's instructions. Sequencing the 5' RACE product was carried out as above.

Nucleotide and amino acid sequence analyses were performed using standard computer programs (PC/GENE, Intelligenetics, and DNAMAN version 2.6, Lynnon Biosoft). The sequence identity is equal to the number of aligned sequence positions containing identical residues (amino acids) divided by the number of sequence positions compared. The source of other gene and protein sequences was the GenBank database.

Results and discussion

Two out of the five clones (C5 and C9) that proved positive to the probes for the 5' and for the 3' ends of the coding sequence of TPmy were selected for characterization. Both clones were identical in sequence. Alignment between the genomic and cDNA sequences allowed the delineation of introns and exons. Fourteen exons and 13 introns were identified (Table 1). Analysis of the complete sequence using the PC/GENE system for searching branchpoint consensus confirmed the positions of the introns and exons. The intron/exon boundaries conserved in all cases the consensus N/GT-AG/N sequence (Seif et al. 1979; Breathnack and Chambon 1981). Large and small introns showed a higher A+T content than exons, in agreement with this general property in many species (Csank et al. 1990).

Table 1. Nucleotide sequences of the intron-exon boundaries of the *Taenia solium* paramyosin gene. Numbers in brackets specify the length of each exon and intron in bp; numbers for exons I and IV include the coding sequence only. In the acceptor sequence, the final AG is conserved for splicing, and the initial GT is conserved for splicing in the donor sequence

Intron	Exon	Intron
Acceptor sequence		Donor sequence
	I (72) CTTGAG	GTATTA (386)
GTAAAG	AGTCGC II (57) GTCCGG	GTATGA (264)
TCTAAG	GCTGAA III (87) CAGACT	GTAAGC (811)
CTACAG	CACGAT IV (167) GGGCAG	GTAAGT (382)
TTTTAG	GGCAGA V (79) GCCAAG	GTAATT (373)
TTTTAG	GCCTCA VI (246) GCACGC	GTAAGT (74)
CTGTAG	AATCGC VII (197) ACTCAA	GTAGGT (109)
TTGTAG	ACGCAA VIII (133) GAGGCG	GTAGGT (240)
TGACAG	TTGGCA IX (217) TTGGCG	GTACGC (399)
CCACAG	ATCAAC X (241) TCTGAG	GTCAGT (244)
TTTTAG	AAAGAG XI (490) CGCAAG	GTATCA (76)
CTAAAG	GCTGCT XII (201) CTCCAG	GTTAGA (76)
CATTAG	AATCGG XIII (207) GAACAG	GTGCAG (80)
CTATAG	GAAGAG XIV (198) TAG	

Nucleotide sequences 1.5 kb upstream from the ATG start codon and 1 kb downstream from the translation stop signal were also obtained. The start-point of the paramyosin transcript was located by 5' RACE analysis. Eight clones of the 5' RACE product were sequenced; in six clones the putative

start point was located 304 bp upstream of the ATG start codon, whereas the other two occurred three base pairs upstream or downstream of that position. Interestingly, a putative CAP signal coincided with the location of the transcriptional start point.

A number of putative regulatory elements were identified in the 5' flanking region. CCAAT elements, found to be critical in numerous eukaryotic promoters (Santoro et al. 1988), were detected at 65, 368 and 458 upstream of the ATG start codon. The second element appears within an appropriate distance from the putative paramyosin transcriptional start. A putative GC box and an A+T rich region were located at 570 and 623 upstream of the ATG start codon, respectively (Bucher 1990). The *cis*-acting DNA elements responsible for muscle-specific transcription were also searched; four putative E-boxes, proposed as the consensus binding site of muscle-specific transcription factors of the MyoD family (Olson 1990), were found at -47, -819, -914 and -979 upstream of the ATG start codon. In contrast, analysis of the 3' flanking region did not detect conventional signals for the polyadenylation (AAUAAA) of eukaryotic mRNAs (Fitzgerald and Shenk 1981).

Coding sequences are available for paramyosins of nine different species. The predicted amino acid sequences are highly variable ranging from 96.5% identity between *T. solium* and *Echinococcus granulosus*, to only 34.5% and 30.8% identity, for *D. melanogaster* and *C. elegans*, respectively (Table 2). A clear correlation can be established between the identity among paramyosin amino acid sequences and the phylogenetic distance between species, for example, the close relationship between nematodes and arthropods (Aguinaldo et al. 1997).

Table 2. Amino acid sequence identity among paramyosins. Numbers are given in percent. Platyhelminthes: *Taenia solium*, *Echinococcus granulosus*, *Schistosoma japonicum* and *Schistosoma mansoni*; Mollusca: *Mytilus galloprovincialis*; Nematoda: *Anisakis simplex*, *Brugia malayi*, *Onchocerca volvulus* and *Caenorhabditis elegans*; Arthropoda: *Drosophila melanogaster*. Indicated accession numbers are for cDNA sequences

	<i>E. g</i>	<i>S. j</i>	<i>S. m</i>	<i>M. g</i>	<i>A. s</i>	<i>B. m</i>	<i>O. v</i>	<i>C. e</i>	<i>D. m</i>	Accession no.
<i>T. solium</i>	96.52	73.04	72.23	48.35	30.23	31.14	31.71	30.76	34.54	L13723
<i>E. granulosus</i>		73.4	72.36	51.33	31.96	31.66	32.28	31.84	34.65	Z21787
<i>S. japonicum</i>			96.19	52.0	33.25	32.48	33.22	32.83	32.45	D28811
<i>S. mansoni</i>				51.88	32.77	32.13	32.75	32.36	32.56	M35499
<i>M. galloprovincialis</i>					35.4	35.56	36.82	34.64	34.33	BAA_6517
<i>A. simplex</i>						89.5	91.19	85.95	47.35	AF173004
<i>B. malayi</i>							95.67	87.34	47.15	AAC18613
<i>O. volvulus</i>								88.98	47.66	A48575
<i>C. elegans</i>									48.9	XO8068
<i>D. melanogaster</i>										X58722

The structure of paramyosin genes is only available for *D. melanogaster* (Maroto et al. 1995) and *C. elegans* (Kagawa et al. 1989). The *T. solium* paramyosin gene was 6,106 bp long from the start to the stop translation codons, containing 57.5% of intervening sequences in 13 introns, whereas the genes in *D. melanogaster* and *C. elegans* are 9,003 and 11,432 bp long, with a content of 76.9% and 70.5% intervening sequences, in eight and ten introns, respectively (Fig. 1). The size of exons II-IV of *T.*

solium and *D. melanogaster* is identical; other exons appear fused or split among the three species. This lack of conservation of the exon/intron organization is in contrast with the gene structure reported for tropomyosin II, where exon organization is conserved even between vertebrates and invertebrates (Hanke and Storti 1988). Considering that platyhelminths emerged earlier than protostomes (Aguinaldo et al. 1997) the structure of the three genes would suggest a tendency towards decreasing the number of introns during the evolution of paramyosin.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- Cohen C, Parry DA (1990) Alpha-helical coiled-coils and bundles: how to design an alpha-helical protein. *Proteins* 7:1-15
- Cohen C, Szent-Györky AG, Kendrick-Jones J (1971) Paramyosin and the filaments of molluscan "catch" muscles. I. Paramyosin: structure and assembly. *J Mol Biol* 56:223-237
- Cohen C, Lanar DE, Parry DA (1987) Amino acid sequence and structural repeats in schistosome, paramyosin match those of myosin. *Biosci Rep* 7:11-6
- Csank C, Taylor FM, Martindale DW (1990) Nuclear pre-mRNA introns: analysis and comparison of intron sequences from *Tetrahymena thermophila* and other eukaryotes. *Nucleic Acids Res* 18:5133-5141
- Dey CS, Deitiker PR, Epstein HF (1992) Assembly-dependent phosphorylation of myosin and paramyosin of native thick filaments in *Caenorhabditis elegans*. *Biochem Biophys Res Commun* 186:1528-1532
- Elfvin M, Levine RJC, Dewey MM (1976) Paramyosin in invertebrate muscles. *J Cell Biol* 71:261-272
- Epstein HF, Miller DM III, Ortiz I, Berliner GC (1985) Myosin and paramyosin are organized about a newly identified core structure. *J Cell Biol* 100:904-915
- Fitzgerald M, Shenk T (1981) The sequence 5' -AAUAAA-3' forms part of the recognition site for polyadenylation of late SV40 mRNAs. *Cell* 24:251-260
- Frohman MA (1993) Rapid amplification of complementary DNA ends for generation of full-length complementary DNAs: thermal RACE. *Methods Enzymol* 218:340-356
- Gobert GN (1998) The role of microscopy in the investigation of paramyosin as a vaccine candidate against *Schistosoma japonicum*. *Parasitol Today* 14:115-118
- Hanke PD, Storti RV (1988) The *Drosophila melanogaster* tropomyosin II gene produces multiple proteins by use of alternative tissue-specific promoters and alternative splicing. *Mol Cell Biol* 8:3591-3602
- Kagawa H, Gengyo K, McLachlan AD, Brenner S, Karn J (1989) Paramyosin gene (unc-15) of *Caenorhabditis elegans*. Molecular cloning, nucleotide sequence and models for thick filament structure. *J Mol Biol* 207:311-333
- Laclette JP, Alagón A, Willms K, Torre-Blanco A (1990) Purification of antigen B from *Taenia solium* cysticerci by affinity to mammalian collagen. *J Parasitol* 76:273-275
- Laclette JP, Landa A, Arcos L, Willms K, Davis AE, Shoemaker CB (1991) Paramyosin is the *Schistosoma mansoni* (Trematoda) homologue of antigen B from *Taenia solium* (Cestoda). *Mol Biochem Parasitol* 44:287-296
- Laclette JP, Shoemaker CB, Richter D, Arcos L, Pante N, Cohen C, Bing D, Nicholson-Weller A (1992) Paramyosin inhibits complement C1. *J Immunol* 148:124-128

- Landa A, Lacleste JP, Nicholson-Weller A, Shoemaker CB (1993) cDNA cloning and recombinant expression of collagen-binding and complement inhibitor activity of *Taenia solium* paramyosin (AgB). *Mol Biochem Parasitol* 60:343-348
- Limberger RJ, McReynolds LA (1990) Filarial paramyosin: cDNA sequences from *Dirofilaria immitis*, and *Onchocerca volvulus*. *Mol Biochem Parasitol* 38:271-280
- Lutz CT, Hollifield WC, Seed B, Davie JM, Huang HV (1987) Syrinx 2A: an improved λ phage vector designed for screening DNA libraries by recombination in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:4379-4383
- Maroto M, Arredondo JJ, San Román M, Marco R, Cervera M (1995) Analysis of the paramyosin/miniparamyosin gene. *J Biol Chem* 270:4375-4382
- Mühlschlegel F, Sygulla L, Frosch P, Massetti P, Matthias F (1993) Paramyosin of *Echinococcus granulosus*: cDNA sequence and characterization of a tegumental antigen. *Parasitol Res* 79:660-666
- Nanduri J, Kazura JW (1989) Paramyosin-enhanced clearance of *Brugia malayi* microfilaremia in mice. *J Immunol* 143:3359-3363
- Olson EN (1990) MyoD family: a paradigm for development? *Genes Dev* 4:1454-1461
- Pearce EJ, James SL, Dalton J., Barral A, Ramos C, Strand M, Sher A (1986) Immunochemical characterization and purification of Sm-97, a *Schistosoma mansoni* antigen monospecifically recognized by antibodies from mice protectively immunized with a nonliving vaccine. *J Immunol* 137:3593-3600
- Pearce EJ, James SL, Hieny S, Lanar DE, Sher A (1988) Induction of protective immunity against *Schistosoma mansoni* by vaccination with schistosome paramyosine (Sm 97), a non surface parasite antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:5678-5682
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning. A laboratory manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York
- Santoro C, Mermoud N, Andrews PC, Tjian R (1988) A family of human CCAAT-box-binding proteins active in transcription and DNA replication: cloning and expression of multiple cDNAs. *Nature* 334:218-224
- Seif I, Khoury G, Dhar R (1979) BKV splice sequences based on analysis of preferred donor and acceptor sites. *NAR* 6:3387-3397
- Vázquez-Talavera J, Solís CF, Medina-Escutia E, Morales-López Z, Proaño J, Correa D, Lacleste JP (2001a) Human T and B cell epitope mapping of *Taenia solium* paramyosin. *Parasite Immunol* 23:575-579
- Vázquez-Talavera J, Solís CF, Terrazas LI, Lacleste JP (2001b) Characterization and protective potential of the immune response to *Taenia solium* paramyosin in a murine model of cisticercosis. *Infect Immun* 69:5412-5416
- Vinós J, Domingo A, Marco R, Cervera M (1991) Identification and characterization of *Drosophila melanogaster* paramyosin. *J Mol Biol* 220:687-700

APÉNDICE A2

ANTECEDENTES

Respuesta a estrés

Un factor importante en la supervivencia de los parásitos, es su capacidad para responder a los cambios ambientales, ya sean de temperatura, pH, concentración de nutrientes e incluso a la presencia de oxidantes generados durante la respuesta inmune. La respuesta a estrés es un mecanismo general homeostático que protege a las células y organismos de los efectos deletéreos del estrés ambiental (Lindquist 1986; Morimoto 1990; Maresca y Carratú 1992). Se caracteriza por la rápida activación transcripcional de un grupo específico de genes que codifican para las llamadas proteínas de estrés (Morimoto 1997). En *Mesocestoides corti* se reportó la existencia de dos proteínas de estrés por calor (HSPs por sus siglas en inglés) que son excretadas/secretadas en respuesta al incremento en temperatura (Estes y Teale 1991). Estas dos proteínas, homólogas a HSP60 y HSP70 estimulan la proliferación de linfocitos de ratones infectados, y restringen la respuesta de anticuerpos a los isotipos IgM e IgG1, sugiriendo una posible modulación de la respuesta inmune del hospedero. *Trichinella spiralis* y *T. pseudospiralis*, excretan/secretan dos antígenos utilizados comúnmente para el inmunodiagnóstico, los cuales podrían corresponder a proteínas de estrés ya que sus masas moleculares y puntos isoeléctricos son similares a los descritos para proteínas de estrés (Ko y Fan 1996). El cuadro 1 muestra un listado de las proteínas de estrés identificadas en helmintos.

La huevos de *T. solium* sufren importantes cambios de temperatura mientras se encuentran en el medio ambiente, así como al ser ingeridos por el hospedero intermediario de sangre caliente. Más aún, la larva y el adulto pueden ser expuestos a cambios repentinos de temperatura debidos a la respuesta del hospedero a otras infecciones (fiebre). La adaptación a estos cambios es crucial para el mantenimiento de la transmisión del parásito. Puesto que se desconocía si *T. solium* responde al estrés, se estudió la respuesta al estrés por temperatura en cisticercos tanto de *T. solium* como de *T. crassiceps*. Se encontró que, aunque con ciertas diferencias, tanto *T. solium* como *T. crassiceps* responden al estrés por temperatura de una manera similar a la reportada para otros organismos. Además, en *T. solium* se encontró que varias proteínas se excretan/secretan por la larva durante el estrés, incluyendo dos HSP que reaccionaron con los sueros de pacientes con neurocisticercosis, lo que muestra su naturaleza antigénica durante la infección (Vargas-Parada et al. 2001).

Proteínas de estrés reportadas en Nematodos

<i>Brugia pahangi</i>	HSP56, HSP60/65, HSP72/73, HSP87, HSP106 kDa HSP83 sHSP (18, 22-24 kDa)	Jecock y Devaney 1992 Thompson et al 2001 Jecock y Devaney 1992, Thompson et al 1996
<i>Brugia malayi</i>	HSP70, HSC70, E/S Antigenes sHSP	Rothstein y Rajan 1991, Selkirk et al 1989 Raghavan et al 1999
<i>Caenorhabditis elegans</i>	HSP90, HSP70 sHSP (16,18,25, 43kDa)	Dalley y Golomb 1992, Heschl 1990 Candido 2002, Ding y Candido 2000a, Ding y Candido 2000b, Hockertz et al 1991, Candido et al 1989, Rusznak et al 1983 Lillibridge et al 1996 van Leeuwen 1995
<i>Dirofilaria immitis</i>	sHSP p27, HSP45, HSP52, HSP70	
<i>Haemonchus contortus</i>	sHSP (18, 25 kDa), 40 y 69 kDa, HSC65, HSC72 HSP73, TBZ 20kDa	
<i>Nippostrongylus brasiliensis</i>	sHSP	Tweedie et al 1993
<i>Onchocerca volvulus</i>	HSP60 HSP70	Wu et al 2000 Rothstein et al 1989
<i>Strongylus venezuelensis</i>	sep (16,22 kDa), HSP70	Tsuji et al 1997
<i>Setaria digitata</i>	HSP70	Jayasena et al 1999
<i>Trichinella britovi</i>	HSP70 (72kDa)	Vayssier et al 1999
<i>Trichinella spiralis</i>	HSP60, HSP70, HSP90 Histone H3, Histone H2B, Translationally Controlled Tumour Protein HSP (20, 47, 50, 70, 80 y 86 kDa), E/S HSP (11, 45, 53 y 64 kDa) HSP (20, 26, 31, 50, 53, 70, 80 y 86 kDa), E/S HSP (11, 35, 37, 41 y 64 kDa) E/S sHSP (15kDa)	Martinez et al 2001, Martinez et al 2000 Niak et al 2001 Ko y Fan 1996 Ko y Fan 1996 Chung y Ko 1999

Proteínas de estrés reportadas en Tremátodos

<i>Schistosoma mansoni</i>	sHSP (HSP27, p40, 38kDa, p50), HSP70 HSP60, HSP90 (86kDa) HSP70	Cai et al 1996, Neumann et al 1993, Neumann et al 1992, Moser et al 1990, Hedstrom et al 1987, Nene et al 1986 Tielens et al 1993, Johnson et al 1989 Scott y McManus 1999
<i>Schistosoma japonicum</i>		

Proteínas de estrés reportadas en Céstodos

<i>Echinococcus granulosus</i>	GRP78 kDa HSP60, HSP70	Muhlschlegel et al 1995 Martinez et al 1999, Martinez et al 1999
<i>Echinococcus multilocularis</i>	GRP 78 kDa	Muhlschlegel et al 1995
<i>Mesocestoides corti</i>	E/S HSP (60 y 70kDa)	Ernani y Teale 1993, Estes y Teale 1991
<i>Taenia saginata</i>	sHSP (36kDa)	Benitez et al 1998
<i>Taenia solium</i>	sHSP (14-38kDa), HSP70, HSP80, E/S HSP (LMWP y 66kDa)	Vargas-Parada et al 2001
<i>Taenia crassiceps</i>	sHSP (14-38kDa), HSP50, HSP60, HSP70, HSP80	Vargas-Parada et al 2001

Cuadro 1. Proteínas de estrés identificadas en helmintos.

Resulta interesante la analogía con lo observado en la respuesta al estrés por calor en *M. corti* y queda por investigar si las HSP de *T. solium* que son excretadas/secretadas tienen un papel inmunomodulador y si el mismo tipo de respuesta se observa ante el estrés oxidativo, por hipoxia, por falta de nutrientes, por la presencia de sales (como el calcio) e incluso por fármacos.

Heat shock and stress response of *Taenia solium* and *T. crassiceps* (Cestoda)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

L. VARGAS-PARADA, C. F. SOLÍS and J. P. LACLETTE*

Department of Immunology, Instituto de Investigaciones Biomédicas, A.P. 70228, Cd. Universitaria 04510 México D.F., México

(Received 23 September 2000; revised 20 November 2000; accepted 20 November 2000)

SUMMARY

Heat shock and stress responses are documented for the first time in larval stages of the cestodes *Taenia solium* and *Taenia crassiceps*. Radioactive metabolic labelling after *in vitro* incubation of cysts at 43 °C, revealed the induction of heat shock proteins. In *T. crassiceps*, the major heat shock proteins were 80, 70 and 60 kDa. After prolonged incubation, a set of low molecular weight heat shock proteins (27, 31, 33 and 38 kDa), were also induced. *In vitro* incubation of cysts at 4 °C, induced the synthesis of stress proteins ranging from 31 to 80 kDa, indicating the parasite is also able to respond to cold shock. *T. solium* cysts exposure to temperature stress also resulted in an increased synthesis of 2 major heat shock proteins of 80 and 70 kDa. Western blots using the excretory–secretory products of *T. solium* showed that 2 heat shock proteins were recognized by antibodies in the sera of cysticercotic patients: one of 66 kDa and another migrating close to the run front. The *T. solium* 66 kDa protein was also recognized by specific antibodies directed to a 60 kDa bacterial heat shock protein, suggesting that it belongs to this family of proteins.

Key words: *Taenia solium*, *Taenia crassiceps*, cestodes, heat shock proteins, stress, excretory–secretory products.

INTRODUCTION

Many parasites undergo sudden changes in temperature at some stage during their life-cycle (Newport, Culpepper & Agabian, 1988; Polla, 1991; Maresca & Carratù, 1992). For example, taeniid eggs in the environment suffer an increase in temperature when ingested by its warm-blooded intermediate host. The larvae in the intermediate host also undergo strong variations of temperature before reaching its final host. Moreover, larvae and adult worms may be exposed to sudden temperature changes due to host response to infection. Adaptation to these temperature variations is crucial for the maintenance of parasite transmission.

The heat shock response is a general homeostatic mechanism that protects cells and organisms from deleterious effects of environmental stress (Lindquist, 1986; Morimoto, 1990). It is characterized by a rapid transcriptional activation of a specific set of genes coding for proteins generically known as heat shock proteins (HSPs). These HSPs allow the adaptation of the organism to the new temperature (Morimoto *et al.* 1997; Feder & Hofmann, 1999). Similar adaptive responses are produced for a variety of other environmental stresses (Welch *et al.* 1991; De Maio, 1999). To our

knowledge, no previous report is available on the heat shock and stress responses in taeniids, although some HSPs have been identified (Muhlschlegel *et al.* 1995; Benitez *et al.* 1998; Martinez *et al.* 1999). In *Mesocestoides corti*, Estes & Teale (1991) have reported the occurrence of HSPs in excretory–secretory (E–S) products. Here we describe a time-regulated induction of HSPs when *Taenia solium* and *T. crassiceps* larvae are maintained in culture at temperatures above 37 °C. Several proteins are excreted/secreted by *T. solium* larvae during the stress response, including 2 HSP, that were recognized by sera from patients with neurocysticercosis. The ES protein of 66 kDa was recognized by specific antibodies against bacterial HSP60.

MATERIALS AND METHODS

Larvae

T. solium cysticerci were dissected from the skeletal muscle of naturally infected pigs obtained from rural villages. The cysts were obtained at a maximum of 24 h after slaughter of pigs. The ORF strain of *T. crassiceps* is maintained in our laboratory by serial intraperitoneal passage of cysticerci in 6-week-old female BALB/c AnN mice (Sciutto *et al.* 1990). The larvae used in the experiments were obtained from mice with 2-month infections. Before use, all larvae were washed 5 times in a phosphate-buffered saline solution (PBS), pH 7.2, pre-warmed at 37 °C.

* Corresponding author: Department of Immunology, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, A.P. 70228, 04510 México D.F., México. Tel: +525 622 3862. Fax: +525 622 3369. E-mail: laclette@servidor.unam.mx

Radio-isotope labelling

Groups of 3 *T. solium* or 5 *T. crassiceps* cysts were placed into sterile polypropylene tubes (Falcon) containing 500 μ l of a sterile methionine-free RPMI 1640 medium (GIBCO), pre-warmed at 37 °C (except for the group that was placed at 4 °C), and supplemented with 1% essential amino acids, pyruvate and antibiotic-antimycotic mixture (GIBCO). The groups were then incubated at 4, 37, 43 or 46 °C for 30 min and then metabolically labelled by addition of 100 μ Ci/ml of L-[³⁵S] methionine (specific activity > 1000 Ci/mmol, Amersham) for 4 h or overnight at the same temperatures as indicated above. To determine the kinetics of synthesis of HSPs in *T. crassiceps*, the cysts were maintained at 43 °C (optimal temperature for heat shock response, see results) for 15, 30 min, 1, 2, 4, 6 and 8 h, before adding the radio-isotope labelled methionine, and then maintained for 2 h at 37 °C.

After labelling, the groups of cysts were washed twice with 10 ml of PBS to remove free label and then placed in 500 μ l of SDS-PAGE sample buffer for homogenization in a Soniprep 150 sonicator, for 40 s (20 s intervals), at 60 Watts. The culture medium containing E-S products was also collected, centrifuged at 1000 g for 10 min to remove any cellular debris and the supernatant was stored at -20 °C until use. Protein concentration in the crude extracts and culture medium was determined using a protein assay kit (BioRad).

Autoradiography

The crude extracts and the culture medium were analysed by sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970). Samples of equal amounts of protein (5–20 μ g/well) were run under reducing conditions and the gel was stained with Coomassie Brilliant Blue R-250 (BioRad) or Silver Stain (BioRad). The gel was prepared for fluorography by treatment with a 20% solution of PPO in dimethylsulfoxide (Laskey & Mills, 1975), dried on a BioRad slab gel drier and exposed to an X-ray film (Kodak X-OMAT) at -70 °C. Relative increases over controls for each HSP were determined by densitometric scanning of the protein bands by means of a microcomputer program (RFLP scan 3.0, Scanalytics Inc., Fairfax, VA, USA).

Western blotting

Western immunoblots were carried out according to the method of Towbin, Staehelin & Gordon (1979), using a rabbit polyclonal anti-HSP60, a mouse mAb anti-HSP70 (SPA-804 and SPA-822, respectively,

from StressGen Biotechnologies Corp., Victoria B.C., Canada), and a mouse mAb IgG1 anti-HSP60 (LK2, kindly provided by P. van Kooten (Boog *et al.* 1992), at a 1:100 dilution. Sera from patients with neurocysticercosis or other neurological disorders (kindly donated by D. Correa) were used at 1:30 dilution. Peroxidase-conjugated rabbit anti-mouse, goat anti-rabbit or goat anti-human antibodies (Zymed Laboratories) diluted 1:1000 were used followed by 0.1% diaminobenzidine with 0.015% hydrogen peroxide to develop the blots.

RESULTS

Effect of temperature on protein synthesis in T. solium and T. crassiceps

Autoradiograms of the L-[³⁵S]methionine labelled crude extracts from cysts of both species, incubated at 37 °C, showed more than 30 protein bands ranging from 21 to 200 kDa (Fig. 1). When *T. solium* larvae were incubated at 43 °C for 4 h, the intensity of the protein bands of 80 (HSP 80) and 70 (HSP 70) kDa was highly increased, whereas the intensity of some labelled proteins observed at 37 °C decreased or disappeared (Fig. 1A). Densitometric analysis on the 2 major HSPs showed an increase over controls of 2.9 and 4 times respectively. At 4 °C and 46 °C no labelled proteins were observed in *T. solium*, suggesting that these temperatures are lethal for the parasite (not shown). Changes in the pattern of protein expression in response to temperature stress were also observed in *T. crassiceps* (Fig. 1B), including the 2 major HSPs described for *T. solium* (80 and 70 kDa). The relative increase over controls for HSP80 and HSP70 was 2.1 and 2.0 times, respectively. As in the case of *T. solium*, the synthesis of some proteins was diminished and in some cases stopped during incubation at 43 °C. Incubation of *T. crassiceps* cysts at 4 °C, induced the preferential synthesis of the 80 kDa protein, although some low molecular weight proteins ranging from 31 to 45 kDa were also observed (Fig. 1B), suggesting a cold shock response (Thieringer, Jones & Inouye, 1998). No label incorporation was detected when the larvae were incubated at 46 °C (not shown), indicating that this temperature also results in cyst killing. Microscopical observations of *T. solium* and *T. crassiceps*, confirmed that the cysts were non-motile after incubation at 46 °C.

Kinetics of synthesis of HSPs in T. crassiceps cysts

T. crassiceps cysts that were incubated at 43 °C for different periods reacted with a typical heat-shock response. In the initial 15–60 min of incubation, 2 proteins of 80 and 70 kDa were the most prominent (Fig. 2). After 2 h, a larger number of proteins were

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

A
Fi
pr
(B
vit
ter
wa
pro

kD

97-

66-

45-

31-

21-

14-

Fig.
cysti
43 °C
trans
with
main
temp

visib
rangi
that
the r

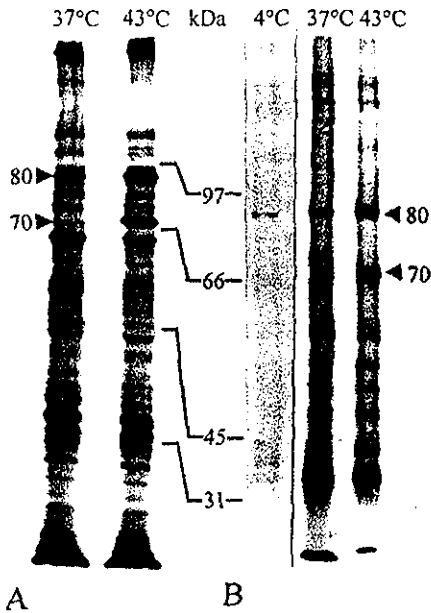


Fig. 1. Autoradiogram showing SDS-PAGE profile of protein synthesis of *Taenia solium* (A) and *T. crassiceps* (B) cysticerci. Parasites were metabolically labelled *in vitro* with [³⁵S]methionine for 4 h at the indicated temperatures, with the exception of the 4 °C lane, which was labelled for 24 h. Arrows denote major heat shock proteins.

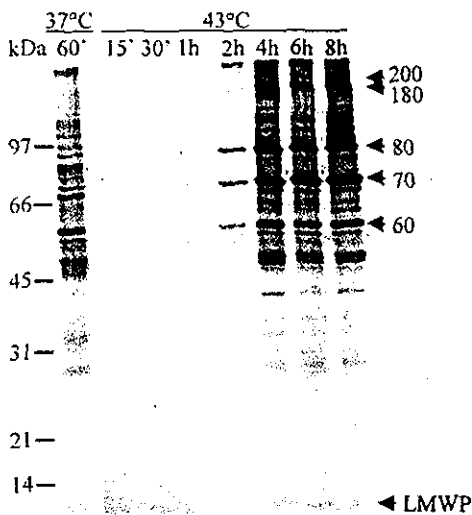


Fig. 2. Kinetics of protein synthesis in *Taenia crassiceps* cysticerci in response to heat shock. After treatment at 43 °C during the indicated time, the cysts were transferred to 37 °C and metabolically labelled *in vitro* with [³⁵S]methionine for 2 h. Control parasites were maintained at 37 °C which is the normal growth temperature. Arrows denote major heat shock proteins.

visible, a major protein of 60 kDa and several others ranging from 14 to 200 kDa, including some proteins that were present before the heat shock. After 8 h, the most prominent bands corresponded to 80, 70

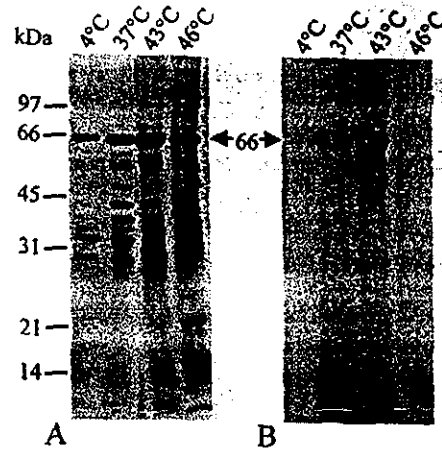


Fig. 3. Excretory-secretory products of *Taenia solium* cysticerci exposed to temperature stress. The cysts were incubated at the indicated temperatures and metabolically labelled with [³⁵S]methionine, overnight. (A) SDS-PAGE profile of the culture medium containing the excretory-secretory products using silver stain. (B) Autoradiogram of the same slab gel.

and 60 kDa, followed by other proteins of 50, 38 kDa and a small protein (LMWP) migrating close to the run front (Fig. 2).

Excreted-secreted heat shock products

The culture media where *T. solium* cysts were maintained overnight at different temperatures were collected, analysed by SDS-PAGE and silver-stained for E-S stress products. At 37 °C, the most prominent E-S proteins were 66, 58, 54, 48, 45, 38, 33 and 31 kDa (Fig. 3A). This pattern of E-S products is similar to that described for *T. solium* by (Ko & Ng 1998). Several high molecular weight proteins are observed in the E-S products from cultures incubated at 43 and 46 °C (Fig. 3A). Autoradiograms of the slab gel revealed a 5-fold increase of a major band of 66 kDa at 43 °C that was also present at 37 °C (Fig. 3B). Protein bands of 97, 74, 54, 52 and 47 kDa are also excreted/secreted at 43 °C. *T. crassiceps* also showed some E-S products in the supernatant (not shown). Some of these products have been described to cross-react with well-known antigens of *T. solium* (Tsang, Brand & Boyer, 1989; Ko & Ng, 1998).

Western blotting using specific anti-heat shock protein antibodies

The cyst extracts and culture media of *T. solium* cysts maintained overnight at 37 or 43 °C, were analysed by Western blot using specific antibodies to HSP60 and HSP70. In the crude extracts, both antibodies revealed protein bands of 60 and 70 kDa,

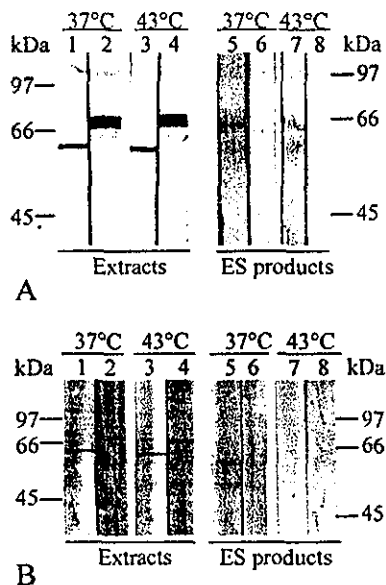


Fig. 4. Antibody recognition of HSP60 and HSP70 in crude extracts and excreted-secreted (ES) products of *Taenia solium* (A) or *T. crassiceps* (B) cysticerci. Lanes 1, 3, 5 and 7 were probed with rabbit polyclonal anti-HSP60. Lanes 2, 4, 6 and 8 were probed with anti-HSP70 mAb.

respectively (Fig. 4A, lanes 1-4). However, they failed to reveal differences in amount, between cysts incubated at 37 and 43 °C, suggesting that at least this 70 kDa protein is different from the HSP70 described above, that is clearly induced during heat shock. This is not surprising, as constitutive expression of a HSP homologue has been reported in *Schistosoma mansoni* (Tielens, Van Den Heuvel & Van Eden, 1993). When the culture media were blotted and reacted with the anti-HSP60 antibody, 2 bands of 66 and 60 kDa were revealed (Fig. 4A, lanes 5 and 7). In contrast, no band was observed when the culture media were probed with the anti-HSP70 monoclonal antibody (Fig. 4A, lanes 6 and 8).

In the *T. crassiceps* crude extracts, similar but thinner protein bands of 60 and 70 kDa were revealed by anti-HSP60 and anti-HSP70 antibodies, respectively (Fig. 4B, lanes 1-4). Also in this case, no quantitative variation was detected between cysticerci incubated at 37 and 43 °C. None of the antibodies reacted with the culture media of *T. crassiceps* cysts (Fig. 4B, lanes 5-8).

Western blotting using sera from patients with neurocysticercosis

Western blots were also performed on the crude extract and culture medium of *T. solium* cysticerci incubated at 43 °C, using sera from patients with neurocysticercosis. When the extract was probed, the sera recognized several antigens including a protein of 80 kDa that may correspond to the HSP 80 (Fig. 5A). When *T. solium* culture medium was

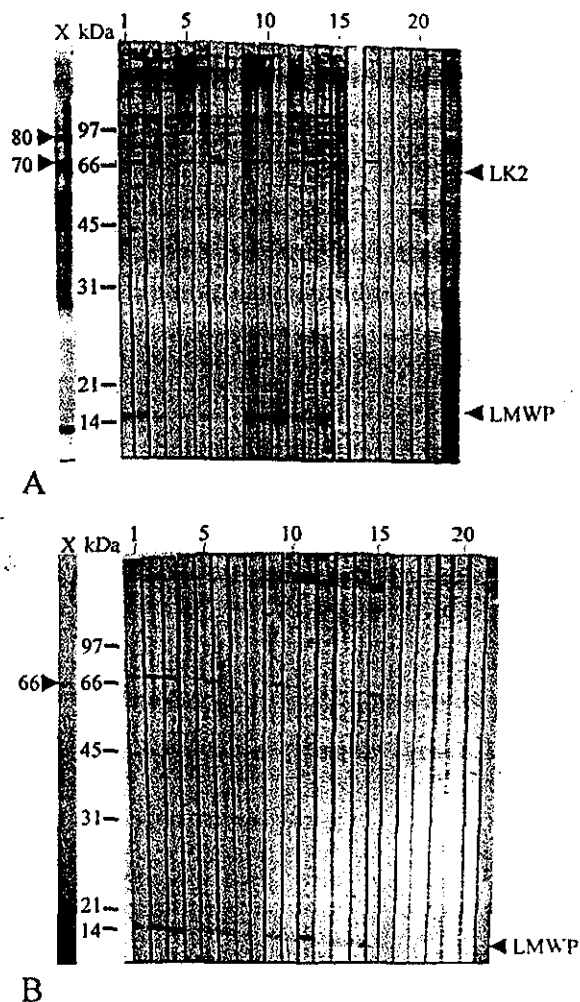


Fig. 5. Western blots of crude extracts and excreted-secreted products of *Taenia solium* cysticerci probed with sera from neurocysticercotic patients. Cysticerci were metabolically labelled with [³⁵S]methionine, at 43 °C, overnight. Crude extracts (A) and excreted-secreted products (B), were reacted with neurocysticercotic patient sera (lanes 1-15), or with sera from patients with other neurological disorders (lanes 16-20). Lane 22 was reacted with a monoclonal antibody directed to HSP60 (LK2) and lane 21 with the second antibody alone. Lane X shows the autoradiogram of the blots.

reacted with the patient sera, all sera recognized a 66 kDa protein and the LMWP (Fig. 5B). The 66 kDa protein, was confirmed to be a HSP by autoradiography, showing that this protein was synthesized during the stress response. Antibody LK2, directed against human HSP60, recognized in the crude extract, a protein band of 60 kDa, as expected, as well as another band of 75 kDa. In contrast, no protein was recognized by the LK2 antibody in the culture medium, indicating that no protein leaked from the cysts and that the integrity of the bladder wall was preserved during incubation at 43 °C.

15

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Similar results were obtained when crude extracts of *T. crassiceps* were reacted with the patient sera (not shown), confirming the extensive antigenic cross-reactivity between these two taeniid cysticerci (Larralde *et al.* 1990; Sciutto *et al.* 1990; Ko & Ng, 1998). However, in the culture medium of *T. crassiceps* cysts, the patient sera failed to detect the 66 kDa band (not shown).

DISCUSSION

The present study documents for the first time the response to temperature stress in cysticerci of *T. solium* and *T. crassiceps*. Both parasites share 2 major proteins in response to heat shock (HSP80 and HSP70), while only *T. crassiceps* synthesized another major 60 kDa protein. The family of HSP80 is known to be immunogenic in other parasites (Newport *et al.* 1988; Polla, 1991). In *Schistosoma mansoni*, an open reading frame of a 86 kDa antigen was shown to be highly homologous to HSP90 of *Saccharomyces cerevisiae* and HSP83 of *Drosophila melanogaster* (Johnson *et al.* 1989). The family of HSP70 is associated with molecular chaperones that facilitate protein transport across membranes, remove denatured proteins, and allow cellular recovery from glucose starvation (Burdon, 1986; Newport *et al.* 1988; Hartl, Martin & Neupert, 1992). HSP70 is also a major immunogen in several parasite infections, including *Brugia* spp., *Onchocerca volvulus* and *S. mansoni* (Hedstrom *et al.* 1988; Rothstein *et al.* 1989; Selkirk *et al.* 1989). HSP60 has also been shown to function as molecular chaperone (Hemmingsen *et al.* 1988; Zeilstra-Ryalls, Fayet & Georgopoulos, 1991) and has been identified in several parasites (Maresca & Carratù, 1992).

Differences in the profile of response to temperature stress observed between the two species of cysticerci, can be due to interspecific variations, or to differences in the way both parasites are obtained before being used in the experiments. While *T. crassiceps* were freshly obtained from infected mice maintained in the laboratory, *T. solium* cysts were obtained at least 5–6 h after slaughter, from naturally infected pigs detected in abattoirs. It is conceivable that the lack of response to low temperature in *T. solium*, might be due to the longer time the cysts remained in the pig carcass before being collected for the experiments.

The heat shock response observed in *T. crassiceps*, resulting in the recovery of several proteins expressed by cysts at 37 °C, suggests that early HSPs play an efficient role in the protection of other proteins, in agreement with some examples of response to stress. Thus, temperature stress response may play a role in the parasite adaptation to sudden changes in environmental temperature.

The presence of HSP66 and LMWP in the E–S products of taeniids has not been reported before.

The labelled proteins detected in E–S products of *T. solium* are regarded as HSPs because both became metabolically labelled during heat-shock treatment. To our knowledge, only 2 other reports have described the occurrence of HSPs among E–S products of helminth parasites. Two E–S proteins of *Mesocestoides corti*, that are homologous to the HSP70 and HSP60, stimulate proliferative responses of splenic lymphocytes of infected mice and antibody responses restricted to IgM and IgG1 isotypes, suggesting that they play a role in the immune response to *M. corti* (Estes & Teale, 1991). Additionally, 2 well-known E–S antigens from the nematode *Trichinella spiralis* and *T. pseudospiralis*, that are commonly employed for serodiagnosis, have been suggested to correspond to stress proteins because of their similar molecular masses and isoelectric points (Ko & Fan, 1996).

Our results indicate that human neurocysticercotic patients recognize at least two excreted/secreted HSPs products. The 66 kDa product that is recognized by a specific antibody against HSP60, appears to correspond to a well-known 66 kDa antigen (Ko & Ng, 1998). It has been reported that HSP60 has to bind a low molecular weight protein of about 10 kDa in order to perform its chaperone function (Gragerov *et al.* 1992). The LMWP that is also recognized by our patient sera, might correspond to the HSP66 partner, explaining why these 2 proteins appear together among the E–S products of cysticerci.

This work was supported in part by grants from CONACYT, LOO42-M9607 and from DGAPA-UNAM, IN-207195 (J.P.L.). L.V.P. was supported by scholarships from CONACYT and DGAPA-UNAM. C.F.S. is supported by scholarships from CONACYT and DGAPA-UNAM. We would like to thank T. Govezensky for the densitometric analysis.

REFERENCES

- BENITEZ, L., HARRISON, L. J., PARKHOUSE, R. M. & GARATE, T. (1998). Sequence and preliminary characterisation of a *Taenia saginata* oncosphere gene homologue of the small heat-shock protein family. *Parasitology Research* **84**, 423–425.
- BOOG, C. J. P., DE GRAEFF-MEEDER, E. R., LUCASSEN, M. A., VAN DER ZEE, R., VOORHOST-OGINK, M. M., VAN KOOTEN, P. J. S., GEUZE, H. J. & VAN EDEN, W. (1992). Two monoclonal antibodies generated against human hsp60 show reactivity with synovial membranes of patients with juvenile chronic arthritis. *Journal of Experimental Medicine* **175**, 1805–1810.
- BURDON, R. H. (1986). Heat shock and the heat shock proteins. *Biochemistry Journal* **240**, 313–324.
- DE MAIO, A. (1999). Heat shock proteins: facts, thoughts, and dreams. *Shock* **11**, 1–12.
- ESTES, D. M. & TEALE, J. M. (1991). Biochemical and functional analysis of extracellular stress proteins of *Mesocestoides corti*. *Journal of Immunology* **147**, 3926–3934.

- FEDER, M. E. & HOFMANN, G. E. (1999). Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annual Reviews in Physiology* **61**, 243–282.
- GRAGEROV, A., NUDLER, E., KOMMISAROVA, N., GAITANARIS, G. A., GOTTESMAN, M. E. & NIKIFOROV, V. (1992). Cooperation of GroEL/GroES and DnaK/DnaJ heatshock proteins in preventing protein misfolding in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **89**, 10341–10344.
- HARTL, F. U., MARTIN, J. & NEUPERT, W. (1992). Protein folding in the cell: the role of molecular chaperones Hsp70 and Hsp60. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* **21**, 293–322.
- HEDSTROM, R., CULPEPPER, J., SCHINSKI, V., AGABIAN, N. & NEWPORT, G. (1988). Schistosome heat-shock proteins are immunologically distinct host-like antigens. *Molecular and Biochemical Parasitology* **29**, 275–282.
- HEMMINGSSEN, S. M., WOOLFORD, C., VAN, D. V. S. M., TILLY, K., DENNIS, D. T., GEORGOPOULOS, C. P., HENDRIX, R. W. & ELLIS, R. J. (1988). Homologous plant and bacterial proteins chaperone oligomeric protein assembly. *Nature, London* **333**, 330–334.
- JOHNSON, K. K., WELLS, K., BOCK, J. V., NENE, V., TAYLOR, D. W. & CORDINGLEY, J. S. (1989). The 86-kilodalton antigen from *Schistosoma mansoni* is a heat-shock protein homologous to yeast HSP-90. *Molecular and Biochemical Parasitology* **33**, 19–28.
- KO, R. C. & FAN, L. (1996). Heat shock response of *Trichinella spiralis* and *T. pseudospiralis*. *Parasitology* **112**, 89–95.
- KO, R. C. & NG, T. F. (1998). Evaluation of excretory/secretory products of larval *Taenia solium* as diagnostic antigens for porcine and human cysticercosis. *Journal of Helminthology* **72**, 147–152.
- LAEMMLI, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature, London* **227**, 680–685.
- LARRALDE, C., SOTELO, J., MONTOYA, R. M., PALENCIA, G., PADILLA, A., GOVEZENSKY, T., DIAZ, M. L. & SCIUTTO, E. (1990). Immunodiagnosis of human cysticercosis in cerebrospinal fluid. Antigens from murine *Taenia crassiceps* cysticerci effectively substitute those from porcine *Taenia solium*. *Archives of Pathological Laboratory Medicine* **114**, 926–928.
- LASKEY, R. A. & MILLS, A. D. (1975). Quantitative film detection of ³H and ¹⁴C in polyacrylamide gels by fluorography. *European Journal of Biochemistry* **56**, 335–341.
- LINDQUIST, S. (1986). The heat-shock response. *Annual Reviews of Biochemistry* **55**, 1151–1191.
- MARESCA, B. & CARRATÙ, L. (1992). The biology of the heat shock response in parasites. *Parasitology Today* **8**, 260–266.
- MARTINEZ, J., PEREZ-SERRANO, J., BODEGA, G., CASADO, N. & RODRIGUEZ-CAABEIRO, F. (1999). Heat shock proteins HSP70 and HSP60 in *Echinococcus granulosus* protoscolices. *Folia Parasitologica (Praha)* **46**, 76–78.
- MORIMOTO, R. I. (1990). The stress response, function of the proteins, and perspectives. In *Stress Proteins in Biology and Medicine* (ed. Morimoto, R. I. Tissières, A. & Georgopoulos, C.), pp. 1–36. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- MORIMOTO, R. I., KLINE, M. P., BIMSTON, D. N. & COTTO, J. J. (1997). The heat shock response: regulation and function of heat-shock proteins and molecular chaperones. *Essays in Biochemistry* **32**, 17–29.
- MUHLSCHEGEL, F., FRISCG, P., CASTRO, A., APFEL, H., MULLER, A. & FROSC, M. (1995). Molecular cloning and characterization of an *Echinococcus multilocularis* and *Echinococcus granulosus* stress protein homologous to the mammalian 78 kD glucose regulated protein. *Molecular and Biochemical Parasitology* **74**, 245–250.
- NEWPORT, G., CULPEPPER, J. & AGABIAN, N. (1988). Parasite heat-shock proteins. *Parasitology Today* **4**, 306–312.
- POLLA, B. S. (1991). Heat shock proteins in host-parasite interactions. *Immunology Today* **12**, A38–41.
- ROTHSTEIN, N. M., HIGASHI, G., YATES, J. & RAJAN, T. V. (1989). *Onchocerca volvulus* heat shock protein 70 is a major immunogen in amicrofilaremic individuals from a filariasis-endemic area. *Molecular and Biochemical Parasitology* **33**, 229–236.
- SCIUTTO, E., FRAGOSO, G., TRUEBA, L., LENIUS, D., MONTOYA, R. M., DIAZ, M. L., GOVEZENSKY, T., LOMELI, C., TAPIA, G. & LARRALDE, C. (1990). Cysticercosis vaccine: cross protecting immunity with *Taenia solium* antigens against experimental murine *Taenia crassiceps* cysticercosis. *Parasite Immunology* **12**, 687–689.
- SELKIRK, M. E., DENHAM, D. A., PARTONO, F. & MAIZELS, R. (1989). Heat shock cognate 70 is a prominent immunogen in brugian filariasis. *Journal of Immunology* **143**, 299–308.
- THIERINGER, H. A., JONES, P. G. & INOUE, M. (1998). Cold shock and adaptation. *Bioessays* **20**, 49–57.
- TIELENS, A. G. M., VAN DEN HEUVEL, J. M. & VAN EDEN, W. (1993). *Schistosoma mansoni*: An hsp60 homologue is constitutively expressed in cercariae, adults, and sporocysts. *Experimental Parasitology* **77**, 495–497.
- TOWBIN, H., STAHELIN, T. & GORDON, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **76**, 4350–4354.
- TSANG, V., BRAND, J. & BOYER, A. (1989). An enzyme-linked immunoelectrotransfer blot and glycoprotein antigens for diagnosing human cysticercosis (*Taenia solium*). *Journal of Infectious Diseases* **159**, 50–59.
- WELCH, W. J., KANG, H. S., BECKMAN, R. P. & MIZZEN, L. A. (1991). Response of mammalian cells to metabolic stress; changes in cell physiology and structure/function of stress proteins. In *Heat Shock Proteins and Immune Response* (ed. Kaufmann, S. H. E.), pp. 31–55. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg.
- ZEILSTRA-RYALLS, J., FAYET, O. & GEORGOPOULOS, C. (1991). The universally conserved GroE (Hsp60) chaperonins. *Annual Review of Microbiology* **45**, 301–325.

APÉNDICE A3

ANTECEDENTES

El Tegumento

La interfase hospedero-parásito es la región de contacto físico y químico entre ambos organismos. En el caso de *T. solium* la estructura parasitaria que interactúa directamente con el hospedero es el tegumento (Fig 1) (Willms et al. 1982). La superficie tegumentaria posee una carga electronegativa, que se mantiene a través del recambio continuo de los componentes del glicocálix (Lumsden 1972). Se ha propuesto que este recambio podría ser un mecanismo de protección para evadir el ataque enzimático e inmunológico del hospedero (Read et al. 1963; Oaks y Lumsden 1971; Trimble y Lumsden 1975; Ramírez Bon et al. 1982). También se ha propuesto que algunos componentes del glicocálix, especialmente las proteínas, están involucradas en funciones importantes tanto para el parásito como para la relación que establece con su hospedero (Pappas y Read 1975; Hustead y Williams 1977; Hammerber et al. 1980; Arme 1988; White et al. 1992).

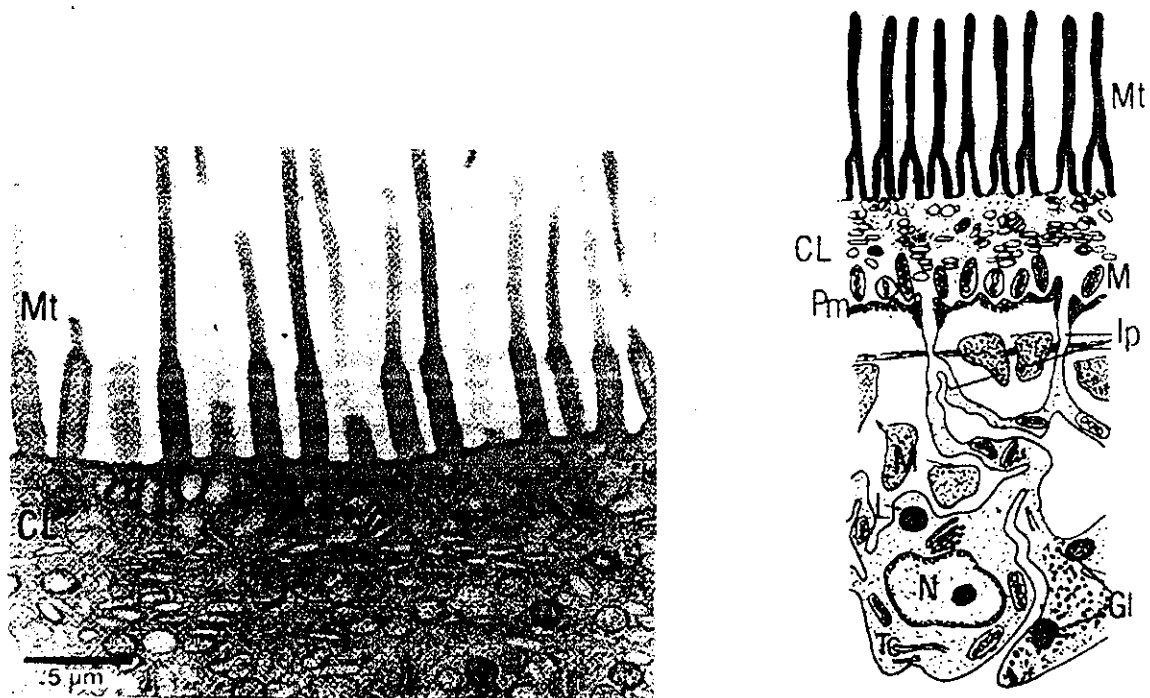


Fig 1. A. Micrografía del tegumento de *T. solium*. Tomado de Ramírez-Bon et al. 1982. B. Esquema del tegumento. Abreviaturas: Mt, microtricas; CL, (citoplasma sincicial); Pm, Membrana plasmática; M, mitocondrias; Ip, procesos citoplasmáticos; L, lípidos; N, núcleo; Tc, citón tegumental; Gl, glucógeno.

El tegumento es una región metabólicamente activa a través de la cual se transportan las secreciones, se absorben los nutrientes y se elimina el material de desecho (Lumsden 1975; Pappas y Read 1975). Es un citoplasma sincicial y continuo, cuya membrana externa se encuentra aumentada por proyecciones digitiformes o microtricas, recubiertas por un abundante glicocálix (Smyth 1969; Smyth 1994). El citoplasma del tegumento contiene mitocondrias y numerosas vesículas. La membrana plasmática que recubre la superficie interna del tegumento se encuentra interrumpida por procesos citoplasmáticos que comunican al tegumento con cuerpos celulares nucleados llamados citones tegumentales. Estos citones contienen numerosas vesículas, retículo endoplásmico bien desarrollado, aparato de Golgi, ribosomas y abundantes mitocondrias (Ramírez-Bon et al. 1982). Por debajo de la membrana basal se observan varias capas de tejido muscular liso y abundantes depósitos de glucógeno y grasa. Hay fibras nerviosas que se distribuyen entre los fascículos musculares y células de tipo nervioso, que se localizan muy cerca del área del roseto del escólex. Estas células aparentemente contienen vesículas neurosecretoras, algunas de las cuales originan una reacción de colinesterasa, la cual sugiere que constituyen ordenamientos sinápticos (Cárdenas-Ramírez et al. 1982).

Los corpúsculos calcáreos, la regulación del calcio y la calcificación de los cisticercos

El sistema protonefridial se encuentra a mayor distancia de la superficie y está constituido por una red de conductos que terminan en las células flama (Fig 2). Las células flama tienen forma de copa, con un núcleo ovoide basal y una porción apical formada por un conjunto de cilios (Ramírez-Bon et al 1982; Cárdenas-Ramírez et al 1982). La función del protonefridio aún no ha sido definida de manera precisa, aunque en general se acepta su papel en la eliminación de los productos metabólicos de desecho (Wilson y Webster 1974). La presencia de proyecciones citoplasmáticas a lo largo de la superficie luminal (microvellosidades) sugiere un mecanismo para aumentar la superficie, lo cual es típico de los epitelios absortivos, y la abundancia relativa de actividad de fosfatasa en los ductos protonefridiales, apoya la idea de que también participa en la reabsorción de electrolitos y componentes orgánicos (Lumsden y Hildreth 1982). En el caso de *Himenolepis diminuta* la absorción de glucosa, lactato y urea en los canales ha sido demostrada (Webster 1972).

En *T. solium*, como muchos otros organismos, se acumulan grandes cantidades de sustancias inorgánicas en concreciones minerales redondas u ovaladas, que en los céstodos reciben el nombre de corpúsculos calcáreos.

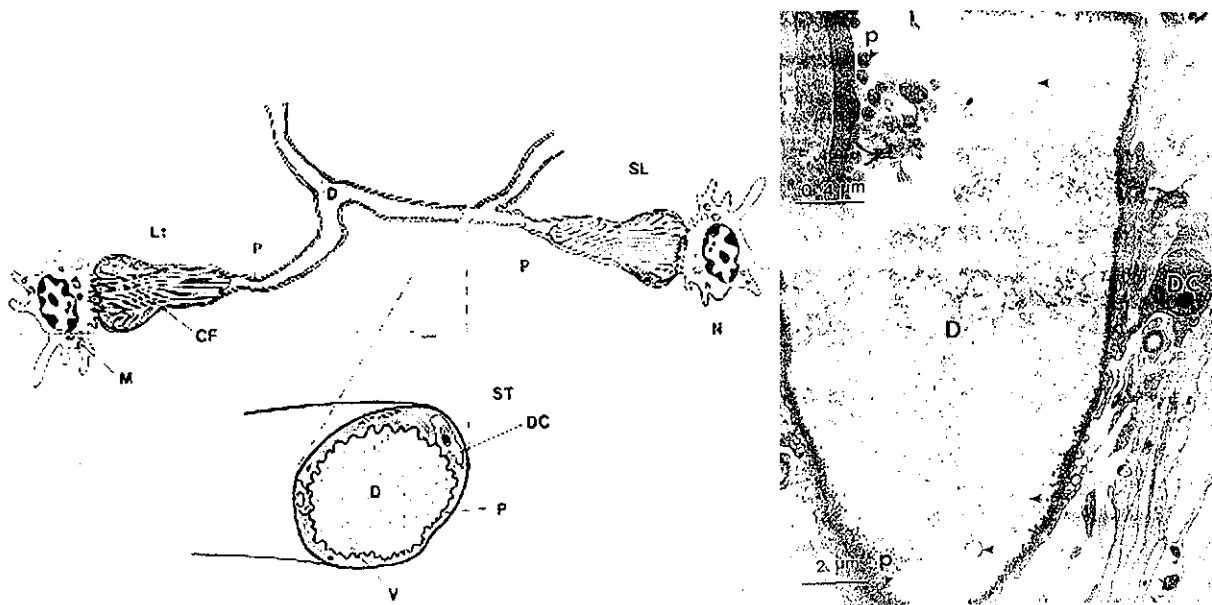


Fig 2. A. Esquema de los ductos protonefridiales: sección longitudinal (SL), sección transversal (ST). B. Micrografía de un ducto de *T. solium*. Tomado de Vargas-Parada et al. 1999. Abreviaturas: D, ducto protonefridial; DC, célula del ducto; P, proyecciones de la superficie; CF, célula flama; M, mitocondria; Lt, leptotricas; N, núcleo.

Existen diversas hipótesis para explicar el origen, la formación y la estructura de los corpúsculos calcáreos en los céstodos. A continuación se presenta un artículo de revisión (Vargas-Parada y Laclette 1999) que permite revisar la información disponible sobre estas estructuras.

Durante la infección, algunos cisticercos sufren una calcificación gradual que culmina cuando todos los tejidos larvarios son substituidos por sales minerales. Aunque se desconocen los factores involucrados en la regulación de la calcificación, se ha propuesto que los corpúsculos calcáreos podrían tener un papel importante como sitios de depósito del calcio excedente, protegiendo a la larva de la calcificación (Desser 1963). Algunos estudios en el laboratorio mostraron que cuando la concentración de iones en el medio de cultivo en el que se mantienen a los cisticercos cambia, se favorece la calcificación de la larva (JP Laclette, comunicación personal). La comprensión de los mecanismos involucrados en el proceso de calcificación podría permitir plantear nuevas estrategias para el tratamiento de la enfermedad en seres humanos y animales domésticos.

Como el proceso de formación de corpúsculos calcáreos en cisticercos de *T. solium* era desconocido, se decidió estudiar este fenómeno en el laboratorio. A diferencia de otros céstodos,

en *T. solium* los corpúsculos no son de origen celular, sino que se forman extracelularmente en el lumen de los ductos protonefridiales, de manera similar a los tremátodos (Martin et al. 1964).

La localización de los corpúsculos calcáreos en los ductos protonefridiales sugiere una posible función detoxificadora, eliminando desechos tóxicos en estas estructuras (Vargas-Parada et al. 1999). Una vez dilucidado el proceso de formación de los corpúsculos en *T. solium*, queda por comprender la regulación de la formación de estas concreciones minerales y su papel en la calcificación de los cisticercos. Por lo pronto, se han detectado proteínas que unen calcio en *Fasciola hepatica* (Ruiz de Eguino et al. 1999), *Schistosoma mansoni* (Rao et al. 2002, Scott y Macmanus 1999, Hooker y Brindley 1999) y en *Echinococcus granulosus*, esta última asociada a los corpúsculos calcáreos (Rodrigues et al 1997). Queda la interrogante de si el proceso de calcificación y de formación de corpúsculos calcáreos está relacionado con la respuesta a estrés del parásito, ya que la concentración de sales no solo ha sido identificada como una señal de estrés osmótico (Blum 1996; de Macario y Macario 2000; Hohmann 2002), sino también que la respuesta a dicho estrés permite en algunos organismos desarrollar una tolerancia a la sal (Beck et al. 2000; Sakamoto y Murata 2002; Sleator 2002). Como se mencionó previamente en el caso de *T. solium*, cambios en la concentración de fosfatos y calcio parecen ser determinantes en el proceso de calcificación y la formación de corpúsculos calcáreos podría ser la respuesta del parásito para contender con el estrés osmótico.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Role of the Calcareous Corpuscles in Cestode Physiology: A Review

LAURA VARGAS-PARADA AND JUAN PEDRO LACLETTE*

Departamento de Inmunología Instituto de Investigaciones Biomédicas, A.P. 70228, Cd. Universitaria
04510 México D.F.

*Corresponding author: Phone (52) 562-23860. Fax (52) 562-23369. E mail laclette@servidor.unam.mx

ABSTRACT. Cysticercosis is a parasitic disease caused by the larval stage or cysticercus of the cestode tapeworm *Taenia solium*. Cysticerci are able to survive in the host tissues for long periods in the presence of an immune response. Tissues of cestodes contain mineral concretions termed calcareous corpuscles. These corpuscles might serve for the focal deposition of exceeding amounts of calcium protecting the larvae against calcification. Studies on the morphology and composition of calcareous corpuscles in cestodes have resulted in a number of hypotheses on their origin and function. Calcareous corpuscles are believed to form either intracellularly or extracellularly and the cell type involved, the place of formation and the mechanism of mineral deposition seem to be also diverse. This review intends to provide an updated guide to the published literature on calcareous corpuscles in cestodes, giving emphasis on their role in larval physiology. Understanding biomineralization might lead to novel ways for the treatment of diseases caused by cestode larvae.

KEY WORDS: Calcareous corpuscles, Calcification, Cestodes.

RESUMEN. La cisticercosis es una enfermedad parasitaria causada por la forma larvaria o cisticerco del céstodo *Taenia solium*. A pesar de la respuesta inmune del huésped, los cisticercos son capaces de sobrevivir en los tejidos por largos periodos. Los céstodos contienen estructuras minerales llamadas corpúsculos calcáreos. Estos corpúsculos podrían servir para concentrar las cantidades excedentes de calcio y otros minerales, protegiendo a la larva de la calcificación. Estudios sobre la morfología y composición de los corpúsculos calcáreos de los céstodos ha llevado a la formulación de una serie de hipótesis sobre su origen y su función. Se cree que los corpúsculos calcáreos se forman de manera intracelular o extracelular, mientras que el tipo de célula involucrada, el lugar y mecanismos de formación parecen ser de origen diverso. Esta revisión pretende proveer de una guía comprensiva a la literatura publicada sobre corpúsculos calcáreos en céstodos, dando énfasis al papel de estas estructuras en la fisiología de la larva. Comprender los procesos de biomineralización en este parásito podría permitir encontrar nuevas maneras de tratar la enfermedad causada por la larva de este céstodo.

PALABRAS CLAVE: Corpúsculos calcáreos, Calcificación, Céstodos.

INTRODUCTION

Within the phylum Platyhelminthes, cestodes are one of the major groups of parasites that cause disease in humans. Human infections by adult worms usually generate moderate pathology although some problems of gut-wall damage and anaemia may occur. In contrast, two types of human larval cestodiosis can result in a severe disease: cysticercosis caused by the cysticercus of *Taenia solium*, and hydatid disease resulting from the proliferation of the hydatid cyst of *Echinococcus granulosus*.

Among parasitic platyhelminths, mineral concretions have been described both in trematodes^{1,10,11,23} and cestodes.^{3,4,6,7,20,40,44} Two different processes of biomineralization can be distinguished: the first is characterized by bulk extracellular or intracellular mineral

formation, without involvement of organic matrices, and is widely observed in bacteria and algae.²¹ The second is organic matrix-mediated and involves an organic framework onto which the ions are actively incorporated and induced to crystallize in structures of varying degrees of complexity.^{21,33,34} Mineral concretions in cestodes are known generically as calcareous corpuscles and belong to the organic matrix-mediated type (Fig. 1).

Calcareous corpuscles structure and composition. The earlier reports on calcareous corpuscles in tapeworms can be traced back to the 18th century,^{13,28} although the initial studies on their structure and composition started in the decade of the 30's,^{8,31,39,41,43} and the first clues regarding the composition of calcareous corpuscles were provided until the end of the 50's, when by means of X-ray diffraction studies the corpuscular material from *Taenia saginata*

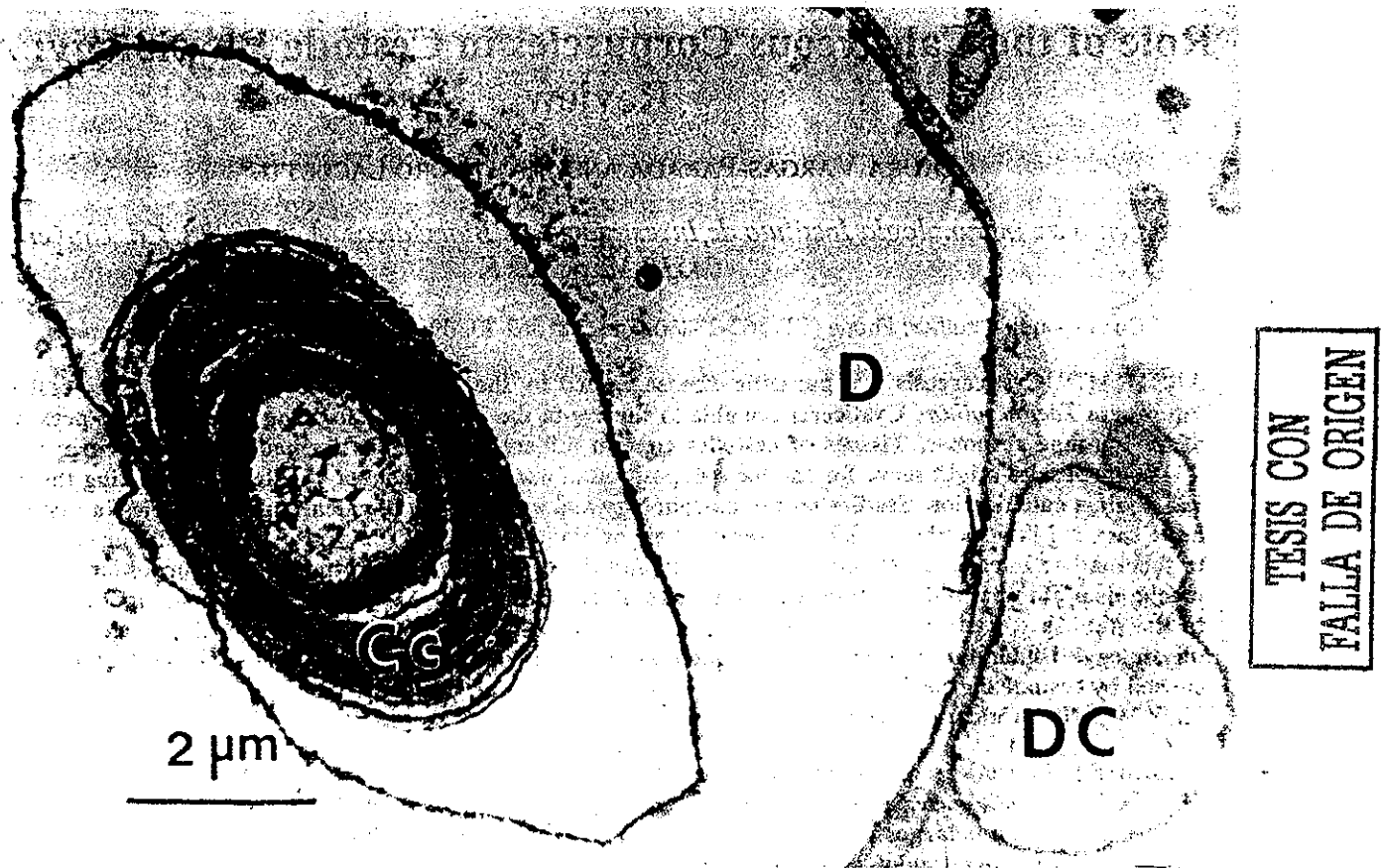


Figure 1. *Taenia solium* mature calcareous corpuscle showing the typical pattern of granular concentric layers (Cc Calcareous corpuscle, D protonephridial duct, DC duct cell). Courtesy of Springer-Verlag.

was analyzed.^{9,44} In the following years, several species of taeniids were studied and found to contain calcium, magnesium, phosphate and carbon dioxide.^{16,17,32,36,48,49} In *Mesocestoides corti* silicon and zinc have also been reported to form part of the calcareous corpuscles.^{2,12,18}

The organic matrix is organized in concentric rings and a double outer envelope; it contains proteins, lipids, polysaccharides, mucopolysaccharides, RNA, and DNA.^{3,37,38} The organic matrix provides the structural framework or substrate for deposition of minerals.^{26,47}

There is much variation in size of calcareous corpuscles in different species but they usually range from 7 up to 34 μm in diameter.^{8,12,17,22,24} The calcareous corpuscles of *T. solium* cysticerci are smaller in size, varying between 1.5 to 6 μm in diameter.⁴² Calcareous corpuscles can be irregularly spherical or ovoid, and variations have been described both in the same and between different species.^{22,51} The bodies always contain minor amounts of other inorganic elements, and these, as well as the amount of phosphate are affected by the diet of the host and may constitute as much as 41% of the dry weight of the organism.^{22,31} The number and chemical composition of calcareous corpuscles can also vary between species as well as

within the same species^{26,32,48,49,50,51} and the latter appears to be related to the composition of the environment.^{2,18,19} Calcareous corpuscles have been reported in vast numbers in both juvenile and adult stages of cestodes.²⁶

Calcareous corpuscles formation. The formation of calcareous corpuscles in cestodes has been studied almost exclusively in cyclophyllidean species. Available information suggests that they may be formed through diverse processes. Earlier reports described the formation of corpuscles in intracellular compartments of several cell types. It has been described that calcareous corpuscles are formed in the nuclei of parenchymal or mesenchymal cells in *Thysanotria ovilla*,²⁰ *Hymenolepis microstoma*,⁵ *Echinococcus granulosus* and *Taenia hydatigena*.²⁹ The nucleus enlarges by continuous accretion of minerals, whereas the cytoplasm degenerates concomitantly producing the mature corpuscle. Formation of calcareous corpuscles can also occur in the cytoplasm of the corpuscle forming cells, as described in *H. microstoma*,⁵ *E. granulosus*, and *T. hydatigena*.²⁹ In the case of *T. saginata*, the calcareous corpuscle appears to form by mineral deposition around the plasma membrane of a mesenchymal cell that is supposed to be specially avid for calcium.³ In *Taenia taeniaeformis*, the

calcareous corpuscles are also formed in the cytoplasm and the organic core is provided by the remnants of the cytoplasm itself or by the Golgi membranes. This corpuscle forming cell appears to expend itself in the production of one corpuscle.²⁶ In the tetraphyllidean *Trilocularia acanthiaevulgaris* the formation of intracellular corpuscles in certain parenchymal and mesenchymal cells, occurs concomitantly to the autophagic degradation of the cytoplasm,²⁵ while in *Schistocephalus pungitii*,⁴⁰ a large intracellular cavity is formed by coalescence of cytoplasmic vacuoles. Formation of calcareous corpuscles has been reported on the brood capsule and on the germinal layer in metacestodes of *Echinococcus multilocularis*.²⁷ The osmoregulatory system also known as protonephridium has also been involved in the formation of calcareous corpuscles in *H. microstoma* where the early stages are found in the cytoplasm of "vesiculated cells" that are connected to, or that are merely dilations of capillaries of the flame cells on their way to the nephridial ducts.⁵ Transmission electron microscopic studies have shown that the calcareous corpuscles are surrounded by a double layer envelope; the outer and less dense layer consisting probably of the compressed remnants of the corpuscle-forming cell whereas the inner and denser layer may come from the membranes involved in the corpuscle development.⁴⁷

While the formation of calcareous corpuscles has been reported as an intracellular process in taeniid cestodes, their formation in cysticerci of *T. solium* appears to be extracellular, occurring in the lumen of protonephridial ducts where the spherical microprojections of the duct wall, not mitochondria, appear to provide the organic support for the deposition of inorganic material.⁴² This mechanism appears to be related to that proposed for *H. microstoma*, where corpuscle formation occurs inside capillary dilations that are connected with the osmoregulatory ducts.⁵

Two types of morphologically different calcareous corpuscles have been described in *E. granulosus*, *T. hidatigena* and *T. solium*.^{29,42} Both types show the typical pattern described for tetraphyllidean²⁵ and cyclophyllidean species.^{26,32,47}

Calcareous corpuscles function. The role of the calcareous corpuscles in the physiology of tapeworms has been the subject of much speculation. For example, it has been proposed that corpuscles may also act as reservoirs of carbonate that protect the tissues of the worm against organic acids from intermediate metabolism or during its passage through the stomach of the definitive host.^{25,26,35} Support for this idea comes from the observation that a significant decrease in the number of corpuscles is observed when *H. diminuta* cysts are exposed to an acid excretion medium.¹⁵ The calcareous corpuscles might also serve as reservoirs of phosphate; experiments on *T. taeniaeformis* show that phosphate enters the body of the larvae by passive diffusion and that phosphate salts can be deposited or released according to the environmental condi-

tions.⁴⁵ The observation that the amount of phosphate in the corpuscle is altered by changes in the nutritional state of the host seems to support this proposal.⁵¹ Formation of calcareous corpuscles in the protonephridial ducts in *T. solium*, also suggests that they relate with roles ascribed to the protonephridia such as regulation of the tissue fluids and elimination of metabolic wastes.^{52,53} This idea is supported by the observation that *M. corti* has the ability to concentrate several distinct cations into the calcareous corpuscles, when these are introduced into the host drinking water.^{18,19} Furthermore, scanning electron microscope studies on *M. corti*, show that corpuscles are emitted through the tegument. This emission could serve to remove metabolic wastes, therefore suggesting that the calcareous corpuscles may represent excretory dumps.¹²

In contrast to the cestode adult worm, the larval, juvenile stages or metacestodes contain large numbers of corpuscles.^{24,37} The focal deposition of exceeding amounts of calcium in the corpuscles could protect the larval stage against calcification.^{7,44} Radiolabelled calcium can be demonstrated in the corpuscles of *T. taeniaeformis* six months after a single dose of ⁴⁵Ca⁺⁺ was administered to the host, suggesting that little calcium is removed after being deposited in the corpuscle.⁴⁶ However, it is not clear if the dissolution of some or all corpuscles, observed during development of *H. microstoma* might also serve to meet its requirements for calcium in soluble form.⁵ Recently, the coding cDNA sequence of an intracellular protein of *E. granulosus* showing calcium-binding motifs has been isolated and the recombinant fusion protein (EgCaBP1-GST), expressed in bacteria, has been shown to bind calcium *in vitro*. This protein is strongly associated with the calcareous corpuscles³⁰ and opens new possibilities for the study of calcium deposition in larval cestodes.

In the human being, cysticerci can develop in a number of sites including the central nervous system.¹⁴ One possible outcome for the infection is the gradual calcification of the parasite until complete substitution of the larval tissues by mineral salts. The driving factors for the calcification of the cysts are still poorly understood. Calcification appears to be mainly controlled by the host after the parasite loses its ability to maintain calcium levels within physiological limits. Understanding the mechanism involved in the process of calcification may lead to novel strategies for the treatment of the disease in humans and in domestic animals.

ACKNOWLEDGMENTS

This paper was partially supported by grants No. IN 207195 from DGAPA-UNAM and No. L0042M from CONACYT. L Vargas-Parada was supported by a fellowship from DGAPA-UNAM and CONACYT.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



REFERENCES

1. Awad, A. H. and A. J. Probert. 1990. Scanning and transmission electron microscopy of the female reproductive system of *Schistosoma margrebowiei* Le Roux 1933. *J. Helminthol.* 64:181-192.
2. Baldwin, J. L., A. K. Berntzen and B.W. Brown. 1978. *Mesocestoides corti*: Cation concentration in calcareous corpuscles of tetrathyridia grown in vitro. *Exp. Parasitol.* 44:190-196.
3. Chowdhury, A. B., B. Dasgupta and H. N. Ray. 1962. On the nature and structure of the calcareous corpuscles in *Taenia saginata*. *Parasitol.* 52:153-157.
4. Chowdhury, N. and A. I. Singh. 1978. Role of calcareous corpuscles in the organization of egg-pouches in *Raillietina* spp. *Z. Parasitenkd.* 56:309-312.
5. Chowdhury, N. and P. H. De Rycke. 1977. Structure, formation and functions of calcareous corpuscles in *Hymenolepis microstoma*. *Z. Parasitenk.* 53:159-169.
6. Chowdhury, N., and P. H. De Rycke. 1974. A new approach for studies on calcareous corpuscles in *Hymenolepis microstoma*. *Z. Parasitenkd.* 43:99-103.
7. Desser, S. S. 1963. Calcium accumulation in larval *Echinococcus multilocularis*. *Can. J. Zool.* 41:1055-1059.
8. Diamare, V. 1930. Note d'istofisiologia sui cestodi II. Sui corpuscoli calcarei dei cestodi. *Rinascenza Medica* 7:315-316.
9. Epprecht, W., H. R. Schinz and H. Vogel. 1950. Röntgenographische feinstrukturelle Untersuchung von parasitären Verkalkungen. *Experientia.* 6:187.
10. Erasmus, D. A. 1967. Ultrastructural observation on the reserve bladder system of *Cyathocotyle bushiensis* Khan, 1962 (trematoda Strigeoidea) with special reference to lipid excretion. *J. Parasitol.* 53:525-536.
11. Erasmus, D. A. 1982. A comparative study of the viteline cell in *Schistosoma mansoni*, *S. haematobium*, *S. japonicum* and *S. mattheei*. *Parasitol.* 84:283-287.
12. Etes, F. J. and V. Marinakis. 1991. Formation and excretion of calcareous bodies by the metacestode (tetrathyridium) of *Mesocestoides vogae*. *J. Parasitol.* 77:595-602.
13. Goeze, T. 1782. Versuch einer Naturgeschichte der Eingeweidewürmer thierischer Körper. Blankenburg.
14. Grav, E., F. Garrido and L. Cañedo. 1982. Calcification of the cysticerci of *Taenia solium* in the human brain, p. 499-515. In Flisser A., K. Willms, J.P. Laclette, C. Larralde, C. Ridaura and F. Beltrán (ed.) *Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives.* Academic Press, New York.
15. Hamilton, G. I. V. and I. Fairweather. 1986. Occurrence, structure and possible function of the numerous calcareous corpuscles found in both larval and adult *Hymenolepis diminuta*. *Parasitol.* 93:410.
16. Hamilton, G. I. V., M. Harriott, D. T. Burns and I. Fairweather. 1987. *Hymenolepis diminuta*: chemical analysis of calcareous corpuscles. *Proc. Br. Soc. Parasitol., Springs Meeting held at the University of Edinburgh, March*, p.44.
17. Ishii, A. I., K. Morimoto and M. Sano. 1981. Observations on calcareous corpuscles using a scanning electron microscope. *Experientia* 37:259-260.
18. Kegley, L. M., B. W. Brown and A. K. Berntzen. 1969. *Mesocestoides corti*: Inorganic components in calcareous corpuscles. *Exp. Parasitol.* 25:85-92.
19. Kegley, L. M., J. Baldwin, B. W. Brown and A. K. Berntzen. 1970. *Mesocestoides corti*: Environmental cation concentration in calcareous corpuscles. *Exp. Parasitol.* 27:88-94.
20. Logachev, E. D. 1951. Concerning the structure and development of calcareous corpuscles in tapeworms (in Russian). *Dok. Akad. Nauk. SSSR.* 80:693-696.
21. Lowenstam, H. A. 1981. Minerals formed by organisms. *Science* 211:1126-1130.
22. Lumsden, R. D. and M. B. Hildreth. 1983. The fine structure of adult tapeworms, p.177-233. In: C. ARME and P.W. PAPPAS (ed.) *Biology of Eucestoda.* Vol. 1, Academic Press, New York.
23. Martin, W. E. and R. F. Bils. 1964. Trematode excretory concretions: formation and fine structure. *J. Parasitol.* 50:337-344.
24. McCullough, J. S. and I. Fairweather. 1984. A comparative study of *Trilocularia acanthiaevulgaris* Olsson 1867 (Cestoda, Tetraphyllidea) from the stomach and spiral valve of the spiny dogfish. *Z. Parasitenkd.* 70:797-807.
25. McCullough, J. S. and I. Fairweather. 1987. The structure, composition, formation and possible functions of calcareous corpuscles in *Trilocularia acanthiaevulgaris* Olsson 1867 (Cestoda, Tetraphyllidea). *Parasitol. Res.* 74:175-182.
26. Nieland, M. L. and T. von Brand. 1969. Electron microscopy of cestode calcareous corpuscle formation. *Exp. Parasitol.* 24:279-289.
27. Ohnishi, K. and H. Kutsumi. 1991. Possible formation of calcareous corpuscles by the brood capsule in secondary hepatic metacestodes of *Echinococcus multilocularis*. *Parasitol. Res.* 77:600-601.
28. Pallas, G. 1767. Beschreibung der hauptsächlich im unterleibe wiederkäufer Thiere anzutreffenden Hydatiden oder Wasserblasen, welche von einer Art von Bandwurm ihren Ursprung haben. Stralsund.
29. Pawlowski, I. D., K. W. Yap and R. C. A. Thompson. 1988. Observations on the possible origin, formation and structure of calcareous corpuscles in taeniid cestodes. *Parasitol. Res.* 74:293-296.
30. Rodrigues, J. J. S., H. B. Ferreira, S. E. Farias and A. Zaha. 1997. A protein with a novel calcium-binding domain associated with calcareous corpuscles in *Echinococcus granulosus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 237:451-456.
31. Schopfer, W. H. 1932. Recherches physicochimiques



- sur le milieu interieur de quelques parasites. Rev. Suisse Zool. 39:59-194.
32. Scott, D. B., M. U. Nylén, T. von Brand and M. H. Pugh. 1962. The mineralogical composition of the calcareous corpuscles of *Taenia taeniaeformis*. Exp. Parasitol. 12:445-458.
 33. Simkiss, K. 1976. Intracellular and extracellular routes in biomineralization. Symp. Soc. Exp. Biol. 30:423-444.
 34. Simkiss, K. 1981. Cellular discrimination processes in metal accumulating cells. J. Exp. Biol. 94:317-327.
 35. Slais, J. 1973. Functional morphology of cestode larvae, p.396-466. In: B. DAWNES (ed.). Advances in Parasitology. Academic Press, New York.
 36. Smith S. A. and K. S. Richards. 1993. Ultrastructure and microanalyses of the calcareous corpuscles of the protoscolecocytes of *Echinococcus granulosus*. Parasitol. Res. 79:245-250.
 37. Smyth, J. D. 1969. The physiology of cestodes. WH Freeman and Company, San Francisco, California.
 38. Smyth, J. D. and D. P. McManus. 1989. The physiology and biochemistry of cestodes. Cambridge University Press, Cambridge.
 39. Starcoff, O. 1939. Morphologia e significato dei cosiddetti corpuscoli calcarei nei cestodi. Riv. Parassit. 3:144-152.
 40. Timofeyev, V. A. 1964. Electron microscope studies on the calcareous corpuscles of the plerocercoid and the sexually mature form of *Schistocephalus pungitii* (in Russian). Dok. Akad. Nauk. SSSR. 156:1244-1247.
 41. Vanni, V. 1938. Sul comportamento del calcio nel parassitismo con speciale riguardo alla calcificazione e sperimentale nella elmintiasi. Riv. Parassit. 2:219-232.
 42. Vargas Parada, L., M. T. Merchant, K. Willms and J. P. Lacleste. 1999. Formation of calcareous corpuscles in the lumen of excretory canals of *Taenia solium* cysticerci. Parasitol. Res. 85:88-92.
 43. von Brand, T. 1933. Untersuchungen über den Stoffbestand einiger Cestoden und den Stoffwechsel von *Moniezia expansa*. Z. für vergleichende Physiol. 18:562-596.
 44. von Brand, T., T. I. Mercado, M. U. Nylén and D. B. Scott. 1960. Observations on function, composition, and structure of cestode calcareous corpuscles. Exp. Parasitol. 9:205-214.
 45. von Brand, T. and E. C. Weinbach. 1965. Incorporation of phosphate into the soft tissues and calcareous corpuscles of larval *Taenia taeniaeformis*. Comp. Biochem. Physiol. 14:11-20.
 46. von Brand, T. and E.C. Weinbach. 1975. Incorporation of calcium into the soft tissues and calcareous corpuscles of larval *Taenia taeniaeformis*. Z. Parasitenkd. 48:53-63.
 47. Von Brand, T. and M. U. Nylén. 1970. Organic matrix of cestode calcareous corpuscles. Exp. Parasitol. 28:566-576.
 48. von Brand, T., D. B. Scott, M. U. Nylén and M. H. Pugh. 1965. Variations in the mineralogical composition of cestode calcareous corpuscles. Exp. Parasitol. 16:382-391.
 49. von Brand, T., M. U. Nylén, D. B. Scott and G. N. Martin. 1965. Observations on calcareous corpuscles of larval *Echinococcus granulosus* of various geographic origins. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 120:383-385.
 50. von Brand, T., M. U. Nylén, G. N. Martin and F. K. Churchwell. 1967. Composition and crystallization patterns of calcareous corpuscles of cestodes grown in different classes of hosts. J. Parasitol. 53:683-687.
 51. von Brand, T., M. U. Nylén, G. N. Martin, F. K. Churchwell and E. Stites. 1969. Cestode calcareous corpuscles: Phosphate relationships, crystallization patterns and variations in size and shape. Exp. Parasitol. 25:291-310.
 52. Webster, L. A. and R. A. Wilson. 1970. The chemical composition of protonephridial canal fluid from the cestode *Hymenolepis diminuta*. Comp. Biochem. Physiol. 35:201-209.
 53. Wilson, R. A. and L. A. Webster. 1974. Protonephridia. Biol. Rev. 49:127-160.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ORIGINAL PAPER

Laura Vargas-Parada · Marie Therese Merchant
Kaethe Willms · Juan Pedro Laclette

Formation of calcareous corpuscles in the lumen of excretory canals of *Taenia solium* cysticerci

Received: 6 April 1998 / Accepted: 21 July 1998

Abstract Platyhelminths, like many other organisms, are capable of producing mineral concretions. In cestodes these are referred to as calcareous corpuscles. Studies on these concretions in different cestodes both in vivo and in vitro have resulted in a number of hypotheses on their origin, formation, and structure. Calcareous corpuscles are believed to be of cellular origin, although the kind of cell involved and the mechanisms of mineralization remain under discussion. In the present paper we show that formation of calcareous corpuscles in cysticerci of *Taenia solium* is not of intracellular origin, as described for other cestodes, but occurs extracellularly in the lumen of protonephridial ducts in a way similar to that proposed for trematodes. This finding enhances the function of the protonephridial ducts, at least in the larvae of *T. solium*, to the roles formerly ascribed to the calcareous corpuscles.

Introduction

Organisms form mineral concretions from a diverse array of salts, carbonate minerals being those most widely used. Two different processes of biomineralization can be distinguished. The first is characterized by bulk extracellular or intracellular mineral formation, without involvement of organic matrices, and is widely observed

in bacteria and algae. The second is “organic matrix-mediated” and involves an organic framework onto which the ions are actively introduced and then induced to crystallize and grow in structures of varying degrees of complexity (Lowenstam 1981; Simkiss 1976).

Mineral concretions have been described in several invertebrate phyla, including protozoans, platyhelminths, mollusks, and arthropods (Lowenstam 1981). Within platyhelminths, mineral concretions of trematodes have been proposed to form extracellularly in the lumen of the excretory canals (Martin and Bills 1964; Erasmus 1967), whereas in cestodes they are reported to be intracellular (Logachev 1951; Chowdhury et al. 1962; Timofeyev 1964; Nieland and von Brand 1969). Mineral concretions in cestodes are known generically as calcareous corpuscles and belong to the organic matrix-mediated type. The organic matrix contains proteins, lipids, glycogen-like polysaccharides, and mucopolysaccharides, whereas the inorganic component consists mainly of calcium, magnesium, phosphate, and carbonate, usually organized in concentric rings. The calcareous corpuscles range in size from 7 up to 34 μm and may constitute as much as 41% of the dry weight of the organism (von Brand et al. 1969; Lumsden and Hildreth 1987). The number, size, shape, and chemical composition of calcareous corpuscles vary between different cestode species as well as within the same species (von Brand et al. 1965, 1967, 1969) and appear to be related to the composition of the environment (Kegley et al. 1970; Baldwin et al. 1978).

During routine electron-microscopy observations of *Taenia solium* cysticerci sections we found calcareous corpuscles inside excretory canals. This observation is inconsistent with the intracellular place of formation for calcareous corpuscles reported in taeniid cestodes, i.e., in either mesenchymal (Chowdhury et al. 1962) or parenchymal cells (Etges and Marinakis 1991) or in germinal and brood capsule cells (Ohnishi and Kutsumi 1991). The only exception thus far reported is the hymenolepidid *Hymenolepis microstoma*, in which formation of

L. Varga-Parada · J.P. Laclette (✉)
Department of Immunology,
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM,
A.P. 70228,
04510 Mexico D.F., Mexico
E-mail: laclette@servidor.unam.mx,
Fax: (525)6223369

M.T. Merchant · K. Willms
Department of Microbiology and Parasitology,
Facultad de Medicina, UNAM, Mexico

calcareous corpuscles has been proposed to occur in three different ways, including one inside the capillary dilations connected with the osmoregulatory canals (Chowdhury and de Rycke 1977). Therefore, we reexamined the site of formation of calcareous corpuscles in cysticerci of *T. solium* and found it to occur in the lumen of protonephridial canals.

Materials and methods

For the collection and processing of *Taenia solium* cysticerci, cysticerci were dissected from skeletal muscle of naturally infected pigs. All larvae were washed three times in 0.01 M phosphate-buffered 0.15 M saline solution, pH 7.4 (PBS), fixed immediately in Karnovsky's fixative (Karnovsky 1965), and processed for electron microscopy as described elsewhere (Laclette et al. 1987). Ultrathin sections were collected on copper grids and double-stained with 5% uranyl acetate in double-distilled water and with 0.25% lead citrate in 0.1 N NaOH (Reynolds 1963). Sections were observed and photographed in a JEOL 100X transmission electron microscope and an SEM-1200 EXII. Calibration of the microscope for measurements was done using a carbon grating replica (Ted Pella, Inc., Tustin, Calif.).

Results

Reconstruction of events in the formation of calcareous corpuscles was carried out on a large number of observations of sections from the bladder wall of the invaginated structures associated with the scolex of *Taenia solium* cysticerci. No calcareous corpuscle was found in the bladder wall, whereas in the parenchymal tissues surrounding the spiral canal the corpuscles were always observed within protonephridial ducts.

Initially, a flocculent material and some isolated vacuoles appear to accumulate in the lumen of an excretory duct. At this stage the duct cell shows a normal structure with a central nucleus and visible chromatin (Fig. 1). The characteristic spherical folds or microvillous projections on the luminal membrane allow identification of the ducts. Also, early crystal formations associate with these projections on the duct wall (Fig. 1, inset). No structure related to early stages of the calcareous corpuscles was seen in the cytoplasm of the duct cells or any other cell type.

Images of early stages in the formation of the calcareous corpuscles are difficult to organize in sequence. Figure 2 shows three views of these stages in which the flocculent material seems to coalesce progressively and a boundary eventually appears close to the surface of the duct wall. Deposition in layers could explain the absence of the flocculent material in the center of the luminal space of canals (Fig. 2). Loose ends of the forming lamella that appear to fold toward the center might contribute to the formation of the corpuscle core (Fig. 2B). Higher magnification of the deposited material shows a complex array of vesicular and lamellar structures, suggesting that concentric rings simply result from their fusion (Fig. 2C).



Fig. 1 Flocculent material and vacuoles have accumulated in the lumen of an excretory duct. Arrowheads show the vacuoles in the luminal space. Inset: Initial stages of crystal formation associated with the folds or microvillous projections on the duct wall (D Protonephridial duct, DC duct cell, P surface projections)

More advanced stages show increasing amounts of deposited material in layers; however, in some areas of the duct wall the spherical projections remain clearly identifiable (Fig. 3A). Closer views of the yet immature calcareous corpuscles show the spherical projections of the duct wall in contact with the outermost boundary of the calcareous corpuscles, suggesting that they, not mitochondria, provide part of the organic support for the deposition of inorganic material (Fig. 3B, inset). This view is supported by the observation that the projections seem to disappear in portions of the luminal surface of the duct wall (Fig. 3B). As the calcareous corpuscle matures, more concentric layers gradually form, with granular material being deposited more densely and uniformly among layers (Fig. 3B). The mature corpuscle forming in the interior of protonephridial ducts is composed of many concentric lamellae interspersed with areas of flocculent material (Fig. 3C). The calcareous corpuscles of *T. solium* cysticerci are irregularly spherical or ovoid, varying between 1.5 and 6 μm in diameter. Degenerative changes in the duct wall and duct-cell bodies appear to progress concomitantly with the maturation of the calcareous corpuscles; the cytoplasm of



Fig. 2A-C Electron micrographs of early stages in the formation of calcareous corpuscles in the lumen of protonephridial ducts of *Taenia solium* cysticerci. A, B The flocculent material appears to have been deposited in layers, and the amount of loose material in the center of the luminal space of canals is reduced. C The concentric membranous rings of the calcareous corpuscle result from the fusion of a complex array of vesicular and lamellar structures (D Protonephridial duct, DC duct cell, p surface projections)

the wall is finally reduced to a narrow band (Fig. 3C). The chromatin of duct cells gradually loses its characteristic appearance (compare the nuclei in Figs. 1, 3A, 3B, and 3C).

A second morphological type of calcareous corpuscle was also observed in the lumen of the protonephridial ducts (Fig. 4). This type shows few layers of contrasting density, with high-density layers being interspersed among layers of low-density material (Fig. 4, inset).

Discussion

The formation of calcareous corpuscles in cestodes has been studied almost exclusively in cyclophyllidean species. The information available suggests that calcareous

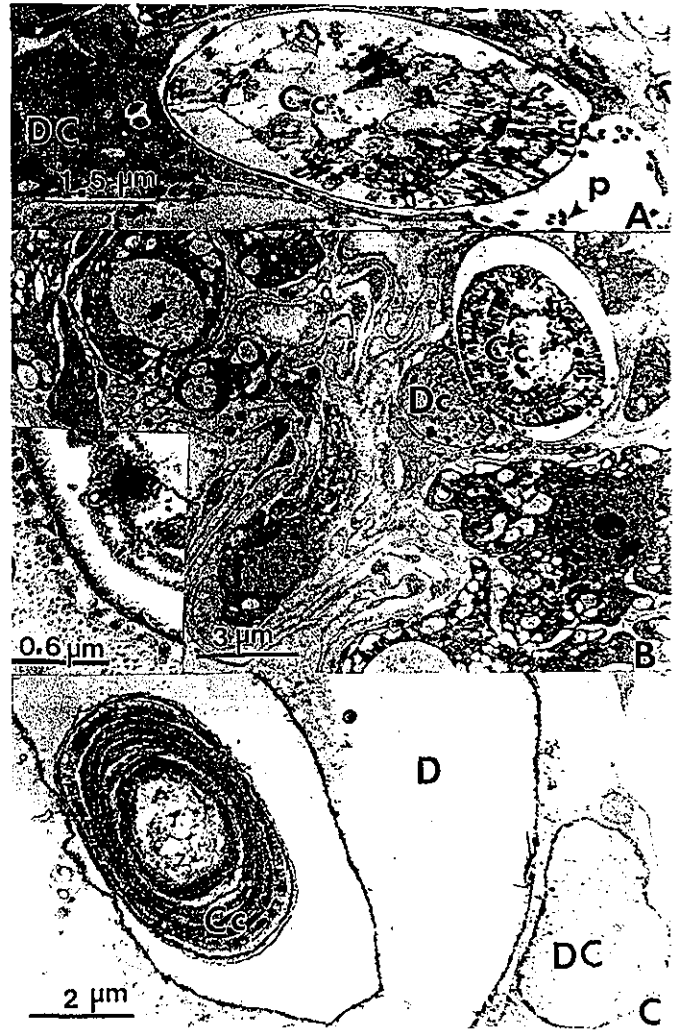


Fig. 3A-C Electron micrographs showing subsequent stages in the formation of calcareous corpuscles. A The number of membranous layers grows, producing a more compact corpuscle. B The flocculent material aggregates, forming a clear pattern of concentric rings. Inset: Higher magnification showing the spherical projections or microvilli in contact with the outermost boundary of an immature corpuscle. C Mature calcareous corpuscle showing the typical matrix of granular concentric layers (Cc Calcareous corpuscle, D protonephridial duct, DC duct cell, p surface projections)

corpuscles may have diverse origins. Previous reports have described the formation of corpuscles in intracellular compartments of several cell types. For example, it has been suggested that calcareous corpuscles are formed in the nuclei of parenchymal or mesenchymal cells in the anoplocephalid *Thysaniezia ovilla* (Logachev 1951), the hymenolepidid *Hymenolepis microstoma* (Chowdhury and de Rycke 1977), and the taeniids *Echinococcus granulosus* and *Taenia hydatigena* (Pawloski et al. 1988). The nucleus gradually enlarges by continuous accretion of minerals until it is completely filled, whereas the cytoplasm is simultaneously disintegrated to produce the final corpuscle. Formation of calcareous corpuscles can also be cytoplasmic as described in *H. microstoma* (Chowdhury and de Rycke 1977),

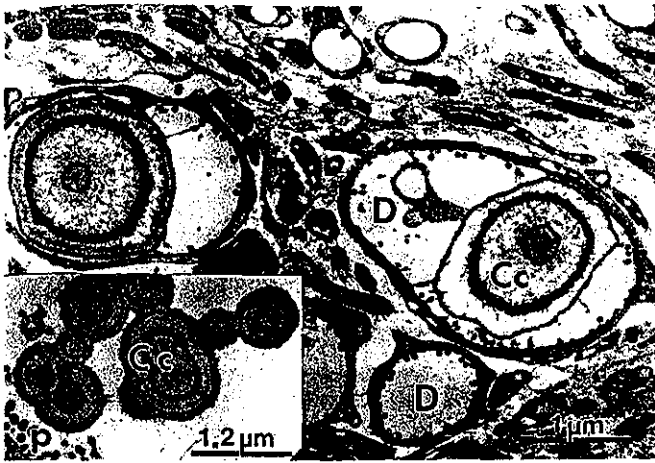


Fig. 4 Electron micrograph showing a second morphological type of calcareous corpuscle also forming in the lumen of protonephridial ducts (Cc calcareous corpuscle, D protonephridial duct, p surface projections)

E. granulosus, and *T. hydatigena* (Pawloski et al. 1988). In the case of *T. saginata*, a single calcareous corpuscle appears to be formed by mineral deposition around the plasma membrane of a parenchymal cell with "affinity" for calcium (Chowdhury et al. 1962). In *T. taeniaeformis*, calcareous corpuscles form in a cytoplasmic cavity, the organic core being provided by cytoplasm or Golgi membrane remnants. This calcareous corpuscle-forming cell appears to expend itself in the production of one corpuscle (Nieland and von Brand 1969). Autophagic degradation of the cytoplasm of certain parenchymal and mesenchymal cells results in the formation of intracellular corpuscles in the tetraphyllidean *T. acanthiaevulgaris* (McCullough and Fairweather 1987), whereas in the plerocercoid *Schistocephalus pungitii* (Timofeyev 1964) a large intracellular cavity is formed by the coalescence of cytoplasmic vacuoles. The osmoregulatory system has also been involved in the formation of calcareous corpuscles in *H. microstoma*, where early stages are found in "vesiculated cells" that are connected to, or are merely dilations of, the capillaries (Chowdhury and de Rycke 1977). It is clear that the formation of calcareous corpuscles is not a single process and seems to differ according to conditions and to the individual characteristics of each organism.

The formation of calcareous corpuscles in cysticercoi of *T. solium* appears to be different from that described for the above-mentioned species, although it is related to one of the mechanisms proposed for *H. microstoma* (Chowdhury and de Rycke 1977). There is no published description of calcareous corpuscles being formed extracellularly in cestodes. In this paper we show that calcareous corpuscles are formed in the lumen of the protonephridial ducts. Indeed, no developing or fully formed corpuscles was found in other cellular compartments in the cysticercoi of *T. solium*. Two morphological types of calcareous corpuscle were observed, suggesting that their formation might proceed through distinct mechanisms. Both types of calcareous corpuscle

show the typical pattern described for concretions of several tetraphyllidean (McCullough and Fairweather 1987) and cyclophyllidean species (Scott et al. 1962; Nieland and von Brand 1969; von Brand and Nylen 1970). Diversity in the morphology of the calcareous corpuscles has also been reported in *E. granulosus* and *T. hydatigena* (Pawloski et al. 1988).

Several functions have been ascribed to protonephridia, such as regulation of the composition of body fluids and elimination of metabolic wastes, among others (Wilson and Webster 1974). The chemical composition of the fluid inside the protonephridial ducts has been suggested to arise by filtration rather than secretion (Webster and Wilson 1970; Webster 1972a), although the presence of microvilli or folds in the luminal membrane of the tubules and canals suggest a mechanism to increase its surface, which is typical of absorptive epithelia. Indeed, resorption of glucose, lactate, and urea from the canals of *H. diminuta* has also been demonstrated (Webster 1972b).

Formation of calcareous corpuscles in the protonephridial ducts suggests that they might also be involved in the roles formerly ascribed to the corpuscles, e.g., osmoregulation (Mackiewicz and Ehrenpreis 1980), neutralization of metabolic acidic products (Slais 1973), reservoirs of inorganic material (von Brand and Weinbach, 1965; Smyth 1969), and protection against calcification (Desser 1963).

Acknowledgements This work was partially supported by grants IN 207195 from DGAPA-UNAM and L0042M from CONACYT. L. Vargas-Parada was supported by a fellowship from DGAPA-UNAM and CONACYT. We also thank P. de la Torre for her technical assistance.

References

- Baldwin JL, Berntzen AK, Brown BW (1978) *Mesocostoides corti*: cation concentration in calcareous corpuscles of tetrathyridia grown in vitro. *Exp Parasitol* 44: 190-196
- Brand T von, Nylen MU (1970) Organic matrix of cestode calcareous corpuscles. *Exp Parasitol* 28: 566-576
- Brand T von, Weinbach EC (1965) Incorporation of phosphate into the soft tissues and calcareous corpuscles of larval *Taenia taeniaeformis*. *Comp Biochem Physiol* 14: 11-20
- Brand T von, et al (1965) Variation in the mineralogical composition of cestode calcareous corpuscles. *Exp Parasitol* 16: 382-391
- Brand T von, Nylen MU, Martin GN, Churchwell FK (1967) Composition and crystallization patterns of calcareous corpuscles of cestodes grown in different classes of hosts. *J Parasitol* 53: 683-687
- Brand T von, Nylen MU, Martin GN, Churchwell FK, Stites E (1969) Cestode calcareous corpuscles: phosphate relationships, crystallization patterns and variations in size and shape. *Exp Parasitol* 25: 291-310
- Chowdhury AB, Dasgupta B, Ray HN (1962) On the nature and structure of the calcareous corpuscles in *Taenia saginata*. *Parasitology* 52: 153-157
- Chowdhury N, Rycke PH de (1977) Structure, formation and functions of calcareous corpuscles in *Hymenolepis microstoma*. *Z Parasitenkd* 53: 159-169
- Desser SS (1963) Calcium accumulation in larval *Echinococcus multilocularis*. *Can J Zool* 41: 1055-1059

- Erasmus DA (1967) Ultrastructural observation on the reserve bladder system of *Cyathocotyle bushiensis* Khan, 1962 (trematoda Strigeoidea) with special reference to lipid excretion. *J Parasitol* 53: 525-536
- Etges FJ, Marinakis V (1991) Formation and excretion of calcareous bodies by the metacestode (tetrathyridium) of *Mesocostoides vogae*. *J Parasitol* 77: 595-602
- Karnovsky MJ (1965) A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *J Cell Biol* 27: 137
- Kegley LM, Baldwin J, Brown BW, Berntzen AK (1970) *Mesocostoides corti*: environmental cation concentration in calcareous corpuscles. *Exp Parasitol* 27: 88-94
- Laclette JP, Merchant MT, Wilms K (1987) Histological and ultrastructural localization of antigen B in the metacestode of *Taenia solium*. *J Parasitol* 73: 121
- Logachev DE (1951) Concerning the structure and development of calcareous corpuscles in tapeworms. (in Russian) *Dok Akad Nauk SSSR* 80: 693-696
- Lowenstam HA (1981) Minerals formed by organisms. *Science* 211: 1126-1130
- Lumsden RD, Hildreth M (1987) The fine structure of adult tapeworms. In: Arme C, Pappas PW (eds) *Biology of Eucestoda*, vol. 1. Academic Press, New York, pp 177-277
- Mackiewicz JS, Ehrenpreis MB (1980) Calcareous corpuscles distribution in caryophyllid cestodes: possible evidence of cryptic segmentation. *Proc Helminthol Soc Wash* 47: 1-9
- Martin WE, Bills RF (1964) Trematode excretory concretions: formation and fine structure. *J Parasitol* 50: 337-344
- McCullough JS, Fairweather I (1987) The structure, composition, formation and possible functions of calcareous corpuscles in *Trilocularia acanthiaevulgaris* Olsson 1867 (Cestoda, Tetraphyllidea). *Parasitol Res* 74: 175-182
- Nieland ML, Brand T von (1969) Electron microscopy of cestode calcareous corpuscle formation. *Exp Parasitol* 24: 279-289
- Ohnishi K, Kutsumi H (1991) Possible formation of calcareous corpuscles by the brood capsule in secondary hepatic metacestodes of *Echinococcus multilocularis*. *Parasitol Res* 77: 600-601
- Pawloski ID, Yap KW, Thompson RCA (1988) Observations on the possible origin, formation and structure of calcareous corpuscles in taeniid cestodes. *Parasitol Res* 74: 293-296
- Reynolds ES (1963) The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol* 17: 208
- Scott DB, et al (1962) The mineralogical composition of calcareous corpuscles of *Taenia taeniaeformis*. *Exp Parasitol* 12: 445-458
- Simkiss K (1976) Intracellular and extracellular routes in biomineralization. *Symp Soc Exp Biol* 30: 423-444
- Slais J (1973) Functional morphology of cestode larvae. In: Dawnes B (ed) *Advances in parasitology*. Academic Press, New York, pp 396-466
- Smyth JD (1969) *The physiology of cestodes*. Freeman and Company, San Francisco
- Timofeyev VA (1964) Electron microscope studies of calcareous corpuscles of the proceroid and adult of *Schistocephalus pungitii*. *Dok Akad Nauk SSSR* 156: 1244-1247
- Webster LA (1972a) Succinic and lactic acids present in the protonephridial canal fluid from the cestode *Hymenolepis diminuta*. *J Parasitol* 58: 410-411
- Webster LA (1972b) Absorption of glucose, lactate and urea from the protonephridial canals of *Hymenolepis diminuta*. *Comp Biochem Physiol [A]* 41: 861-868
- Webster LA, Wilson RA (1970) The chemical composition of protonephridial canal fluid from the cestode *Hymenolepis diminuta*. *Comp Biochem Physiol* 35: 201-209
- Wilson RA, Webster L (1974) Protonephridia. *Biol Rev* 49: 127-160

31

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

APÉNDICE A4

Review

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

Edda Sciutto^{a*}, Gladis Fragoso^a, Agnes Fleury^{b,c}, Juan Pedro Laclette^a, Julio Sotelo^{a,b}, Aline Aluja^d, Laura Vargas^a,
Carlos Larralde^a

^aDepartamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM, AP70228, Mexico D.F. 04510, Mexico

^bInstituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, Mexico D.F., Insurgentes Sur 3877, Mexico D.F. 14269, Mexico

^cInstitut d'épidémiologie neurologique et de neurologie tropicale, Université de Limoges, 2, rue du Dr. Marcland, Limoges 87025, France

^dFacultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM, AP70228, Mexico D.F. 04510, Mexico

ABSTRACT – This article reviews current knowledge on human and porcine cysticercosis caused by *Taenia solium*. It highlights the conditions favorable for its prevalence and transmission, as well as current trends in research on its natural history, epidemiology, immunopathology, diagnosis, treatment and prevention. Our opinions on the most urgent needs for further research are also presented.

© 2000 Éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS

Taenia solium / cysticercosis-taeniasis / diagnosis / epidemiology / vaccination / pathogenesis

1. Introduction

Taenia solium is a parasite whose larva (cysticercus) may localize in the central nervous system of humans, causing neurocysticercosis (NCC) – prevalent in developing countries and re-emerging in affluent societies. NCC may adopt different forms: the clinically mild forms causing no or few and endurable symptoms, and the clinically severe forms causing a life-threatening, often fatal and frequently disabling form of disease. Cysticerci may also develop in other organs (eyes, skeletal muscle, heart, subcutaneous tissue) where they cause comparatively benign pathology (cysticercosis, CC). Cysticerci also develop in the skeletal muscle of the pig (the intermediary host) as a necessary step in their life cycle. In order to attain the adult tapeworm stage cysticerci must be ingested by a human (the only definitive host), in which it dwells as an intestinal parasite causing minor gastrointestinal disturbances in its host. However, the tapeworm is of major importance for transmission, as it produces tens of thousands of eggs on a daily basis, for years, which are shed into the environment by defecation. Each egg has the potential of becoming a cysticercus upon its ingestion by pigs or humans.

T. solium infection of humans is a disease known since antiquity [1]. Western European countries progressively controlled and finally eradicated it in the early 1900s, mainly through social development as well as meat inspection and confiscation programs [2, 3]. *T. solium* disease is still deeply rooted in Latin America, Africa and Asia, where it develops its complete cycle and displays its multiple interactive facets, with considerable effects on both public health and the economy. From its enclave among the poor, *T. solium* threatens the more privileged social sectors of endemic areas and the people of developed countries by way of tapeworm carriers among migrant workers [4–6]. Biomedical scientific communities in endemic areas are well aware of *T. solium* disease and have contributed significantly to its description and management as well as to scientific research [7–16]. The recent but highly noticeable emergence of human NCC in the USA [5, 17–19] and to a lesser extent in some European countries [6, 20, 21], mostly related to imported cases in migratory workers, has helped in the growing medical concern and contributed greatly to modern research [5, 18]. World awareness of the threat *T. solium* poses to human health and the economies of endemic countries (presumed to be enormous) is thus progressively increasing.

* Correspondence and reprints.
E-mail address: edda@servidor.unam.mx (E. Sciutto).

Recent scientific efforts have concentrated on the improvement of diagnosis and therapeutics, as well as on a better understanding of the role of geographic and socioeconomic variables in transmission [22, 23]. Immunological and genetic factors of both host and parasite, presumably related to the natural history, pathology and prevention of the disease, are also coming into focus. Indeed, some advances have been made in several of these areas, but the available information is not complete and some important points are still debatable.

The clinical and pathological descriptions of the human disease by conventional methods, as well as the histological structure of the parasite, are the most thoroughly documented topics [18, 24–26] and they are merely briefly sketched here. Topics that are medically important or biologically intriguing and that need further research constitute the main scope of this review. Some of these include the role of immunity and genetic background in pathogenesis, the usefulness of immunodiagnostic tools in seroepidemiology and medical diagnosis, the ways of detecting the tapeworm carrier, the role of vaccination to prevent pig CC and consequently decrease infection pressure upon humans, the long-term benefit of the chemically treated human NCC case, the role of gender and age in susceptibility, and the parasite's antigenic, pathogenic and genetic diversity. Other topics about which we know nothing but which are of paramount importance are only mentioned here, such as the nature of molecules and events that lead and determine the establishment of cysticerci in certain target organs and the mechanisms underlying high host-parasite specificity.

Detailed and systematic studies are necessary to solve many of the puzzles posed by *T. solium*, and even more so, to deal effectively with the medical aspects of human and porcine *T. solium* disease in endemic countries with the transmission conditions that prevail.

2. The *T. solium* parasite

A brief summary meant as a reminder of the parasite's principal biological features (i.e. morphology, life cycle, histology, metabolism, fertilization and diversity) is condensed in the legends of figures 1–8, alongside a gallery of classic illustrations taken from different sources [27–36]. Perhaps one should insist here on a few biological features in dire need of research. There is not the slightest hint concerning the mechanisms underlying the parasite's high specificity for pigs and humans, whilst other carnivores and coprophagic mammals are only occasionally afflicted by CC [37, 38]. Hamsters and chinchillas may become tapeworm carriers especially if they are forcefully treated with corticosteroids [39–41]. Likewise, *T. solium*'s tissue tropism towards the central nervous system (CNS) of humans seems to be more frequent in Latin America, whilst it is said that in India the subcutaneous cysticercus is more frequent [42]. Perhaps some of the answers lie in its almost unexplored metabolism and in the as yet barely approached crucial aspects of its genetic, antigenic and pathogenic diversity. Surely, the issue of antigenic diversity of *T. solium* is of great practical importance for the

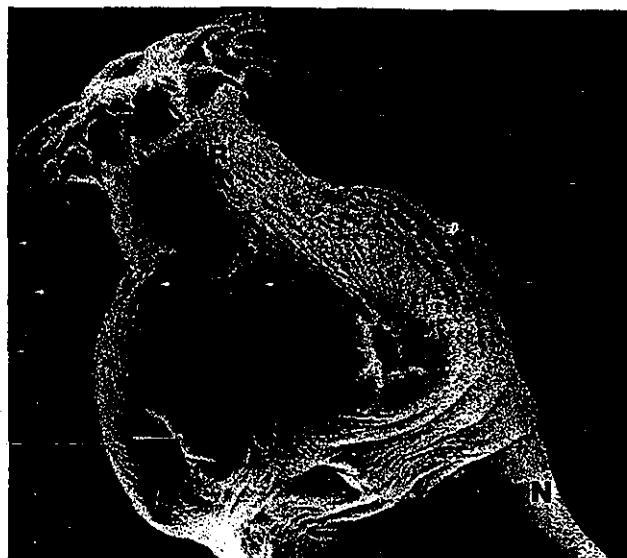


Figure 1. Scanning electron micrograph of the scolex of *T. solium*. Adult *T. solium* is a tapeworm that inhabits the intestine of man. The worm shows a globular structure at one end, called a scolex, which tapers on one side forming a region of proliferative tissues from which proglottides are produced in a chain, forming the strobila. Note the suckers (four in total) and the large rostellum with two rows of 11–14 hooklets 100–160 μm long. Both suckers and rostellum allow attachment of the worm to the intestinal wall. R, rostellum; S, sucker; N, neck.

development of immunodiagnostic technology and for the design of vaccines. In the only formal immunotaxonomic study reported, it was found that all the 15 different collections of cysticerci shared but 30% of their antigens in immunoelectrophoresis [43]. Routine Western blot technology, which can differentiate as many as 50–60 different bands in whole antigen extracts [44], would surely provide very useful information for local and global serological and immunological studies. Also, because of its as yet untapped potential use in the diagnosis and perhaps treatment of human and porcine disease, we should mention here the parasite's unusually high concentrations of free and zinc-bound porphyrins in its vesicular fluid (figure 9). This accumulation of porphyrins makes the cysticerci strongly fluorescent and perhaps sensitive to ultraviolet light [45].

3. The human disease

The most frequent and severe human disease caused by *T. solium* in Latin America is the neurological form of cysticercosis, NCC. CC located elsewhere rarely leads to consultation, except that in the eyes [25], and is therefore essentially uncharacterized medically and epidemiologically.

3.1. The clinical picture

The clinical picture of NCC is heterogeneous and non-specific [46]. Approximately 30–40% of the cases are

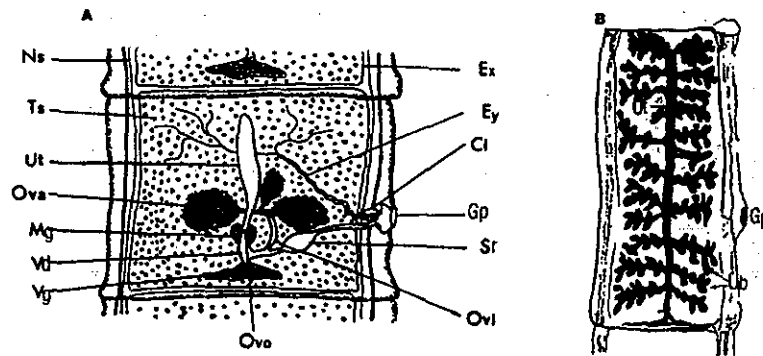


Figure 2. Schematic illustration of a mature proglottide. Proglottids near the neck are immature and undifferentiated, whilst the most distant are progressively mature, containing a large number of eggs (27). The strobila length is usually between 2 and 3 m with 800–1 000 segments, although strobila as long as 7 m have been reported. **A)** Reproductive system. The male system consists of ejaculatory duct (Ey), numerous testicles (Ts) connected to a sperm duct. One end of the sperm duct forms a copulatory structure termed cirrus (Ci), the other end together with the vagina connect to the genital pore (Gp). The vagina ends in the seminal receptacle (Sr), which in turn is connected to the oviduct (Ovi). The mature oocysts leave the ovary (Ova) through a single oviduct, where fertilization takes place. Cells from the vitelline gland (Vg) migrate through the vitelline duct (Vd) to associate with the zygote. Unicellular glands, called Mehlis glands (Mg) surround the ovotype (Ovo), covering the zygote with a mucous and serous secretion that presumably serve as a substrate for the embryophore formation. In the uterus (Ut), the developing larva matures to complete embryonation. Infective eggs are kept stored until the proglottides are liberated into the environment. Excretory canal (Ex) and nervous branch (Ns) are also shown. **B)** Gravid proglottide of *T. solium*. The characteristic branching of the uterus in the mature segments serves to distinguish between *Taenia* species. Gravid proglottides measure 12 × 6 mm and possess a uterus with seven to ten lateral branches (Ub) containing both testes and ovary.

subclinical. In the symptomatic cases, almost any neurological symptomatology may be presented: from mild symptoms such as headache, dizziness or occasional seizures to a very severe neurological picture with intracranial hypertension or dementia. NCC's clinical pleomorphism is thought to result from parasite factors (location, size, number) and host factors (degree of immune and inflammatory reactions developed) and makes the diagnosis on clinical grounds alone impossible. The most common symptom is epilepsy, usually in the form of partial seizures with or without secondary generalization, which occurs principally in parenchymal brain CC [47]. Intracranial hypertension, related to perturbation of the normal circulation of the cerebrospinal fluid (CSF) and/or the obstruction of its absorption, is also frequent, mainly in case of subarachnoid CC. In this case, two different pathophysiological mechanisms are responsible for clinical manifestations: the cyst's mass compressing vicinal structures and the inflammation of the subarachnoid space (arachnoiditis). Many other symptoms have also been described: focal neurological signs (pyramidal tract alterations, sensory deficits, involuntary movements, brainstem dysfunction, etc.), psychiatric manifestations (mild to severe cognitive impairment, depression, psychotic episodes), alterations of cranial nerves, symptomatic vasculitis and progressive decrease of visual acuity [13]. Some differences in NCC presentation relate to age and gender of the host. In children, subarachnoidal, ventricular and muscular locations are rare, whilst ocular location is more frequent [13]. With respect to gender preferences, whilst most studies – serological [23, 48] and necropsy series [49] – have found that the disease and positive serology are almost equally prevalent in men as in women, women have considerably higher titers of anticysticercal antibod-

ies than men [48], and the pathological studies did not search for finer differences (i.e. numbers of cysts, locations, inflammatory reactions, etc). Also, diffuse cysticercal infection (figure 10), which provokes an acute inflammatory response, quite visible in magnetic resonance imagery (MRI), is particularly severe in women (encephalitis syndrome) [50]. Thus, it would appear that there might exist a significant sexual dimorphism in exposure or susceptibility or in pathogenesis in human NCC, as has been clearly shown in murine experimental CC caused by *T. crassiceps* [51–54].

3.2. Anatomic pathology

There are many thorough descriptions of the pathological changes occurring in cysticercotic human NCC, most from conventional histological studies of necropsy cases [31, 49]. A most recent report includes 481 cases of NCC found in 20 206 complete autopsies performed in the Hospital General of Mexico City from 1954 to 1989 [49]. This perhaps unique study confirms NCC's asymptomatic or clinically mild profile in approximately half of the cases correlating with low inflammatory responses, in contrast with the full-blown arachnoidal and ependymal inflammation found in severe neurological disease. This observation is perhaps the strongest existing suggestion that there are potent immunological, inflammatory and genetic factors involved in the severity of human NCC. The study clearly documents the rather fast evolution of NCC in the 1950s and 1960s from overt clinical onset to death: in 85% of the cases where NCC was the principal disease, the patient died within 5 years of diagnosis. A strong association of NCC with malignant hematologic neoplasia was also found in that study and later it was found that it correlated with chromosomal abnormalities [14, 55, 56].

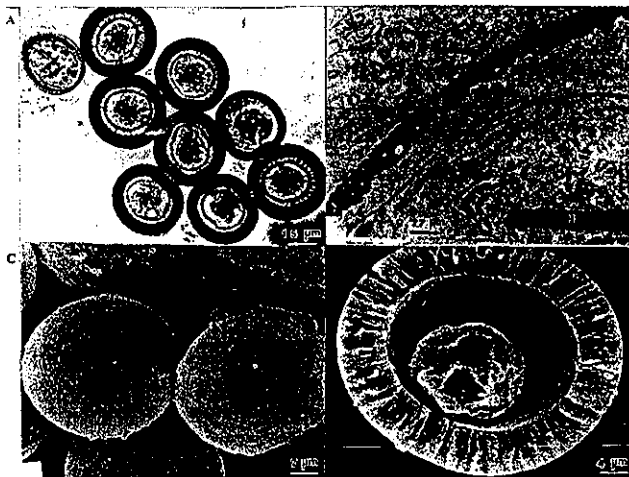


Figure 3. *T. solium* eggs. A) Light micrograph of isolated eggs. The embryophore gives the characteristic striated appearance under the light microscope. Eggs measure 30–45 μm and contain an oncosphere, also known as hexacanth larvae because of its six hooks, surrounded by several protective envelopes including the prominent embryophore, the most protective envelope, made up of protein blocks joined by a cementing substance. Reprinted with permission from [28], copyright 1982. B) Transmission electron micrograph of an immature egg. The capsule is indicated by an arrow; Y, yolk; E, embryophore; EC, embryophore cell; OM, oncospherical membrane; On, oncosphere; H, hook. C) Scanning electron micrograph of eggs of 35–45 μm \times 30–40 μm . D) Scanning electron micrograph of a broken egg. Arrows indicate the position of a pair of oncospherical hooks. Digestion of the cementing substance by proteolytic enzymes disintegrates the embryophoric blocks. The signal that promotes activation of the oncosphere apparently consists of an increase in the permeability of the oncospherical membrane. Once activated, the oncosphere tears its membrane and penetrates the intestinal wall [29].

In other studies inflammation was found to vary from case to case and even between cysticerci of the same case [24]. In general it is agreed that there is focal and surprisingly scant lymphocytic infiltrate in most seemingly viable cysts. This is another finding that supports the notion that the host–parasite relationship may be quite convivial at times, and that it is an exaggerated inflammatory response that causes most damage to the host. However, in clinically severe NCC, collapsed and necrotic cysticerci are found, surrounded by a prominent cellular infiltrate. Some lesions show numerous lymphocytes and plasma cells, macrophages, giant multinucleated cells and few eosinophils, and there is also significant edema, areas of tissue necrosis, gliosis and connective tissue proliferation. Other NCC lesions display prominent infiltration by polymorphonuclear leukocytes, in what would appear a massive and sudden inflammatory attack by the host on the parasite that damages innocent bystanding host components. In still other NCC cases, usually clinically benign, cysticerci are reduced to a mere scar with few parasite structures left recognizable and sometimes substituted by caseous necrosis with deposits of calcium salts. Typically, in these ‘calcified’ cysticercal lesions, the inflammatory infiltrate is

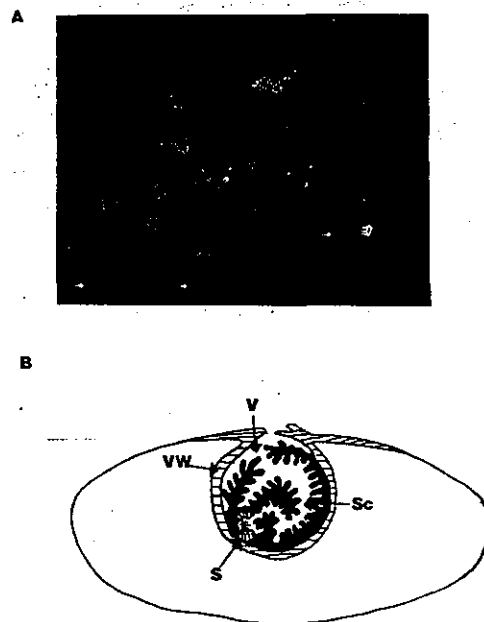


Figure 4. *T. solium* metacestodes (cysticerci) consist of a translucent vesicle filled with fluid (0.5–2 cm in diameter) containing a small invaginated scolex. The scolex has four suckers and an armed rostellum like that of the adult. A) Cysticercus dissected from skeletal muscle of pigs. B) Schematic illustration of a cysticercus. Sc, spiral canal; S, scolex; V, vestibule; VW, vesicular wall. Modified picture from [30].

scant, mainly mononuclear and lymphocytic in nature, irregularly distributed among tenuous strands of fibrous tissue around the cyst. In meningeal and ependymal NCC cases, usually associated with severe endocranial hypertensive disease, chronic inflammation, extensive fibrosis and obstructive endarteritis are quite prominent, constituting a strong argument for inflammation as an important pathogenic mechanism in severe NCC. Most intriguing is that in some of the NCC cases with multiple cysticerci there is variation in the integrity and in the degree of inflammation around each cysticercus within the same host: some appearing as non-inflammatory (those viable or calcified) whilst others are necrotic and surrounded by prominent inflammation. Barring the possibility of repeated infections at different times – and maybe even if such is the case – the fact is that each cysticercus within the same host may have its own possibly independent interaction with the host. Heterogeneity in the set of all host–parasite relationships within each host would be expected to be of consequence for the evolution, symptomatology and response to treatment of NCC patients. There is amazingly little information as to what functional type of immune cells and molecules of parasite and host origin (i.e. antigen, immunoglobulins, complement and lymphokines) are present in the host–parasite interphase. It would appear worthwhile to investigate these matters with modern immunohistochemical and genetical *in situ* methods in a sufficiently rich collection of necropsy cases so as to critically explore the notion that inflammation plays a major role in the pathogenesis of NCC.

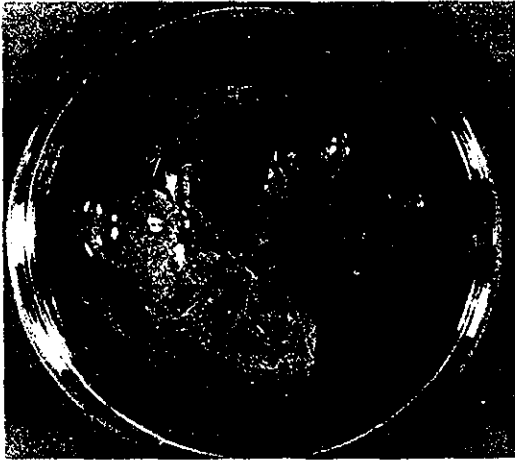


Figure 5. Racemose form of *T. solium* cysticercus. Another form, often associated with serious cases of NCC, is known as racemose cysticercus; it can reach up to 15 cm and be formed as a large bladder with few lobulations, or as a complex bladder arranged as a cluster of grapes. Reprinted with permission from [31], copyright 1982.

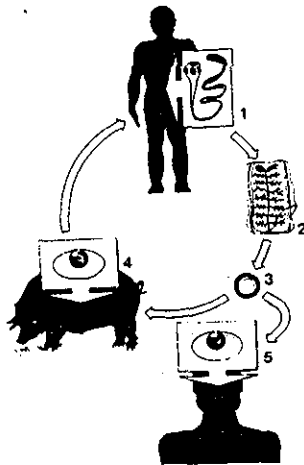


Figure 6. Life cycle of *T. solium*. The *T. solium* life cycle mainly involves the pig as the intermediate host (bearing cysticerci) and humans as the only definitive host (bearing the tapeworm). Humans can also be infected by cysticerci but unless cannibalistic, are not intermediary hosts for transmission. Dogs, sheep and wild boar have occasionally been found to naturally harbor *T. solium* cysticerci. Gravid proglottides or eggs are passed out in the feces of humans infected with the adult worm. Each gravid segment contains 30 000–50 000 eggs [27]; about 50% contain invasive oncospheres. Fully developed *T. solium* adult worms spontaneously release four to five proglottides per day, delivering eggs to the environment. The cycle is completed when undercooked pork containing viable cysticerci is ingested by the definitive host. The scolex and neck within the bladder wall of a viable cysticercus evaginate in response to bile salts and trypsin [8]. The worm attaches to the surface of the small intestinal wall and begins development to reach the form of an adult tapeworm in 5–12 weeks.

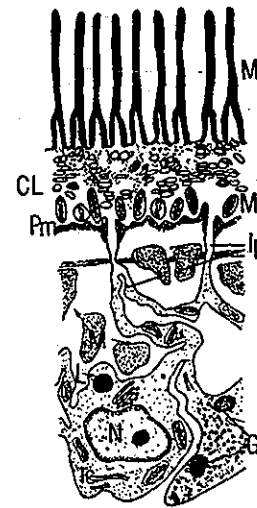
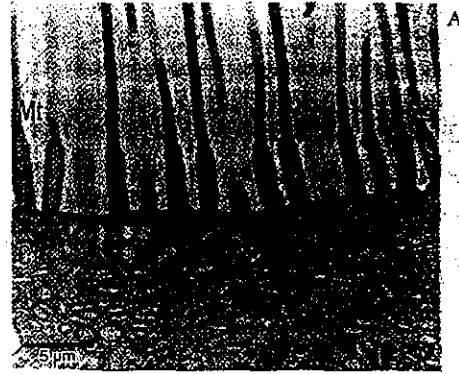


Figure 7. Cestode tissues are mostly syncytial, showing numerous connections between different specialized structures. The parasite surface in contact with the tissues of the intermediate host is the tegument. A) Micrograph of the tegument of *T. solium* (reprinted with permission from [32], copyright 1982). B) Schematic illustration of the tegument of *T. solium* (modified picture from [33]). CL, cytoplasmic layer; M, mitochondria; Mt, microtriches; Tc, tegumental cytons; Ip, internuncial processes; Ms, muscular tissue; N, nucleus; L, lipid deposit; Gl, glycogen deposit; Pm, plasmatic membrane. The tegument consists of a cytoplasmic layer filled with microvesicles and mitochondria with an outer membrane enlarged by well-organized foldings known as microtriches [34]. The surface of the microtriches is covered by the glycocalix. The inner membrane of the tegument rests on a fibrous basement membrane. Underneath the basement membrane are the tegumental cytons that connect with the tegument through cytoplasmic extensions or internuncial processes. The tegumental cytons synthesize proteins and other surface components that are exported to the tegument in the form of vesicles reaching the distal cytoplasm via the internuncial processes [35].

3.3. Immune response and host–parasite relationship

Only fragmentary knowledge exists of the immune response of humans to the parasite. Most NCC patients (80–90%) develop a strong antibody response demonstrable in serum or CSF to a wide variety of the parasite's antigens: at least 50 different electrophoretic bands have

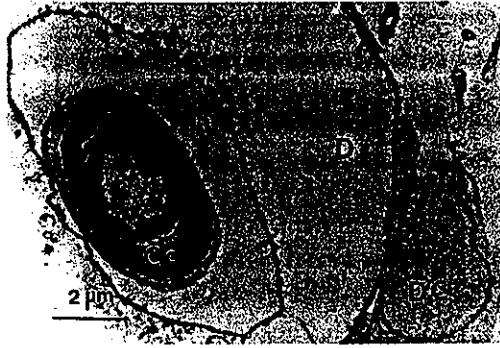


Figure 8. The excretory system (protonephridia) consists of a complex network of tubular canals, some of them ending in flame cells. *T. solium* has mineral concretions termed calcareous corpuscles that are associated with the excretory duct. Reprinted with permission from [36], Copyright Springer Verlag, 1999. Cc, calcareous corpuscles in the *T. solium* protonephridial canal; D, protonephridial duct; DC, duct cell. The function of the protonephridial system in cestodes has not been precisely defined, although it is accepted that it carries out removal of metabolic waste products [8].

been detected in Western blots using complete antigen extracts, some of which appear to be specific for *T. solium* [44, 57, 58]. However, there are always some 10% of confirmed NCC patients that do not have antibodies at the time of sampling [48]. Serologically negative NCC patients are usually cases with single, few or calcified cysticercal lesions, generally referred to as the inactive form of NCC [44, 59]. Whilst the prominent humoral immune response has some diagnostic value, its protective role against the metacestode has not been established nor is there a clear correlation between the severity of disease and the overall titers, Ig class or antigen specificity of such antibodies [60]. To judge from the cysticidal role of antibodies in other cestode diseases, it would appear that they are capable of destroying only the early larvae but not the fully developed cysticerci [61], although it has recently been reported that some of these antibodies, while not destructive to the cysticercus, may severely impair its transformation into a tapeworm [62]. The parasite's paramyosin has been shown to inhibit the complement cascade reactions, thus providing the cysticerci with a mechanism to resist antibody-dependent complement damage [58]. It has been claimed that human NCC is associated with immunodepression of the host cellular immune response [63] but since these claims were made from studies including very few and terminal cases of NCC, questions may be raised as to the general validity of this notion. Very recently, reports from the USA's imported cases reveal immune responses in brain autopsies characterized by antibody response (IgM), NK response, infiltrate with abundant macrophages, granulocytes and T cells. In addition Th-1-type 1 cytokines (IL-2, IL-12 and IFN- γ) are detectable in the inflammatory response [18, 64]. From studies performed on other cestode diseases, the role of Th-1-mediated immune response is associated with protection, whereas Th-2 activity is either irrelevant or frankly permissive of



Figure 9. Lower view of the brain of a cysticercotic pig showing a cluster of subarachnoidal cysticerci glowing their characteristic red fluorescence emission when illuminated with long-wave (405 nm) UV light due to the abnormally high concentration of porphyrins in *T. solium* cysticerci (5–10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). It would appear from enzymatic studies that the *T. solium* cysticercus accumulates porphyrins due to deficiency in coproporphyrinogen oxidase activity [45].

parasite growth and reproduction [65–67]. This is in approximate accordance with prevalent claims in human disease but, obviously, more carefully designed studies in human *T. solium* NCC disease are necessary before establishing such important issues. On equally tenuous grounds are the claims that the heterogeneity in the immune response of humans is associated with differences in immunogenetic factors such as HLA [68]. More recent studies on necropsy series significantly relate NCC with malig-



Figure 10. Brain section showing multiple parenchymal subarachnoidal cysticerci in vesicular stage (encephalitic form). Photograph taken from the brain of a human NCC case by Juan Olvera, MD. Reprinted with permission from [49], copyright 1988.

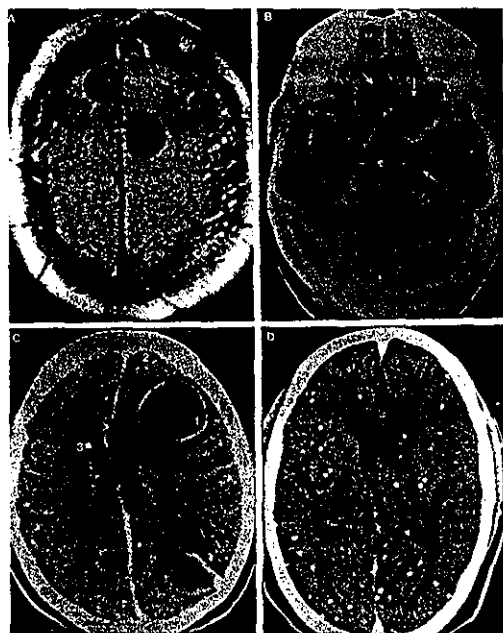


Figure 11. Images of NCC. A) MRI showing two vesicular cysticerci. There is no abnormal enhancement nor perilesional edema. B) Contrast-enhanced CT shows large subarachnoid cysts. Arrows in A and B show cysticercus lesions. C) Contrast-enhanced CT showing colloidal cysts (1) surrounded by marked perilesional edema and contrast enhancement, vesicular cysts (2) and brain calcifications (3). D) CT showing multiple parenchymal brain calcifications corresponding to dead parasites.

nant hematologic neoplasias [55, 56], thus strengthening the notion that NCC relates with concomitant immunological impairment.

3.4. Diagnosis

Neuroimages by computed tomography (CT) and magnetic resonance imaging (MRI) are the 'gold standard' for NCC in clinical diagnosis (figure 11). The use of CT and MRI is complementary; whenever possible both should be used in most patients. CT is very helpful for the study of supratentorial parenchymal lesions: it permits the visualization of active and inactive forms of NCC, and provides orientation on its localization. MRI permits a better visualization of the lesions at the base of the brain, in the brain stem, in the ventricles, in the spinal cord and posterior fossa, and gives a precise evaluation of the inflammatory reaction around the parasite. Its high-contrast resolution permits the recognition of cysts not visualized by CT. Its major limitation is its failure to detect small granulomas and calcifications, the most common CT finding [69]. Although these tools generally permit a precise diagnosis, there is some confusion with tuberculoma, bacterial or fungal abscesses, primary cystic astrocytoma or congenital arachnoid cysts. In some of these cases, a therapeutic trial with cysticidal drugs seems to be a useful diagnostic tool [25].

Immunodiagnosis of NCC would be a great advantage to minimize costs of medical diagnosis and for the inter-

pretation of seroepidemiological surveys, but is a persisting challenge. Almost all techniques have been tried and almost all have claimed success but none has stood up to the harsh problems posed by antigen cross-reactivity or dubious representativity of the tested antigens, discrimination with CC elsewhere or past and resolved infection, inactive forms of NCC usually immunologically non-responsive, as well as technical difficulties prevalent in endemic countries. The most widely used in actuality are the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and the enzyme-linked immunoelectrotransfer blot, using total or partially purified antigen preparations. The different publications show great variability in sensitivity and specificity of these methods, perhaps because of differences in the studied population (figure 12), in the antigens used, in the different developmental stage of the cysticerci inside each host and in the sample (serum or CSF) tested. This methodological and biological diversity prevents a fair comparison of the data. We maintain, however, that, despite the claims of optimal success that usually accompany the application of a new technology, the general experience of many centers is that serology in search of antibodies lacks sensitivity (approximately 70%), missing cases of inactive NCC or single cysticercotic lesions [59, 70, 71]. Furthermore, serology of NCC may be plagued with apparently false positive results for several reasons: some healthy subjects from endemic countries may have serum antibodies induced by previous infections that did not progress to the establishment of cysticerci, or because they bear cysticerci that are localized in clinically inconspicuous anatomic sites. Also, a major cause of truly false positive serology in methods using whole or partially purified antigen preparations is the extensive sharing of antigen epitopes of many cestodes and helminths [44]. Figure 13 more clearly depicts the relationship between positive and negative serology in all possible states of the population at risk of infection. Recently, in studying positive serology to *T. solium* antigens as a predictor of NCC diagnosed by tomography in 480 inhabitants of a village in Honduras, it was shown that only 23% of the positive serological cases had NCC, and only 4% of the NCC cases were serologically positive [22]. These results demonstrate the limitations of serology in detecting NCC in epidemiological studies, and stress the need to develop more sensitive and specific serological methods than those existing. The differentiation of *T. solium* contact cases (previous resolved infections and other forms of CC) from NCC cases and from other infections with cross-reacting organisms by more purified reagents and markers of ongoing neurological disease, would perhaps increase specificity and sensitivity for true ongoing NCC cases. A new possible hope for specific immunotests is the recently developed recombinant 10-kDa protein of *T. solium* that scored 98% specificity when tested with 180 sera from patients with parasitic infections and from normal controls [71]. The use of statistically discriminating western blot image analysis in blots with as many as 30 or so clearly distinguishable bands (ongoing research) is also promising. In contrast to the usually disappointing diagnostic performance of serological methods, the detection of antibodies and antigens in CSF is claimed to fare better, especially when inflam-

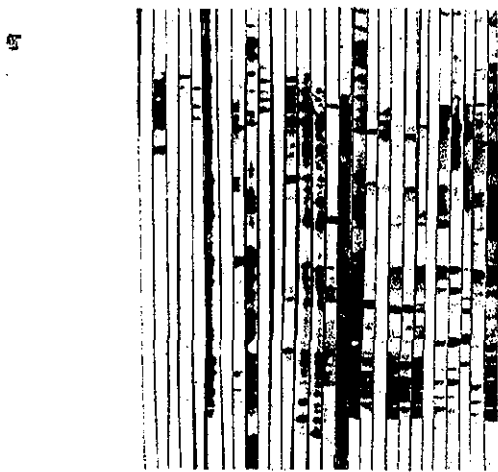


Figure 12. Western blot images of 28 sera from neurocysticercotic patients reacting with all antigens present in the vesicular fluid of *T. solium* cysticercus. Note extreme image variation ranging from no positive bands to more than 20 bands distributed from 230 to 15 kDa. Clearly, the antibody response of neurocysticercotic patients varies considerably from case to case. Also, efficient diagnosis by Western blot images will require computer-assisted image analysis and perhaps some simplification of the antigen mixture.

matory changes exist in the CSF [70]. Clearly, this notoriously different performance of immunological tests in CSF samples is of great practical importance in the diagnosis of NCC in hospital situations where image analysis is impossible or costly, but it is not applicable to seroepidemiological studies or medical diagnosis in non-institutional situations. In short, the design of a sensitive (approximately 85%) serological method, capable of discerning CC from NCC and from a simple past exposure with residual immunological scars and from unexposed controls, is badly needed. Perhaps careful selection of purified natural or recombinant protein antigens or peptides, with or without glycosidic motifs, would minimize cross-reactions and improve specificity. Technical variants to maximize sensitivity by detecting very few antibody or antigen molecules and yet be cost-effective are more difficult to envisage.

3.5. Treatment

In the Mexican experience the short-term prognosis of most patients with NCC has improved radically since the utilization of the cysticidal drugs (praziquantel and albendazol) [13]. Indications for surgical management have decreased since the advent of chemical treatment. The longitudinal studies performed in the USA are less optimistic about drug therapy [18]. Perhaps significant differences in response to treatment arise from Mexico, where we deal with a more heterogeneous group of NCC patients, with more chronic and clinically severe cases (and thus with greater room for improvement), incapable of migrating, whilst the USA immigrant cases may have a higher proportion of early and benign cases (where total cure is sought). In Mexico, albendazol is the drug of choice to begin therapy: approximately 85% of parenchy-

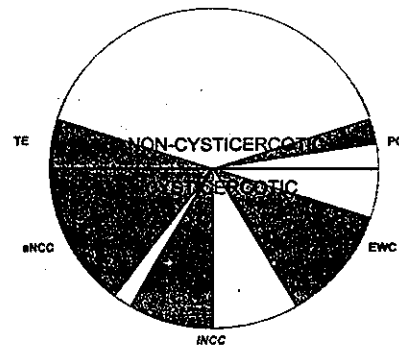


Figure 13. Distribution of serological results among all classes of individuals with respect to CC. Although most seropositives (shaded areas) fall into cysticercotic subclasses, it has been shown that these include a number of cases not having NCC (that could correspond to either inactive NCC (iNCC), CC elsewhere (EWC), past CC (PC), or technical error (TE). It has also been shown that a few aNCC (asymptomatic) cases and most of the iNCC cases are serologically negative. Truly false positive results are those of TE, probably due to cross-reactivity, and that is technically solvable by antigen purification. More problematic is the design of a test capable of discriminating among all the forms of CC (NCC, EWC and PC). The few false negatives among the aNCCs may reflect some sort of immune impairment (some of these patients are under corticosteroid therapy), whilst the seronegative results among most of the iNCCs can be attributed to insufficient antigenic stimulation at the time of sampling (i.e. long-past resolved disease, short immunological memory).

mal cysts are destroyed by a single course, approximately 75% by a single course of praziquantel, and more than 95% by the sequential use of one drug and then the other [72]. Also, it has been demonstrated that ventricular and arachnoid cysts can be eliminated, in most cases, by the use of albendazol alone [46]. The main problem with chemical treatment of NCC is an increase in the CNS inflammatory reaction around the cysticercus concomitant to its sudden destruction. This inflammatory flare-up event is frequently associated with transient clinical deterioration and can be the cause of fibrosis of the leptomeninges and subsequent obstructive hydrocephalus [73]. The control of this inflammatory reaction is thus primordial. For this reason, the administration of anti-inflammatory drugs (corticosteroids) is recommended. The treatment protocol (drug used, schedule, dose and duration) of both cysticidal drugs and corticosteroid will depend on the parasite location and number, and on the inflammatory response to cysticidal treatment of each individual. Immunosuppressive drugs are being considered as adjuncts of treatment in cases where corticosteroid therapy does not palliate inflammation [13]. Thus, it is essential to search for new alternative therapeutical management that would destroy the parasite without greatly increasing the inflammatory reaction in the host's CNS.

4. Porcine CC in Mexico

CC in pigs is still a frequent condition in the developing world, especially in countries where rustic methods of pig

Table I. Frequency of cysticercosis determined by antemortem inspection compared to local slaughterhouse records in villages in the State of Mexico*.

Village	Antemortem inspection		Slaughterhouse records	
	Number of pigs inspected	Cysticercosis (%)	Cysticercosis (%)	
Ixtlahuaca				
Market	269	9.66	1.09	
Two farms	20	20.0		
Almoloya				
Seven farms	142	7.75	1.38	
Atlacomulco				
Three farms	26	30.8	0.32	
San Felipe				
Three farms	47	6.38	no slaughterhouse	
Isolated hamlets (7)	128	15.62	no slaughterhouse	

* Taken from Flisser et al. [8].

rearing are employed and undercooked pork is consumed. Exact data on its prevalence are difficult to obtain, mainly because slaughterhouses and meat inspection practices do not exist in many rural areas or unreliable data are reported, as *table 1* illustrates [8]. The information obtained in slaughterhouses where efficient meat inspection is performed suggests a decrease in the prevalence of pig CC. We fear that this is a spurious decrease reflecting the fact that infected animals are being channeled to clandestine slaughterhouses to avoid confiscation.

In many developing countries pigs are usually poorly fed, are not confined and are allowed and even encouraged to roam about freely in search of food. These free-roaming pigs, in combination with the generalized practice of open-air fecalism that prevails, end up ingesting a significant amount of human feces, some of which are contaminated with *T. solium* eggs. In worse social conditions pigs are deliberately placed to graze in lots used for public defecation or near rural out-houses. The behavior of groups of rural pigs has been studied and it has been observed that the leader of the group has first access to food, particularly fecal material, whilst very little is left for the rest of the pigs [74]. This not so unique inequitable behavior of the strongest would suffice to explain why in rural areas few animals are heavily infected and the majority harbor only a small number of larvae [16]. In rural areas, piglets become infected at the age of 4 weeks, i.e. immediately after weaning. In tropical areas, infection in piglets is higher during the dry and hot season; this paradox arises from adult animals being reluctant to move at high temperatures, whilst piglets remain active [26], and thus have easy access to fecal material during the hot season.

4.1. Clinical picture

CC in naturally infected adult pigs predominantly affects the skeletal muscles, myocardium, brain and viscera [75]. Infected animals rarely show sign of disease. Heavily infected pigs (up to 10^4 metacestodes) may be less active and reluctant to move. Their temperatures remain normal and blood cell counts do not show significant changes. Convulsions have been reported [76], but not in our 10-year experience observing up to 3×10^3 pigs.

4.2. Pathology

The natural history of porcine CC is little known. A few days after experimental infection of pigs the oncospheres produce focal hemorrhagic lesions in the liver, infiltrated with eosinophils that eventually become fibrotic [77]. Rarely do oncospheres develop into metacestodes in the liver. Four weeks after infection, very small vesicles (0.3 cm) may be found in skeletal muscles, but the scolex and canalicular system is not yet completely developed. Six to eight weeks after infection the vesicles are 0.6–0.8 cm long and all structures are completely formed (*figure 14*). After a variable period of time and depending on factors which are not completely understood, most of the larvae begin to degenerate (*figure 15*). This process may be influenced by the state of nutrition, as it seems to occur faster in experimentally inoculated, well-nourished animals than in undernourished, village pigs. The vesicular fluid becomes turbid and later gelatinous (colloid form) and the larvae begin to be surrounded by an inflammatory reaction characterized by the presence of neutrophils, lymphocytes and numerous eosinophils. Inflammatory cells then penetrate the vesicle through the tegument, which becomes swollen, and also invade the entrance canal and the spiral canal. At a later stage, epithelioid and giant cells, which may contain hooks of the scolex, appear in the exudate, the contents of the vesicles turn caseous and the interior parasitic structures begin to disintegrate. At this stage, the surrounding inflammatory reaction is severe and the cells that predominate are lymphocytes, macrophages, giant cells and eosinophils. Finally, the caseous exudate may contain calcified areas, though in pigs, calcification of cysticerci is not very frequently seen. Histologically, the final stage shows fibrotic scar tissue and occasionally faint calcareous infiltration. It may be possible to find hooks of the scolex within this fibrotic tissue. In brain tissue the metacestodes remain vesicular for a much longer time than in muscles [78]. Obviously, it is important to study the tissue sections of these experiments with modern markers of immunological and inflammatory responses, to elucidate their roles in parasite destruction and tissue damage.

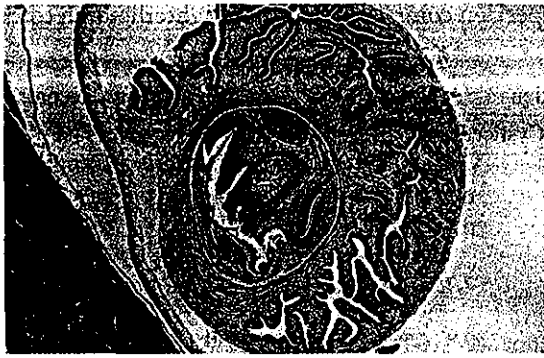


Figure 14. Parenchymatous portion of a *T. solium* cysticercus in pig muscle. The parasite is viable, with no signs of inflammatory reaction in the surrounding tissue. Long arrow, rostellum (R) with hooks (H); short arrow, sucker (S); thick arrow, spiral canal (SC). HE \times 200.

The ratio of vesicular/caseous metacestodes found at necropsy after experimental infections varies with the total number of metacestodes. At approximately 4 months post-infection the majority remain vesicular in those animals with a great number of them. In those that harbor few parasites, the majority are caseous. The presence of many caseous larvae in a carcass has important implications for human health, in view of the fact that they are not infectious, i.e. they will not develop into tapeworms.

The immune response of pigs and its relevance to disease is being explored in experimental infections with *T. solium* eggs [79]. From initial results it would appear that most infected pigs produce antibodies to a number of the parasite antigens, albeit in variable quantities. The antibody response usually lasts for a few weeks. Antibodies do not seem to destroy a developed cysticercus but some are capable of functionally damaging the cysticerci, especially in their capacity to transform into tapeworms [62]. The infected pig lymphocyte's cellular response to in vitro stimulation with specific antigens and conventional mitogens is apparently depressed (ongoing research). Here again more detailed experimentation is required in early and late infections to assess the role of immunity in the natural history of porcine cysticercotic disease.

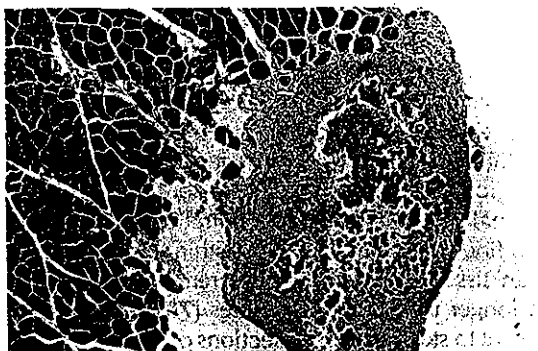


Figure 15. Caseous/calcified cysticerci. The cavity is filled with necrotic material with moderate calcareous infiltrate. HE \times 200.

4.3. Diagnosis

The most common and reliable method of diagnosing the condition in vivo at the village and slaughterhouse level is tongue inspection. The vesicular metacestodes can be palpated and easily seen. Fibrous or calcified larvae are more difficult to detect, as they may be quite small. In our experience, it is estimated that more than 50% of pigs that harbor metacestodes show them in the tongue [80]. The routine postmortem inspection in slaughterhouses is a deep cut in the shoulder muscles. It has been shown that the masseter muscles are more frequently parasitized than other skeletal muscles [75], but it would be impractical to recommend cutting these during routine meat inspection, as the position of the head of the carcass makes it difficult for the inspector to reach and also because the muscle mass is small and contains a considerable amount of fibrous tissue.

Among serological methods, ELISA and immunoelectrotransference are the most frequently used, but have similar limitations as those reported for human patients [70]. We have found that western blot gives positive results as long as the metacestodes are in the vesicular stage, but when they become caseous the result tends to be negative. Results using ELISA show the same tendency [79].

4.4. Treatment

Praziquantel and albendazol are quite effective against pig CC. However, the high costs of these chemicals prevents the treatment of infected pigs as a means of reducing transmission.

5. Epidemiology

Prevalence data clearly point to endemics being located in the developing countries of Latin America, Asia and Africa, whilst Europe, Australia, the USA and Canada are rarely afflicted and mostly by imported cases (reviewed in [13]). Prevalence rates vary in the endemic countries but are usually less than 1:1 000 for human taeniasis (tapeworm carriers), 1–10% for human CC (undifferentiated CC and NCC cases), and up to 20–40% for pig CC, with variations depending on sample design (i.e. rural versus urban), form of detection (i.e. image versus serologic) and risk factors (i.e. family history of taeniasis). In other studies, human NCC was found in 1–5% of a large autopsy series in Mexico; it accounted for about 25% of craniotomies and was the most frequent cause of epilepsy in neurological patients [46]. Children are less frequently afflicted by NCC than adults, presumably because of their shorter time of exposure and/or different immune responsiveness. No significant differences in prevalence of CC due to gender or genetic background have been solidly established in humans. There are some indications of women most frequently presenting an encephalitic form of disease [46] and some sort of preference of human NCC to HLA A28 types [68]. Recent findings of female gender preference and the identification of a resistance gene in *T. crassiceps* murine CC [51–54, 81] hold promise for the elucidation of the role of these major biological factors in the suscepti-

bility of humans to CC. The disproportionate prevalence rates of taeniasis and CC are interpreted as resulting from the strategy of reproduction of the tapeworm, which produces millions of eggs in its life span, each one capable of becoming a single cysticercus. Additionally, it would seem that very few of the many cysticerci ever become a tapeworm, presumably because most are destroyed by cooking and/or by intermediate host factors, such as immunity [8, 62]. Differences in sensitivity of diagnostic procedures could also be involved. A combination of these factors could explain the notoriety of cysticercotic disease and the low epidemiological profile of tapeworm disease: a most disturbing idea, because especially in some rural areas, pig CC may be as high as 20% and yet none or only an occasional sampled inhabitant carries a tapeworm [16]. Human *T. solium* disease is prevalent in countries where there are sectors of the population in extreme poverty (low sanitary conditions at home, untidy personal health practices, lack of education, very low income, social marginality from national public health programs), and where rustic pig-rearing and the use of improper cooking methods are widespread. In non-endemic countries, most cases seem to be imported or acquired through contact with an immigrant human tapeworm carrier [82]. A notorious episode of imported disease is that of the originally non-endemic Irian Jaya in 1971, where the introduction of cysticercotic pigs from Bali caused an epidemic outburst of taeniasis followed by one of human NCC [83]. Risk factors in endemic areas are all those that favor the establishment and progression of the parasite's life-cycle or that imply some likelihood of encountering an infecting parasite. These include residence in an endemic area, low sanitary household conditions, poor personal hygiene, rustic pig-rearing practices, domestic slaughtering and consumption of infected and improperly cooked pork, open-air fecalism which favors feces consumption by roaming pigs, low educational levels, history of personal or family taeniasis, and deliberate feeding of pigs with human feces. The personal risk of sharing living quarters with a tapeworm carrier has been greatly emphasized in recent times, since it involves exposure to greater egg doses and continuous infection opportunities. Besides its sound logic, the proximity issue is epidemiologically strengthened by the finding that seropositive cases are more prevalent in the household of taeniasis patients than elsewhere [84]. This is most certainly so, especially in rural areas and in the miserable quarters of the urban poor where people live in quite crowded conditions. Yet, proximity to tapeworm carriers does not preclude the significance of extensive contamination of the environment with *T. solium* eggs and the possibility of a widespread form of infection, especially in large cities, where deficient sanitary installations, open-air fecalism, and extremely dry and windy seasons would help in the wide distribution of eggs, and where improper cooking methods, low personal hygiene of food handlers and extensive and intensive out-of-home eating habits are prevalent. Together, these combined risk factors make a dreary combination that may account for most (90%) seropositive cases being distributed singly, not clustered, in households, and for the surprisingly (albeit statistically significant) small differ-

ences in seroprevalence among the socioeconomic strata of the population, as found in a national serological survey, comprising 70 000 sera, performed in Mexico [48]. In non-endemic countries the risk of CC is associated with close contact between residents and immigrants from endemic countries, employed as domestic workers and carrying the intestinal tapeworm [82]. Also, tourism to endemic countries is involved in isolated cases but, considering the millions of tourists who travel to these places, the number of imported tourist cases are strikingly low and suggest the importance of continuous exposure in the making of new cases. As for the role of meat inspection in reducing transmission of taeniasis CC in endemic countries – a practice credited for its eradication in European countries [85] – it is presently questioned in underdeveloped countries because of there being very few proper slaughterhouses and because meat inspection is not performed with the necessary zeal in all of them. In fact, it has been argued that in these countries meat inspection actually encourages domestic pig slaughtering and illegal meat marketing as ways of avoiding confiscation of the infected carcasses. Thus, taeniasis CC is a major cause of human misery and economic loss in Latin American countries. Its total impact upon the rest of the globe is also presumed to be huge, judging from the initial statistics so far available from Asia and Africa. It is not unreasonable to fear its spread to more privileged countries or social sectors within endemic countries by way of the parasite's tremendous biotic potential coupled with extensive immigration and employment practices that mix in rather close quarters cultures differing in sanitary standards.

6. Prevention

Taeniasis CC prevention should be a primary public health objective in developing countries. Strategies that may assist prevention are based on social development and/or on biological intervention. Considering that this is a disease of poverty, the improvement of socioeconomic conditions implies the definitive solution of this disease [86]. Unfortunately, social development is a slow process and if it does not include the low social classes, *T. solium* disease will subsist. In fact, it has been reported that 2 years after the initiation of one focal health education program in a Mexican village, only 2% of adults correctly answered questions about the life cycle of the parasite [86].

With respect to biotechnological interventions to curb transmission, these are oriented towards treating of tapeworm-carrying individuals by massive or selective tapeworm treatment or decreasing prevalence of pig CC. As for chemotherapy of taeniasis, massive treatment of human populations to eliminate tapeworms was extensively implemented in the Soviet republics [85] and claimed to have induced important reductions in pig CC. However, if not really massive and sustained, this strategy cannot but slowly eliminate the source of tapeworms (pig CC), as transmission would continue due to new tapeworm cases and to immigration of tapeworm carriers from untreated sectors. Also, massive treatment programs should

Table II. Host protective immunity against cysticercosis induced by vaccination with different sources of *T. solium* antigens.

Source of antigens	Experimental trial	Ref.	Field trial	Ref.
Total extract	ND, 82.1 ² , 33.3 ^{3b}	[94]	ND, ND, 48.9 ^{3b} , 81 ^{3c}	[100]
From cysticerci	58.2, 53.1, 0 ^{3a}	[95]		
	50, 28.6 ^{3a}	[96]		
From eggs	91.7, 96.7, 20 ^{3b}	[97]		
Purified	ND, 94.7, 0 ^{3a}	[98]		
From cysticerci	ND, 64.5, 80 ^{3c}	[10]		
	ND, 96.6, 83.3 ³ ND, 97.8,	[96]		
	50 ^{3b}	[99]		
Recombinant and synthetic	31–84	[96]*	98.7 ¹ , 97.9 ² , 50 ^{3b}	[102]
	91.7, 92.1, 0 ^{3b}	[95]		
	0–94	[12]*		

* Antigens shared by *T. solium* tested in an experimental murine model. ¹ Protective efficacy (expected – obtained/expected) considering the establishment of viable cysticerci, ² the total number of cysticerci, ³ the percent of pigs, completely protected after one^{3a}, two^{3b} or three^{3c} vaccine doses.

take special precautions not to increase the risk of focal contamination of the environment with an avalanche of eggs following mass chemotherapy, an event that could give results quite contrary to the original intentions [86, 87]. The treatment of confirmed or suspected human tapeworm carriers is a focused, inexpensive alternative [88] that could be a realistic tool in controlling transmission. Its epidemiological impact will depend on improving the still-deficient methods for detecting tapeworm carriers who would escape treatment. Recently, successful efforts have been made to develop specific and sensitive diagnostic procedures to detect *T. solium* tapeworm carriers by ELISA and PCR in feces; these procedures are yet to be evaluated in the field [89]. It is also necessary to consider that medical supervision of such treatment interventions is required because non-symptomatic cysticercotic infections may be exacerbated by drug treatment [90]. In addition, the induction of drug resistance must be considered [91], as well as the potential side effects in treated children [92].

Biotechnological strategies aimed at reduction of pig CC allow for some optimism concerning effective control in the short term. Vaccination of pigs is an amenable strategy of intervention because of the pigs' usual short lives before slaughter (approximately 1 year), not demanding long-lasting immune protection. Also, the vaccine is presumed to be better accepted by the usually impoverished pig owners, since the animals are not confiscated. Vaccination is also an economy-conscious method, as pigs will resist infection even if rustically bred with garbage and yet will sell at higher prices in slaughterhouses if the meat is clean of cysticerci. Thus, over the past 20 years there have been some efforts to study the pigs' immune response to *T. solium* with the aim of producing a vaccine against this disease. Optimism prevails because of the effective immunity induced against different cestodes and because of the extensive similarities in natural history, pathology and antigenic compositions among cestode infections, pointing to the possible usefulness of heterologous or synthetic antigens [93]. Two main strategies have been used to identify antigens of interest to be employed as a source of vaccine against *T. solium*: that considering

their expression in oncospheres and/or early developed cysticerci (based on the argument that these are the most vulnerable stages of the parasite to immune attack), and that based on the identification of protective antigens, whatever their location, based on experimental murine models. Table II shows that antigens of both *T. solium* oncospheres and metacestodes can stimulate strong protection against both homologous and heterologous taeniid species. These two strategies have been used with encouraging results in experimental conditions: not so much in the number of pigs with sterile immunity (40–50%), but better yet in the 97% reduction of parasite loads. Reducing the number of infected pigs is not the most relevant effect in curbing transmission, but rather it is the number of viable cysticerci in the immunized pigs that really matters. Although not much emphasis has been placed on the additional therapeutic effect of vaccines [16, 100, 101], recent reports suggest that it could critically affect the dynamics of transmission of the disease by hindering the development of cysticerci into tapeworms [62]. Due to their intrinsic difficulties and high costs, there are few vaccine field trials [16, 100], but the existing reports have given promising results. Experimental challenge of pigs may be a convenient method of selecting candidate antigens for a vaccine, but field evaluation of the candidate vaccine is absolutely essential to determine its protective capacity in real conditions (i.e. in genetically heterogeneous and undernourished pigs, possibly with a low immunological status, reared in rural circumstances and thus exposed to multiple natural challenges of unknown dose and frequency at various ages). These studies are extremely hard to perform properly. Initial results of the only one such controlled field study performed in Mexico are quite positive, using for immunogen synthetic peptide epitopes [102].

Another point that merits comment in discussing biological approaches of controlling transmission is that genetically heterogeneous pigs are quite different in their susceptibility to CC when experimentally challenged [16]. This finding, together with the recent identification of a gene related to resistance in an experimental model of

crassiceps CC [81], opens the possibility of increasing resistance of hosts against CC by transgenesis.

In concluding this section, it is of special interest to stress the high vulnerability of *T. solium* cysticerci to biological factors. In fact, it is estimated that cysticerci are calcified without deliberate medical intervention in approximately 30–40% of human cases, and are spontaneously destroyed and almost disappear after 1 year of experimental infections of well-nourished pigs. In addition, most vaccination experiments report promising results pointing to immunological curtailment of the number and the viability of the parasite. Based on this information it is reasonable to postulate that measures taking advantage of the parasites' vulnerability will contribute to the success of control programs until the slow process of social development in endemic areas reaches the high levels needed for definitive control.

Thus, it would seem that with the knowledge gained of the factors involved in transmission, the careful design of a taeniasis treatment program and the upcoming availability of effective and inexpensive vaccines against pig CC, an effective *T. solium* eradication program could be a reality in the near future.

7. Conclusions

T. solium taeniasis CC is a major parasitic disease complex of global proportions and poses very serious threats to human health and economy. It also poses very interesting scientific questions related to the host–parasite relationship, inflammation, immunity and genetics; a fertile field for useful and basic research. In endemic countries risk factors involve rustic pig-rearing and inadequate meat inspection, poor household sanitary conditions, low personal health practices, open-air fecalism and proximity to tapeworm carriers. In non-endemic countries, most cases are imported from immigrants from endemic areas, whilst the few autochthonous cases are associated with immigrant tapeworm carriers, some employed as domestic workers. Pharmacological treatment of human NCC with cystocidal drugs greatly reduces symptomatology and extends life expectancy in the Mexican experience, but its long-term benefits in the immigrant US cases are under question. Imaging techniques (MRI and CT) are the diagnostic tools of choice for human neurocysticercotic disease, whilst immunological methods are still in need of improvement for medical diagnosis, although they may be useful as methods of massive serological surveillance. Although the available knowledge of *T. solium* taeniasis CC seems to be sufficient for control, its persistence and extension clearly demands systematic eradication programs possibly combining risk control, treatment of tapeworm carriers and pig vaccination.

Acknowledgments

This work was supported by grants from CONACYT G25955; DGAPA, UNAM, IN 212798; Fundación Miguel

Alemán; ANUIES, Ecos program, The British Council and the French embassy.

References

- [1] Griesinger W., Cysticerken und ihre Diagnose, *Archive für Heilkunde, Gesammelte Abhandlungen*, Berlin, 1862, p. 3999.
- [2] Hitchcock E.R., Cysticercosis in the UK, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 50 (1987) 1080–1081.
- [3] Sotelo J., Del Brutto O., Roman G., in: Remington J., Swartz M. (Eds.), *Cysticercosis: Current Clinical Topics in Infectious Diseases*, Blackwell Science, 1996, pp. 240–259.
- [4] Rosenfeld E.A., Byrd S.E., Shulman S.T., Neurocysticercosis among children in Chicago, *Clin. Infect. Dis.* 23 (1996) 262–268.
- [5] Schantz P.M., Wilkins P.P., Tsang V.C.W. (Eds.), *Immigrants, Imaging, and Immunoblots: The Emergence of Neurocysticercosis as a Major Public Health Problem*, Am. Soc. Microbiol., Washington DC, USA, 1998, pp. 213–242.
- [6] Font Puig C., Ruiz Postigo J.A., Munoz Batet C., Pardos Arnal F., Corachan-Cuyas M., Neurocysticercosis in Spain. Apropos 4 cases seen in immigrant patients from endemic countries, *Ann. Med. Intern.* 16 (1999) 89–91.
- [7] Flisser A., Woodhouse E., Larralde C., Human cysticercosis: antigens, antibodies and non-responders, *Clin. Exp. Immunol.* 39 (1980) 27–37.
- [8] Flisser A., Willms K., Lacleste J.P., Larralde C., Ridaura C., Beltran F. (Eds.), *Cysticercosis: Present State of Knowledge and Perspectives*, Academic Press, New York, 1982.
- [9] Flisser A., Taeniosis and cysticercosis due to *Taenia solium*, *Prog. Clin. Parasitol.* 4 (1994) 77–116.
- [10] Nascimento E., Costa J.O., Guimaraes M.P., Tavares C.A., Effective immune protection of pigs against cysticercosis, *Vet. Immunol. Immunopathol.* 45 (1995) 127–137.
- [11] Garcia H.H., Harrison L.J., Parkhouse R.M., Montenegro T., Martinez S.M., Tsang V.C., Gilman R.H., A specific antigen-detection ELISA for the diagnosis of human neurocysticercosis. The Cysticercosis Working Group in Peru, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 92 (1998) 411–414.
- [12] Toledo A., Larralde C., Fragoso G., Gevorkian G., Manoutcharian K., Hernandez M., Acero G., Rosas G., Lopez-Casillas F., Garfias C.K., 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, *Infect. Immun.* 67 (1999) 2522–2530.
- [13] Sotelo J., Del Brutto O.H., Brain cysticercosis, *Arch. Med. Res.* 31 (2000) 3–14.
- [14] Herrera L.A., Ramirez T., Rodriguez U., Corona T., Sotelo J., Lorenzo M., Ramos F., Verdorfer I., Gebhart E., Ostrosky-Wegman P., Possible association between *Taenia solium* cysticercosis and cancer: increased frequency of DNA damage in peripheral lymphocytes from neurocysticercosis patients, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 94 (2000) 61–65.

- [15] 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.* 71 (2000) 13–17.
- [16] Huerta M., Sciutto E., García G., Villalobos N., Hernández M., Fragoso G., Díaz J., Díaz A., Ramírez R., Luna S., García J., Aguilar E., Espinoza S., Castilla G., Bobadilla J.R., José M.V., Larralde C., de Aluja A.S., Vaccination against *Taenia solium* cysticercosis in underfed rustic pigs of Mexico: role of age, genetic background and antibody response, *Vet. Parasitol.* 90 (2000) 203–219.
- [17] Shandera W.X., White A.C. Jr, Chen J.C., Diaz P., Armstrong R., Neurocysticercosis in Houston, Texas. A report of 112 cases, *Medicine* 73 (1994) 37–52.
- [18] White A.C. Jr, Neurocysticercosis: updates on epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and management, *Annu. Rev. Med.* 51 (2000) 187–206.
- [19] Zee C.S., Go J.L., Kim P.E., DiGiorgio C.M., Imaging of neurocysticercosis, *Neuroimag. Clin. N. Am.* 10 (2000) 391–407.
- [20] Chatel G., Gulletta M., Scolari C., Bombana E., El-Hamad I., Matteelli A., Carosi G., Neurocysticercosis in an Italian traveler to Latin America, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 60 (1999) 255–256.
- [21] Hansen N.J., Hagelskjaer L.H., Christensen T., Neurocysticercosis: a short review and presentation of a Scandinavian case, *Scand. J. Infect. Dis.* 24 (1992) 255–262.
- [22] Sanchez A.L., Lindback J., Schantz P.M., Sone M., Sakai H., Medina M.T., Ljungstrom I., A population-based, case-control study of *Taenia solium* taeniosis and cysticercosis, *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 93 (1999) 247–258.
- [23] Rodriguez-Canul R., Fraser A., Allan J.C., Dominguez-Alpizar J.L., Argaez-Rodriguez F., Craig P.S., Epidemiological study of *Taenia solium* taeniosis/cysticercosis in a rural village in Yucatan state, Mexico, *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 93 (1999) 57–67.
- [24] Escobar A., The pathology of neurocysticercosis, in: Palacios E., Rodríguez-Carbajal J., Taveras J.M. (Eds.), *Cysticercosis of the Central Nervous System*, Thomas Springfield, USA, 1983, pp. 27–54.
- [25] Sotelo J., in: Roos K.L. (Ed.), *Central Nervous System Infectious Diseases and Therapy*, Marcel Dekker, Inc., New York, 1997, pp. 545–571.
- [26] de Aluja A.S., Martínez M.J.J., Villalobos A.N.M., *Taenia solium*-cisticercosis in young pigs: age of first infection and histological characteristics of the infection and antibody response, *Vet. Parasitol.* 76 (1998) 71–79.
- [27] Manson-Bahr P.E.C., Bell D.R. (Eds.), *Manson's Tropical Diseases*, Bailliere Tindall, UK, 1987.
- [28] Lacleste J.P., Ornelas Y., Merchant M.T., Willms K., in: Flisser A., Willms K., Lacleste J.P., Larralde C., Ridaura C., Beltran F. (Eds.), *Cysticercosis: Present State of Knowledge and Perspectives*, Academic Press, New York, 1982, pp. 375–387.
- [29] Yoshino K., Studies on the post-embryonal development of *Taenia solium*. Part I. On the hatching of the eggs of *Taenia solium*, *J. Med. Assoc. Formosa* 32 (1933) 139–141.
- [30] Slais J., *The Morphology and Pathogenicity of the Bladder Worms*, Czechoslovak Academy of Science, Czechoslovakia, 1970, pp. 13–50.
- [31] Rabiela-Cervantes M.T., Rivas A., Rodríguez J., Castillo S., Cancino F., in: Flisser A., Willms K., Lacleste J.P., Larralde C., Ridaura C., Beltran F. (Eds.), *Cysticercosis: Present State of Knowledge and Perspectives*, Academic Press, New York, 1982, pp. 179–200.
- [32] Ramírez-Bon E., Merchant M.T., González-del Pliego M., Cañedo L., in: Flisser A., Willms K., Lacleste J.P., Larralde C., Ridaura C., Beltran F. (Eds.), *Cysticercosis: Present State of Knowledge and Perspectives*, Academic Press, New York, 1982, pp. 261–280.
- [33] Smyth J.D., *The Physiology of Cestodes*. University Review in Biology, Oliver and Boyd, 1969, pp. 1–225.
- [34] Rothman A.H., Electron microscope studies of tapeworms: The surface structures of *Hymenolepis diminuta* (Rudolphi, 1819; Blanchard, 1891), *Trans. Am. Microsc. Soc.* 82 (1963) 22–30.
- [35] Lumsden R.D., Hildreth M.B., in: Arme C., Pappas P.W. (Eds.), *Biology of Eucestoda*, Vol. 1, Academic Press, New York, 1983, pp. 177–233.
- [36] Vargas-Parada L., Merchant M.T., Willms K., Lacleste J.P., Formation of calcareous corpuscles in the lumen of excretory canals of *Taenia solium* cysticerci, *Parasitol. Res.* 85 (1999) 88–92.
- [37] Theis J.H., Cleary M., Syvanen M., Gilson A., Swift P., Banks J., Johnson E., DNA-confirmed *Taenia solium* cysticercosis in black bears (*Ursus americanus*) from California, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 4 (1996) 456–458.
- [38] Buback J.L., Schulz K.S., Walker M.A., Snowden K.F., Magnetic resonance imaging of the brain for diagnosis of neurocysticercosis in a dog, *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 208 (1996) 1846–1848.
- [39] Schmidt R.E., Selected topics in laboratory animal medicine volume XXIV: the hamster, *Aeromed. Rev.* 5 (1975) 5–49.
- [40] Monroy-Ostria A., Monroy-Ostria T.J., Gomez G.J., Hernandez M.O., Some studies on the experimental infection of golden hamsters with *Taenia solium*, *Rev. Latinoam. Microbiol.* 35 (1993) 91–98.
- [41] Maravilla P., Avila G., Cabrera V., Aguilar L., Flisser A., Comparative development of *Taenia solium* in experimental models, *J. Parasitol.* 5 (1998) 882–886.
- [42] Singh G., Neurocysticercosis in South-Central America and the Indian subcontinent. A comparative evaluation, *Arq. Neuropsiquiatr.* 55 (1997) 349–356.
- [43] Yakoleff-Greenhouse V., Flisser A., Sierra A., Larralde C., Analysis of antigenic variation in cysticerci of *Taenia solium*, *J. Parasitol.* 68 (1982) 39–47.
- [44] Larralde C., Montoya R.M., Sciutto E., Diaz M.L., Govezensky T., Coltorti E., Deciphering western blots of tapeworm antigens (*Taenia solium*, *Echinococcus granulosus*, and *Taenia crassiceps*) reacting with sera from neurocysticercosis and hydatid disease patients, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 40 (1989) 282–290.
- [45] Larralde C., Zedillo G.M., Lagunoff D., Ludowyke R., Montoya R.M., Goodsaid F., Dreyfus G., Sciutto E., Govezensky T., Diaz M.L., Porphyrin content of the cysticercus of *Taenia solium*, *J. Parasitol.* 72 (1986) 569–577.

- [46] Del Brutto O.H., Sotelo J., Roman G.C. (Eds.), Neurocysticercosis. A Clinical Handbook, 1998.
- [47] Sotelo J., Guerrero V., Rubio E., Neurocysticercosis: a new classification based on active and inactive forms. A study of 753 cases, Arch. Intern. Med. 145 (1985) 442-445.
- [48] Larralde C., Padilla A., Hernández M., Govezensky T., Sciutto E., Gutiérrez G., Tapia-Conyer R., Salvatierra B., Sepúlveda J., Seroepidemiology of cysticercosis in Mexico, Salud Pública Méx. 34 (1992) 197-210.
- [49] Villagran J., Olvera J.E., Cisticercosis Humana: Estudio clínico y Patológico de 481 casos de autopsia, Patología 26 (1988) 149-156.
- [50] Del Brutto O.H., Garcia E., Talamás O., Sotelo J., Sex-related severity of inflammation in parenchymal brain cysticercosis, Arch. Intern. Med. 148 (1988) 544-546.
- [51] Sciutto E., Fragoso G., Diaz M.L., Valdez F., Montoya R.M., Govezensky T., Lomeli C., Larralde C., Murine *Taenia crassiceps* cysticercosis: H-2 complex and sex influence on susceptibility, Parasitol. Res. 77 (1991) 243-246.
- [52] Huerta L., Terrazas L.I., Govezensky T., Larralde C., Immunologic mediation of gonadal effects on experimental murine cysticercosis caused by *Taenia crassiceps*, J. Parasitol. 87 (1992) 471-476.
- [53] Bojalil R., Terrazas L.I., Govezensky T., Sciutto E., Larralde C., Thymus-related cellular immune mechanisms in sex associated resistance to experimental murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*), J. Parasitol. 79 (1993) 384-389.
- [54] Larralde C., Morales J., Terrazas I., Govezensky T., Romano M.C., Sex hormone changes induced by the parasite lead to feminization of the male host in murine *Taenia crassiceps* cysticercosis, J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 52 (1995) 575-580.
- [55] Del Brutto O.H., Castillo P.R., Mena I.X., Freire A.X., Neurocysticercosis among patients with cerebral gliomas, Arch. Neurol. 54 (1997) 1125-1128.
- [56] Herrera L.A., Benita-Bordes A., Sotelo J., Chavez L., Olvera J., Rascon A., Lopez M., Ostrosky-Wegman P., Possible relationship between neurocysticercosis and hematological malignancies, Arch. Med. Res. 30 (1999) 154-158.
- [57] Tsang V.C., Brand J.A., Boyer A.E., An enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay and glycoprotein antigens for diagnosing human cysticercosis (*Taenia solium*), J. Infect. Dis. 59 (1989) 50-59.
- [58] Garcia E., Ordonez G., Sotelo J., Antigens from *Taenia crassiceps* cysticerci used in complement fixation, enzyme-linked immunosorbent assay, and western blot (immunoblot) for diagnosis of neurocysticercosis, J. Clin. Microbiol. 33 (1995) 3324-3325.
- [59] White A.C., Robinson P., Kuhn R., *Taenia solium* cysticercosis: Host-parasite interactions and the immune response, Chem. Immunol. 66 (1997) 209-230.
- [60] White A.C., Neurocysticercosis: a major cause of neurological disease worldwide, Clin. Infect. Dis. 24 (1997) 101-113.
- [61] Rickard M.D., Immunization against infection with larval taeniid cestodes using oncospherical antigens, in: Flisser A., Willms K., Lacleste J.P., Larralde C., Ridaura C., Beltran F. (Eds.), Cysticercosis: Present State of Knowledge and Perspectives, Academic press, New York, 1982, pp. 633-646.
- [62] Garcia G., Sciutto E., Fragoso G., Cruz Revilla C., Toledo A., Villalobos N., Flores I., Aluja A., Jose M., Larralde C., Taeniosis-cysticercosis: GK1 antibodies inhibit development of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* towards reproductive and pathogenic stages, J. Parasitol. (2000) in press.
- [63] Sealey M., Ortiz-Ortiz L., Cellular immunity and cysticercosis. A review, in: Flisser A., Willms K., Lacleste J.P., Larralde C., Ridaura C., Beltran F. (Eds.), Cysticercosis: Present State of Knowledge and Perspectives, Academic press, New York, 1982, pp. 565-574.
- [64] Restrepo B.I., Llaguno P., Sandoval M.A., Enciso J.A., Teale J.M., Analysis of immune lesions in neurocysticercosis patients: central nervous system response to helminth appears Th1-like instead of Th2, J. Neuroimmunol. 89 (1998) 64-72.
- [65] Villa O.F., Kuhn R.E., Mice infected with the larvae of *Taenia crassiceps* exhibit a Th2-like immune response with concomitant anergy and downregulation of Th1-associated phenomena, Parasitology 112 (1996) 561-570.
- [66] Terrazas L.I., Bojalil R., Govezensky T., Larralde C., Shift from an early protective Th1-type immune response to a late permissive Th2-type response in murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*), J. Parasitol. 84 (1998) 74-81.
- [67] Toenjes S.A., Spolski R.J., Mooney K.A., Kuhn R.E., The systemic immune response of BALB/c mice infected with larval *Taenia crassiceps* is a mixed Th1/Th2-type response, Parasitology 118 (1999) 623-633.
- [68] Del Brutto O.H., Granados G., Talamas O., Sotelo J., Gorodezky C., Genetic pattern of the HLA system: HLA A, B, C, DR, and DQ antigens in Mexican patients with parenchymal brain cysticercosis, Human Biol. 63 (1991) 85-93.
- [69] Martinez H.R., Rangel-Guerra R., Elizondo G., MR imaging in neurocysticercosis: a study of 56 cases, AJNR 10 (1989) 1011-1019.
- [70] Ramos-Kuri M., Montoya R.M., Padilla A., Govezensky T., Díaz M.L., Sciutto E., Sotelo J., Larralde C., Immunodiagnosis of neurocysticercosis: disappointing performance of serology (enzyme-linked immunosorbent assay) in an unbiased sample of neurological patients, Arch. Neurol. 49 (1992) 633-636.
- [71] Chung J.Y., Bahk Y.Y., Huh S., Kang S.Y., Kong Y., Cho S.Y., A recombinant 10-kDa protein of *Taenia solium* metacystodes specific to active neurocysticercosis, J. Infect. Dis. 180 (1999) 1307-1315.
- [72] Del Brutto O.H., Sotelo J., Roman G.C., Therapy for neurocysticercosis: a reappraisal, Clin. Infect. Dis. 17 (1993) 730-735.
- [73] Sotelo J., Update: the new ventriculoperitoneal shunt at the Institute of Neurology of Mexico, Surg. Neurol. 46 (1996) 19-20.
- [74] Copado F., Aluja A., Mayagoitia L., Galindo F., Social and individual behaviors of free ranging pigs in the Mexican tropics, Proceeding of the 31st International Congress of the International Society for Applied Ethology, Prague, Czech Republic, 1997.

- [75] Vargas M., Saldierna V., Navarro F.R., Acevedo H.A., Flisser A., de Aluja A.S., Localización del cisticerco de la *Taenia solium* en diferentes regiones musculares del cerdo y su importancia para la inspección sanitaria, *Vet. Méx.* 17 (1986) 275–279.
- [76] Zürn F.A., Die tierischen Parasiten auf und in dern Körper unserer Hanssäugetierte, Verlag B. F. Voigt, Weimar, 1882.
- [77] Aluja A.S., Manchas de leche (Milk spots) por metacéstodos de *Taenia solium* en hígados de cerdo, *Vet. Méx.* 25 (1994) 155.
- [78] Serrano-Palapa D., Aluja A., Lecumberri I., Villalobos A., Comparación de la reacción inflamatoria causada por el metacéstodo de *Taenia solium* en músculos y encéfalo de cerdos, *Vet. Méx.* 28 (1997) 1–5.
- [79] Aluja A.S., Villalobos A.N.M., Plancarte A., Rodarte L.F., Hernández M., Zamora C., Sciutto E., *Taenia solium* cysticercosis: Immunity in pigs induced by primary infection, *Vet. Parasitol.* 81 (1999) 129–135.
- [80] Sciutto E., Martínez J.J., Villalobos N.M., Hernández M., Jose M.V., Beltrán C., Rodarte F., Flores I., Bobadilla J.R., Fragoso G., Parkhouse M.E., Harrison L.J., de Aluja A.S., Limitations of current diagnostic procedures for diagnosis of *Taenia solium* cysticercosis in rural pigs, *Vet. Parasitol.* 27 (1998) 299–313.
- [81] Fragoso G., Lamoyi E., Mellor A., Lomeli C., Hernández M., Sciutto E., Increased resistance to *Taenia crassiceps* murine cysticercosis in Qa-2 transgenic mice, *Infect. Immun.* 66 (1998) 760–764.
- [82] Schantz P.M., Moore A.C., Muñoz J.L., Hartman B.J., Schaefer J.A., Aron A.M., Persaud D., Sarti E., Wilson M., Flisser A., Neurocysticercosis in an Orthodox Jewish community in New York City, *N. Engl. J. Med.* 327 (1992) 692–695.
- [83] MacManus D.P., Improved diagnosis as an aid to better surveillance of *Taenia solium* cysticercosis, a potential public health threat to Papua New Guinea, *PNG Med. J.* 38 (1995) 287–294.
- [84] Diaz Camacho S.P., Candil Ruiz A., Suare Peraza V., Zazueta Ramos M.L., Felix Medina M., Lozano R., Willms K., Epidemiologic study and control of *Taenia solium* infections with praziquantel in a rural village of Mexico, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 45 (1991) 522–531.
- [85] Gemmell M., Matyas Z., Pawlowski Z., Soulsby E., Larralde C., Nelson G.S., Rosicky B., Guidelines for surveillance prevention and control of Taeniasis/cysticercosis, VPH/83-49, World Health Organization, Geneva, 1985.
- [86] Keilbach N.M., de Aluja A.S., Sarti-Gutierrez E., A programme to control taeniosis-cysticercosis (*Taenia solium*): experiences in a Mexican village, *Acta Leidensia* 57 (1989) 181–189.
- [87] Pawlowski Z.S., Efficiency of low doses of praziquantel in taeniosis, *Acta Trop.* 48 (1989) 83–89.
- [88] Roman G., Sotelo J., Del Brutto O., Flisser A., Dumas M., Wadia N., Botero D., Cruz M., García H., de Bittencourt P.R., Trelles L., Arriagada C., Lorenzana P., Nash T.E., Spina-Francia A., A proposal to declare neurocysticercosis an international reportable disease, *Bull. World Health Org.* 78 (2000) 399–406.
- [89] Gonzalez L.M., Montero E., Harrison L., Parkhouse M., Garate T., Differential diagnosis of *Taenia saginata* and *Taenia solium* by PCR, *J. Clin. Microbiol.* 38 (2000) 737–744.
- [90] Flisser A., Madrazo I., Plancarte A., Schantz P., Allan J., Craig P., Sarti E., Neurological symptoms in occult neurocysticercosis after single taeniacidal dose of praziquantel, *Lancet* 342 (1993) 748.
- [91] Jackson E., Anthelmintic resistance—the state of play, *Br. Vet. J.* 149 (1993) 123–138.
- [92] Forrester J.E., Bailar J.C. 3rd, Esrey S.A., Jose M.V., Castillejos B.T., Ocampo G., Randomised trial of albendazole and pyrantel in symptomless trichuriasis in children, *Lancet* 352 (1998) 1103–1108.
- [93] Lightowers M.W., Eradication of *Taenia solium* cysticercosis: a role for vaccination of pigs, *Int. J. Parasitol.* 29 (1999) 811–817.
- [94] Molinari J.L., Soto R., Tato P., Rodriguez D., Retana A., Sepulveda J., Palet A., Immunization against porcine cysticercosis in an endemic area in Mexico: a field and laboratory study, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 49 (1993) 502–512.
- [95] Sciutto E., Aluja A., Fragoso G., Rodarte L.F., Hernandez M., Villalobos M.N., Padilla A., Keilbach N., Baca M., Govezensky T., Immunization of pigs against *Taenia solium* cysticercosis: factors related to effective protection, *Vet. Parasitol.* 60 (1995) 53–67.
- [96] Manoutcharian K., Rosas G., Hernandez M., Fragoso G., Aluja A., Villalobos N., Rodarte L.F., Sciutto E., Cysticercosis: identification and cloning of protective recombinant antigens, *J. Parasitol.* 82 (1996) 250–254.
- [97] Plancarte A., Flisser A., Gauci C.G., Lightowers M.W., Vaccination against *Taenia solium* cysticercosis in pigs using native and recombinant oncosphere antigens, *Int. J. Parasitol.* 29 (1999) 643–647.
- [98] Pathak K.M., Gaur S.N., Immunization of pigs with culture antigens of *Taenia solium*, *Vet. Parasitol.* 34 (1990) 353–356.
- [99] Kumar D., Gaur S.N.S., Pathak K.M.L., Immunization of pigs against the cysticercus of *Taenia solium* using fractionated first and second peaks of cysticercus cellulosaescolex antigen, *Indian J. Anim. Sci.* 57 (1987) 932–935.
- [100] Molinari J.L., Rodriguez D., Tato P., Soto R., Arechavaleta F., Solano S., Field trial for reducing porcine *Taenia solium* cysticercosis in Mexico by systematic vaccination of pigs, *Vet. Parasitol.* 69 (1997) 55–63.
- [101] Evans C.A., Gonzalez A.E., Gilman R.H., Verastegui M., Garcia H.H., Chavera A., Pilcher J.B., Tsang V.C., Immunotherapy for porcine cysticercosis: implications for prevention of human disease. Cysticercosis Working Group in Peru, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 56 (1997) 33–37.
- [102] Huerta M., Aluja A., Fragoso G., Jose M., Larralde C., Hernandez M., Toledo A., Villalobos M., Diaz A., Diaz J., Alvarez I., Avila B., Huerta M., Gevorkian G., Beltrán C., Sciutto E., Resultados de la vacunación en campo con una vacuna sintética en contra de la cisticercosis porcina por *Taenia solium*, IV Congreso Latinoamericano de Parasitología, Acapulco, Guerrero, Mexico, 1999.

APÉNDICE A5



El cerdo no tiene la culpa

Laura Vargas-Parada y Juan Pedro Laclette

LA CISTICERCOSIS ES UNA ENFERMEDAD MUY PELIGROSA QUE PUEDE EVITARSE FÁCILMENTE. DESCUBRE QUIÉN ES EL VERDADERO CULPABLE.

ERA YA TARDE y Pepe se apresuraba a regresar a casa. Sentía el hormigueo del hambre y ya cerca de la estación del metro no pudo más, sucumbió ante unos tacos de carnitas en uno de los muchos puestos callejeros. Su primer error fue consumir carne de cerdo de procedencia dudosa, que probablemente no fue revisada por el control sanitario de la Secretaría de Salud. Con el hambre, a Pepe no le importó que la carne no estuviera apropiadamente cocida, segundo error. Dentro de ella, varias decenas de pequeñas vesículas ovaladas y traslúcidas (visibles a simple vista si se les sabe buscar) se mantienen a la espera, atentas al momento y señales químicas adecuadas para liberar su peligroso contenido: la larva de un gusano parásito llamado *Taenia solium*. A estas larvas llamadas cisticercos, también se les conoce en algunos estados de la República como "granillo", "granizo" "tomatillo" "zahuate", "alegría" o "ladilla", y se encuentran en la carne de cerdos infectados por *T. solium*.

Todo por unos tacos

El viaje del cisticercos comienza en la boca de Pepe, donde al masticar libera a varios de ellos de entre los restos de carne, tra-

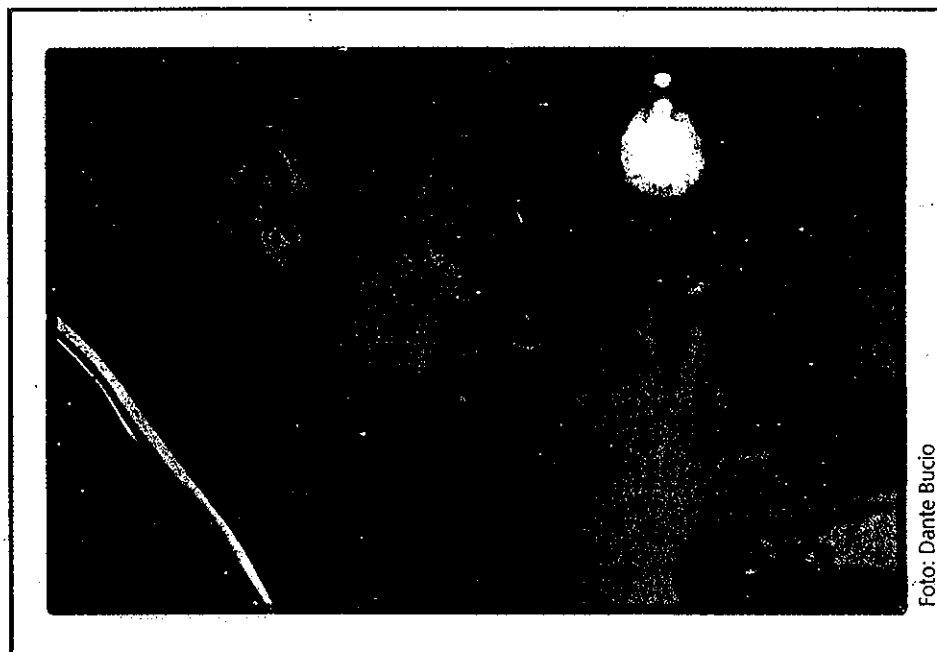


Foto: Dante Bucio

gándolos junto con la comida. Al pasar por el estómago y llegar a la primera porción del intestino delgado, las enzimas gástricas e intestinales, así como las sales biliares, permiten al cisticercos deshacerse de su envoltura para poder fijarse en la pared del intestino delgado, usando para ello cuatro ventosas adhesivas y una corona de ganchillos que se encuentran en su cabeza o escólex. Una vez anclado, crece y madura hasta convertirse en un gusano adulto aplanado y segmentado llamado tenia o solitaria. La solitaria puede llegar a medir entre 1.5 y cuatro metros de longitud y tener más de 100 segmentos. La infección intestinal, también conocida como teniasis, a veces produce síntomas

leves como dolor estomacal, náusea, malestar general, pérdida de peso, dolor de cabeza y mareos. Estas molestias normalmente se toleran sin mayor dificultad por lo que la solitaria puede sobrevivir durante años en el intestino del individuo. Sólo el ser humano puede alojar al gusano adulto de *T. solium*, es decir, es el único hospedero definitivo.

Como la solitaria es hermafrodita, esto es, posee a la vez órganos sexuales masculinos y femeninos, una vez que madura se autofecunda para producir huevecillos que serán liberados en las heces fecales de Pepe. Una tenia adulta puede liberar varias decenas de miles de huevecillos diariamente.

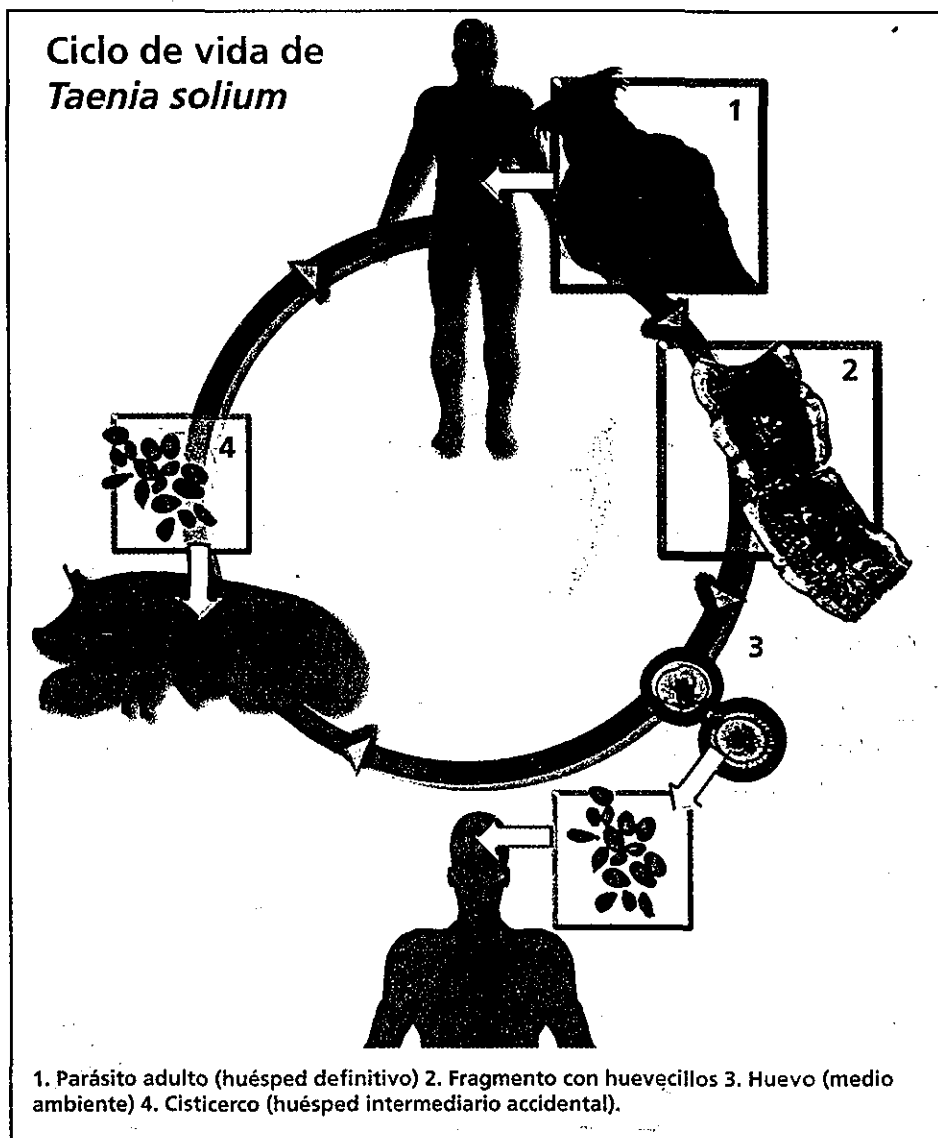
Cisticercosis, el verdadero peligro

Como en sí misma la solitaria no causa grandes problemas médicos, el portador del gusano adulto, en este caso Pepe, ignora por completo el hecho de que está infectado. Sin embargo, los portadores de solitarias adultas son extremadamente peligrosos puesto que pueden causar en otros individuos o incluso en sí mismos una enfermedad severa y peligrosa llamada cisticercosis.

La cisticercosis se adquiere por la ingestión de huevecillos de *T. solium* excretados en las heces de los portadores de la solitaria (parásito adulto), y al ser ingeridos, cada huevecillo tiene el potencial de convertirse en un cisticerco.

El fecalismo al aire libre, frecuente en comunidades rurales carentes de servicios sanitarios básicos, permite que la materia fecal se mantenga expuesta en el exterior. En las grandes ciudades no estamos exentos, se calcula que en el área metropolitana de la Ciudad de México ocurren diariamente más de 200 000 defecaciones al aire libre. En las comunidades rurales es común que los cerdos lleven a cabo una labor de limpieza aprovechando las heces fecales que encuentran en el exterior como parte de su alimentación, completando así el ciclo de vida del parásito. En el cerdo, los huevecillos viajan por el tracto digestivo y al llegar al estómago son liberados de su capa protectora llamada oncosfera,

Ciclo de vida de *Taenia solium*



por las mismas enzimas y sales biliares que hicieron lo suyo con el cisticerco. Sin embargo, en esta ocasión el embrión que sale del huevecillo no se alojará en el intestino, por el contrario, penetrará a través del intestino en el torrente sanguíneo, iniciando un viaje sin retorno hacia algún tejido del huésped. Durante este viaje madurará y se convertirá en cisticerco.

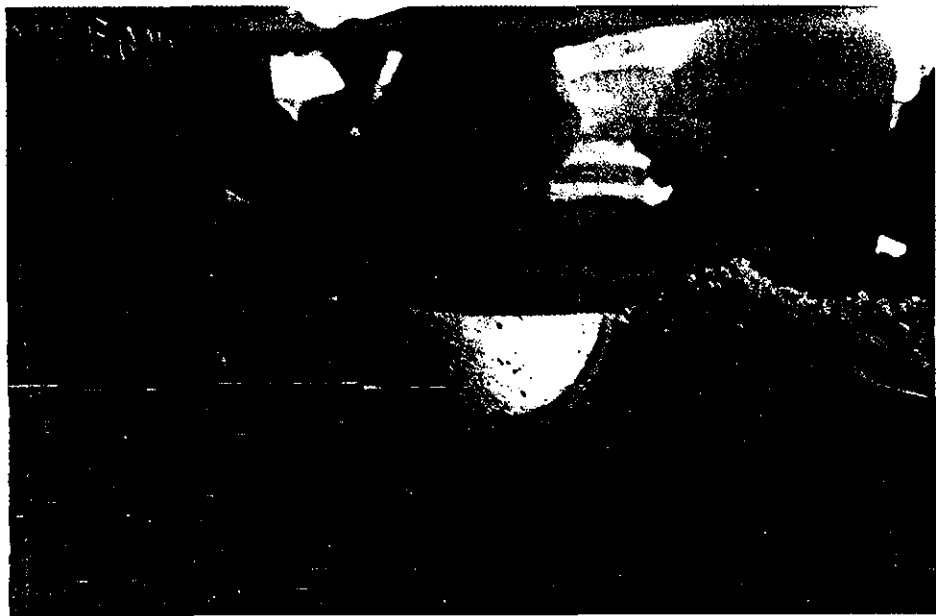
Ocasionalmente los huevecillos pueden llegar a ser ingeridos por los seres humanos. La materia fecal, producto del fecalismo al aire libre, puede ser transportada por el aire o por las moscas, contaminando los alimentos y agua que se crucen en su camino. Los alimentos también pueden contaminarse con huevecillos cuando los sem-

bradíos (berros, lechuga, cilantro, papas, zanahorias, fresas) se riegan con aguas negras o cuando heces fecales humanas son utilizadas como fertilizantes directos.

Otra forma de infectarse es la convivencia con un individuo teniásico. Justo lo que le pasó a María, la esposa de Pepe. Frecuentemente, Pepe olvida lavarse las manos después de ir al baño, dejando partículas microscópicas de heces fecales conteniendo huevecillos, entre sus uñas y manos. De esta manera Pepe contamina no sólo lo que toca o a quienes saluda de mano, sino que también puede contaminar a su esposa o a sus hijos cuando los sábados les prepara el

Si la carne se corta en trozos pequeños y se fríe en aceite hirviendo, la temperatura es suficiente para inactivar y destruir a los cisticercos que pudieran encontrarse en ella.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



Fotos: Dante Bucio

síntomas podrían deberse a la epilepsia "pequeño mal" (véase recuadro), y le explicó que en algunos casos, pueden presentarse diariamente centenares de ataques del pequeño mal, de muy corta duración. Como consecuencia, aquellos que la sufren experimentan la pérdida periódica de la atención con una consecuente disminución de la productividad en el trabajo. Debido a que las causas de la epilepsia son muy diversas, incluyendo lesiones cerebrales, tumores, abscesos, e infecciones (algunas características de la niñez, como paperas, tosferina y sarampión), el médico decidió enviar a María con un neurólogo, el especialista en las enfermedades del cerebro.

Una visita al hospital

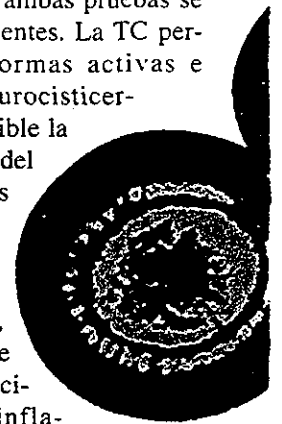
Pepe acompañó a María al hospital, donde le realizaron varias pruebas para determinar la causa de su malestar. Se le practicaron pruebas de tomografía computarizada (TC) y de resonancia magnética (RM). Con ambos estudios se puso en evidencia la causa de la enfermedad de María, un par de masas blanquecinas, pequeñas y densas, que el médico identificó como cisticercos. La TC y la RM son pruebas claves en el diagnóstico de la neuro-

cisticercosis (nombre que se le da a la cisticercosis cerebral) y de muchas otras enfermedades neurológicas. Cuando es posible, ambas pruebas se practican a los pacientes. La TC permite visualizar formas activas e inactivas de la neurocisticercosis, haciendo posible la

localización precisa del o de los cisticercos en el cerebro. La RM produce una imagen más detallada de las lesiones, con la cual se puede evaluar con más precisión la reacción inflamatoria alrededor del parásito.

Por su alta resolución y contraste permite detectar cisticercos que no son visualizados por la TC, aunque es incapaz de detectar los pequeños granulomas y zonas calcificadas observables por esa prueba.

El médico les explicó a María y a Pepe que la neurocisticercosis es la forma más frecuente y severa de la enfer-



desayuno. Así fue como María, su esposa, ingirió los huevecillos de *T. solium* un sábado por la mañana, cambiando drásticamente la vida de la familia.

Al igual que en el cerdo, los huevecillos de la solitaria viajan por el tracto digestivo y una vez en el estómago penetran a través de la pared intestinal hacia el torrente sanguíneo. Los síntomas en el nombre pueden aparecer en un tiempo variable, inclusive años después de la ingestión de los huevecillos. Las manifestaciones clínicas son muy diversas y varían dependiendo de dónde se localice la larva (músculos, ojos, corazón, cerebro). Hay individuos que no presentan síntomas, mientras que otros sufren problemas neurológicos (cuando el cisticerco se aloja en el cerebro), como dolor de cabeza, convulsiones, epilepsia, hipertensión, encefalitis o meningitis.

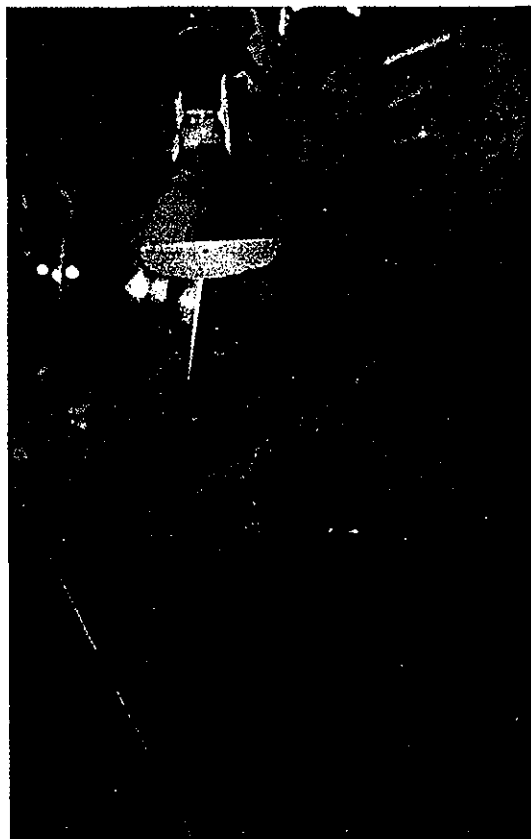
La cisticercosis es una enfermedad frecuente en México y en otros países de Latinoamérica, África y Asia, donde el consumo de carne de cerdo es habitual y los hábitos higiénicos son deficientes.

Un tortuoso camino

Después de ingerir los huevecillos pasarían varios meses antes de que María manifestara los primeros síntomas. Primero fueron dolores de cabeza que con el tiempo se volvieron más frecuentes e intensos. Más adelante, comenzaron a ocurrirle cosas raras. Sin previo avi-

so, percibía "luzes", ruidos u olores y su jefe insistía en que dejara de "soñar despierta". Ante la amenaza de ser despedida, decidió ir al médico. Después de examinarla, el médico general decidió enviarla a un especialista explicándole que sus síntomas coincidían con los de una variante de la epilepsia.

Con la información que María le proporcionó al médico, éste concluyó que sus



medad en Latinoamérica. Sin embargo, muchos casos (30-40%) no presentan síntomas y por lo tanto no reciben tratamiento. Cuando hay síntomas, los más comunes son el dolor de cabeza, ataques epilépticos, hipertensión intracraneal (aumento de la presión del fluido cerebrospinal en el cerebro) o demencia. La variabilidad en los síntomas depende de la localización, tamaño y número de los cisticercos que se encuentran en un paciente, así como de factores propios del enfermo (respuesta inmune y reacción inflamatoria). El síntoma más común es la epilepsia, como le ocurrió a María.

Un asunto de familia

María no podía comprender cómo había contraído la neurocisticercosis puesto que ella siempre se lava las manos, desinfecta frutas y verduras y no come en la calle. El médico le explicó que era posible que alguien en la familia fuera teniásico y ordenó unos exámenes coproparasitológicos para todos los miembros de la familia. Para hacer un examen de este tipo, se requiere llevar muestras de heces fecales durante tres días al hospital. En el laboratorio un técnico especializado revisa las muestras en busca de segmentos o huevecillos de *Taenia*.

Fue una odisea llevar tres días seguidos las muestras de heces fecales de toda la familia al laboratorio del hospital. Pocos días después, el médico los llamó con los resultados del análisis. Como había sospechado, les dijo, hay un teniásico en la familia: Pepe. Después de analizar el caso, el médico llegó a la conclusión de que probablemente Pepe había adquirido la infección con la solitaria por ingerir carne contaminada en alguno de los muchos puestos callejeros que él solía visitar. Sin embargo, le hizo ver que el riesgo más grave fue para su familia, por su mala costumbre de no lavarse las manos después de ir al baño y antes de preparar los alimentos.



Neurocisticercosis. Imagen por resonancia magnética.

Foto: J. Sotelo

Cisticercosis y epilepsia

En México, la neurocisticercosis es la causa más frecuente de epilepsia en pacientes neurológicos.

La epilepsia es un trastorno caracterizado por ataques periódicos, recurrentes y breves, ocasionados por la descarga eléctrica anormal e irregular de millones de neuronas encefálicas. La forma más conocida o epilepsia "gran mal" se inicia como resultado de un gran número de descargas eléctricas que viajan por las áreas motoras y se diseminan a otras áreas en el encefalo. La persona se desvanece y presenta contracciones involuntarias de los músculos esqueléticos. El estado de desvanecimiento y las convulsiones duran unos minutos y a continuación los músculos se relajan y la persona recupera la conciencia. Muchos epilépticos sufren ataques que se limitan a una o varias pequeñas áreas del cerebro, como en el caso de la llamada epilepsia "pequeño mal". Los ataques del pequeño mal se caracterizan por ser cortos. La persona suele desvanecerse durante cinco a treinta segundos, pero no sufre la pérdida del control motor que es típica del ataque convulsivo del gran mal. Por el contrario el individuo tiene aspecto de "soñar despierto".

El tratamiento de María

Para aliviar o disminuir los ataques epilépticos, le administraron medicamentos

a María. El especialista le explicó que hace algunos años el tratamiento de la neurocisticercosis dependía casi exclusivamente de la extracción quirúrgica del cisticerco, y esto sólo cuando el parásito se encontrara alojado en un lugar accesible a la cirugía. Afortunadamente, ahora existen dos medicamentos: el praziquantel y el albendazol. En México, la terapia generalmente se inicia con albendazol. Alrededor de un 85% de los cisticercos en el parénquima cerebral son destruidos con una sola dosis de albendazol, aproximadamente 75% por una sola dosis de praziquantel y más del 95% con el uso secuencial de uno de los fármacos seguido del otro. El principal problema con el tratamiento medicamentoso de la neurocisticercosis es el aumento en la reacción inflamatoria alrededor del cisticerco,

que en algunos casos puede causar la muerte del paciente. Por ello, el control de la reacción inflamatoria es primordial. María recibió primero una dosis de albendazol, seguida de otra de praziquantel y para evitar una desagradable reacción inflamatoria, se le administraron drogas antiinflamatorias (corticoesteroides). El médico le explicó que la dosis y la duración del tratamiento tanto de los fármacos anti cisticerco como de los anti inflamatorios, depende del número y localización del parásito y de la reacción de cada paciente. Después de varias semanas de tratamiento y seguimiento, María dejó de mostrar los síntomas, comenzó a sentirse mejor y recuperó su vida normal.

Más vale prevenir que lamentar

Después de esta terrible experiencia, Pepe decidió informarse sobre las medidas para prevenir ésta y otras enfermedades transmitidas por huevecillos y quistes en las heces fecales. Descubrió que una serie de cuidados sencillos hacen la diferencia: lavarse las manos antes y después de ir al baño, y lavar y desinfectar perfectamente frutas y verduras, sobre todo aquellas que crecen a ras de suelo y por lo tanto son más susceptibles de contaminarse con

ces fecales. Con estas simples medidas evita la ingestión de los temibles quistes y huevecillos de parásitos, previniendo no sólo la cisticercosis sino también muchas otras enfermedades como amebiasis, giardiasis, ascariasis y la tricofalosis.

Con respecto a la carne de cerdo, la investigación de Pepe resultó muy interesante. Si la carne se corta en trozos pequeños y se fríe en aceite hirviendo, la temperatura es suficiente para inactivar y destruir a los cisticercos que pudieran encontrarse en ella. Pero si la carne no se cuece suficientemente, o en trozos tan grandes que el calor no penetra uniformemente al interior, entonces algunos cisticercos pueden sobrevivir. Pepe también se encontró con que el frío es otro enemigo de este temible parásito: si la carne de cerdo y las fresas se congelan decuadamente por varios días a una temperatura de -20°C , durante el proceso de descongelamiento se destruyen tanto larvas como huevecillos.

En México aún se utilizan métodos arcaicos para el mantenimiento de los cerdos en muchas comunidades rurales y frecuentemente la carne se consume cocida de manera insuficiente. En estas comunidades los cerdos son pobremente alimentados y no se les confina en corrales, permitiéndoles que merodeen en busca de alimento. Esto, en combinación con la práctica generalizada del fecalismo al aire libre, ocasiona que los cerdos terminen ingiriendo heces fecales, algunas de las cuales pueden estar contaminadas con huevecillos de *T. solium*. En condiciones de pobreza extrema, se alimenta a los cerdos libremente con desechos.

Mejores condiciones higiénicas, drenajes adecuados y una cocción adecuada de la carne ayudan a prevenir la cisticercosis. Pepe se asombró al enterarse que esta enfermedad era común en la Alemania de finales del siglo pasado y de cómo se erradicó mediante el establecimiento de una rigurosa inspección veterinaria en todos los cerdos sacrificados.

La carne de cerdo será segura siempre y cuando se consuma en lugares que cumplan con las normas sanitarias.

La situación suele ser diferente en las grandes ciudades. En estas zonas, el control sanitario y la inspección de la carne suele ser extenso y estricto, obligando a los productores de carne a cumplir con todas las normas necesarias de sanidad. La carne de cerdo que se vende en centros comerciales y expendios de carne autorizados es por lo tanto segura para su consumo. Sin embargo, aún en las grandes urbes debe tenerse cuidado con el origen de la carne. Existe venta clandestina que no pasa ninguna inspección sanitaria; la carne que se expende en puestos callejeros clandestinos constituye un riesgo que debemos tener en mente.

Al principio Pepe se negaba a comer cualquier cosa que contuviera carne de cerdo. Sin embargo, después de su extensa investigación concluyó que la prevención depende de uno mismo; de los hábitos higiénicos. La carne de cerdo será segura siempre y cuando se consuma en lugares que cumplan con las normas sanitarias. Decidió olvidar los tacos callejeros y concluyó que *el cerdo no tiene la culpa*.

Laura Vargas-Parada es maestra en investigación biomédica en enfermedades infecciosas por la Escuela de Medicina Tropical de Londres. Actualmente trabaja en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.

Juan Pedro Laclette estudió el doctorado en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, el cual dirige actualmente, y realizó un posdoctorado en la Escuela de Salud Pública de la Universidad de Harvard. Ha dedicado casi 20 años al estudio de la cisticercosis humana y porcina.



Corte de un cisticerco tomado con microscopio electrónico.

Foto: Juan Pedro Laclette.