



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**Programa de Doctorado en Ciencias
Biomédicas**

**USO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EN EL
DESARROLLO DE UNA VACUNA EN CONTRA DE LA
CISTICERCOSIS MURINA Y PORCINA**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**LIC. EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA
CARLOS FEDERICO SOLÍS AGUIRRE**

**DIRECTOR DE TESIS:
DR. JUAN PEDRO LACLETTE SAN ROMÁN**

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTORAL:
DRA EDDA SCIUTTO CONDE
DRA. ANA FLISSER STEINBRUCH**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
MARZO DEL 2005, MÉXICO, D.F.**



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.

Esta Tesis se la dedico,

A Haydée por su apoyo y su cariño incondicionales, y por motivarme a culminar esta gran aventura,

A mis Padres Rosa María y José Luis, y a mi Hermano Francisco por estar siempre dispuestos a brindarme todo su apoyo y su cariño,

A Pablo, María Eugenia y a la Familia Lugo-Martínez por su ayuda desinteresada en momentos difíciles y por permitirme ser parte de la familia.

También dedico esta Tesis a todos mis Maestros por sus valiosas enseñanzas a lo largo de mi formación.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	4
ADVERTENCIA	5
INTRODUCCIÓN	5
Biología del parásito	5
Ciclo biológico de la <i>Taenia solium</i>	5
La teniosis-cisticercosis humana y porcina	6
La importancia de la cisticercosis	7
Epidemiología de la cisticercosis	7
Aspectos socio-económicos de la cisticercosis	8
Estrategias para el control de la cisticercosis	9
Medidas preventivas contra la cisticercosis	9
Mecanismos inmunológicos de la protección en contra de la cisticercosis	9
Hacia el desarrollo de una vacuna	11
Antecedentes del proyecto	13
El Antígeno B o paramiosina de <i>Taenia solium</i>	13
El modelo murino de cisticercosis	15
La inmunización génica	16
Resultados previos	18
OBJETIVO DEL PROYECTO	18
Objetivos particulares	18
MATERIALES Y MÉTODOS	18
Ensayos de vacunación contra la cisticercosis murina	18
Animales	18
Inmunizaciones	18
Sangrado de los ratones	19
Infección experimental con <i>Taenia crassiceps</i>	19
Ensayos de vacunación contra la cisticercosis porcina	19
Animales	19
Inmunizaciones	19
Sangrados	19
Infección experimental con <i>Taenia solium</i>	19
Necropsias	19
Producción de proteínas recombinantes	19
Vectores para expresión bacteriana	19
Expresión y Purificación de las proteínas recombinantes	20
Desarrollo de vectores plasmídicos para inmunización génica	20
Vectores	20
Construcción de genes sintéticos	20
Análisis de secuencia	20
Transfección con vectores plasmídicos	21
Transformación de bacterias	21
Transfección de células eucariontes in vitro	21
Expresión funcional <i>in vitro</i> con plásmidos para vacunación génica	21

Inmuno-precipitación	21
Tinción intracelular	22
Caracterización de la respuesta inmune por anticuerpos	22
Ensayos de ELISA	22
Isotipos de anticuerpos	22
Cuantificación de anticuerpos específicos	22
Ensayos de inmuno-localización	22
Caracterización de la respuesta inmune celular	23
Ensayos de proliferación celular	23
Cuantificación de citocinas	23
Métodos Misceláneos	23
Cuantificación de proteínas	23
Electroforesis de proteínas	23
Inmuno electro-transferencia (<i>Western-blot</i>)	24
Preparación de inmunógenos recombinantes	24
RESULTADOS	24
Ensayos de vacunación con antígenos recombinantes de <i>Taenia solium</i>	24
Producción de antígenos recombinantes	24
Ensayos de vacunación con antígenos recombinantes de <i>Taenia solium</i>	25
Perfil de la respuesta inmune protectora con productos recombinantes	27
Ensayos de vacunación génica	28
Construcción de vectores plasmídicos p ara vacunación génica	28
Construcción de genes sinté ticos para vacunación génica	29
Expresión de los antígenos in vitro	30
Respuesta inmune por anticuerpos en ratones vacunados génicamente	31
Respuesta inmune celular en ratones vacunados génicamente	32
Efecto in vivo de las modificaciones en el uso de codones para vacunación génica	32
Vacunación génica en contra de la cisticercosis murina	33
Ensayos de vacunación en cerdos	34
DISCUSIÓN	37
AGRADECIMIENTOS	42
REFERENCIAS	42
ANEXO 1	49
ANEXO 2	50
ANEXO 3	51
ANEXO 4	52
ANEXO 5	53
ANEXO 6	54
ANEXO 7	55
ANEXO 8	56

RESUMEN

El desarrollo de una vacuna en contra de la cisticercosis porcina, junto con otras medidas sanitarias y educativas, puede contribuir a erradicar esta enfermedad en México. En los últimos años, nuestro grupo ha caracterizado las propiedades protectoras de la paramiosina de la *Taenia solium* (TPmy) que es una proteína filamentosa de 98 kDa con una estructura secundaria de hélice súper enrollada. Esta proteína muscular es capaz de unirse al C1q e inhibir la cascada del complemento, por lo que propusimos que forma parte de un mecanismo del parásito para evadir la respuesta inmune del huésped cisticercoso. Los sueros de pacientes con neurocisticercosis reconocen frecuentemente a la TPmy a través de ensayos inmuno-enzimáticos, lo cual sugiere que es un blanco para la respuesta inmune del huésped.

Los ensayos de vacunación en el modelo murino de cisticercosis por *Taenia crassiceps*, en ratones Balb/c inmunizados con fragmentos recombinantes de TPmy, revelaron que el tercio amino terminal (VW2-1) induce una disminución de la carga parasitaria > 50%, asociada a una respuesta de tipo Th1.

En el presente proyecto de tesis exploramos inicialmente el uso de la inmunización génica con vectores plasmídicos que codifican para VW2-1. Los ensayos de transfección *in vitro* de células COS-7 y CHO, mostraron que la construcción plasmídica que contiene la secuencia codificadora de VW2-1, induce la expresión de VW2-1. Los ensayos de vacunación génica en contra de la cisticercosis murina por *T. crassiceps*, a diferentes tiempos de la infección, mostraron que los ratones vacunados génicamente con VW2-1 presentaron disminuciones de la carga parasitaria del 60-88%. La respuesta por inmunización génica indujo niveles altos de anticuerpos IgG2a, específicos hacia la paramiosina (2:1 en el balance Th1/Th2), así como buenos índices de estimulación en células de bazo cultivadas *in vitro* con paramiosina recombinante.

En la etapa final de este proyecto doctoral, y con el propósito de optimizar la estrategia de inmunización génica, se desarrolló una nueva generación de vectores plasmídicos que contienen la secuencia codificadora del fragmento protector de la paramiosina (VW2-1) pero con el uso de codones adaptado para mamíferos (synVW2-1), así como de varias citocinas del cerdo y del ratón, como agentes moduladores de la respuesta inmune. Los ensayos comparativos de inmunización génica mostraron que la edición en la preferencia de codones, tiene un efecto significativo en la magnitud de la respuesta inmune evaluada por anticuerpos y células. Finalmente, los ensayos de vacunación génica con synVW2-1 en contra de la cisticercosis murina por *T. crassiceps*, resultaron en una disminución de la carga parasitaria de 43-48%, similar a lo obtenido con recVW2-1.

Los ensayos preliminares de vacunación con recVW2-1 y con synVW2-1 en contra de la cisticercosis porcina, también resultaron en una disminución de la carga parasitaria que varía entre el 40 y 50%. Los altos títulos de anticuerpos detectados en los sueros de los cerdos inmunizados génicamente con synVW2-1, que además se mantuvieron por más de cinco meses, sugieren que esta estrategia puede resultar en el desarrollo de una vacuna eficaz, económica y de fácil aplicación en contra de la cisticercosis porcina.

ABSTRACT

The development of a vaccine against porcine cysticercosis, together with other sanitary and educational measures, might contribute to eradicate this parasitic disease in Mexico and other endemic countries. Our group has characterized the protective potential of the immune response against Taenia solium paramyosin (TPmy), which is a 98 kDa protein with a supercoiled α -helical secondary structure. TPmy is a muscle protein which has the property of binding to C1q and inhibiting the complement cascade. Therefore, TPmy has been proposed to be involved in a parasite strategy to modulate the cysticercotic host immune response. Moreover, immune-enzymatic assays also revealed that TPmy is frequently recognized by sera collected from neurocysticercotic patients, suggesting that this antigen is a target for the host immune response.

Vaccination studies in the murine model of cysticercosis by Taenia crassiceps showed that mice immunized with the recombinant amino terminal fragment of TPmy (VW2-1), consistently reduced levels of worm burden (> 50%) after an intraperitoneal challenge with cysts, similar to that obtained with the full-length TPmy. The outcome of the protective immune response induced in mice immunized with the recombinant VW2-1 is related to a Th1 profile.

*Genetic vaccination studies were conducted in mice immunized with VW2-1. Plasmid vectors carrying the sequence for VW2-1 were shown to effectively induce the expression of paramyosin in transfected mammalian cells cultured *in vitro*. Results from protection assays using genetic vaccination with VW2-1, carried out at different stages of the infection, shown a reduction of the parasite load of about 60-88%. Genetic immunization of mice with VW2-1 resulted in high titers of anti-TPmy IgG2a antibodies (2:1, Th1/Th2 balance), as well as high stimulation indexes of spleen cells stimulated *in vitro* with recombinant TPmy.*

*In order to optimize the genetic immunization strategy a new coding sequence for VW2-1 with a codon usage adapted for mammalian cells (synVW2-1) was developed using gene building procedures. An extensive comparison of the outcomes of the immune responses elicited in mice genetically immunized with the wild-type VW2-1 and with synVW2-1 consistently showed higher antibody and cellular immune responses with the synthetic gene. Mice that were genetically immunized with synVW2-1 and challenged by intraperitoneal inoculation of *T. crassiceps* cysticerci, showed 43-48% reduction in parasite burden, similar to that previously obtained with the recombinant VW2-1 protein.*

Preliminary protection assays in pigs genetically immunized with synVW2-1 showed a reduction of the parasite load between 40-50%. Additionally, high titers of anti-TPmy antibodies were found in the sera of pigs genetically immunized with synVW2-1, detectable at least five months after the immunization, suggesting this vaccination strategy might result in the development of a low-cost and efficient vaccine against porcine cysticercosis.

ABREVIATURAS: TPmy (paramiosina de *Taenia solium*); VW2-1 (fragmento amino terminal de la TPmy); wtVW2-1 (secuencia codificadora silvestre del fragmento VW2-1); synVW2-1 (secuencia codificadora sintética de VW2-1 con el uso en las preferencias de los codones adaptada para mamíferos); IgG (immunoglobulinas de tipo G); IgG1 (IgG del isotipo 1); IgG2a (IgG del isotipo 2a); ELISA (enzyme linked immunosorbent assay); IL-4, IL-10, IL-12 (interleucina 4, 10, 12); IFN- γ (interferón gama); CRT (calreticulina de *T. solium*); PCR (polymerase chain reaction); Th1 ó Th2 (linfocitos T de ayuda de tipo 1 o 2); CHO (células de ovario de hámster chino); COS-7 (células de riñón de mono); *E. coli* (*Escherichia coli*); PBS (solución amortiguadora de fosfatos); BSA (albúmina sérica bovina).

ADVERTENCIA

Parte de los resultados de esta tesis se encuentran en la sección de anexos en forma de artículos publicados en revistas especializadas, numeradas en orden cronológico, a los que se hace referencia en los capítulos de Resultados y Discusión. Los Anexos 5 y 6 forman parte de un proyecto desarrollado de manera conjunta entre J. Vázquez-Talavera y yo, lo que resultó en otra tesis [166], además de la presente. En los Anexos 4 y 5, se describen resultados de experimentos de vacunación en contra de la cisticercosis murina por *Taenia crassiceps*, en ratones inmunizados con productos recombinantes de la paramiosina de *Taenia solium*; así como una caracterización parcial de la respuesta inmunológica del ratón y del humano. En el Anexo 6, también se reportan algunos aspectos de caracterización de la respuesta inmune celular y humoral hacia los fragmentos recombinantes de la paramiosina, en pacientes sanos y neurocisticercosos. En los Anexos 1 y 4 se muestran los resultados de vacunación génica en el modelo murino de cisticercosis.

Las publicaciones presentadas en los Anexos 2, 3, 7 y 8, son el resultado de colaboraciones con otros miembros del grupo ó con otros grupos de investigación, en cuestiones afines al presente proyecto de tesis, pero que no forman parte del tema principal a que se refiere esta tesis. En consecuencia, estos Anexos no se describen o mencionan en los capítulos de Resultados y Discusión. En el Anexo 8, se encuentra un artículo que presenta la caracterización, mediante técnicas de *Phage-display*, de epítomos B de la paramiosina de *T. solium*. En el Anexo 2, se reportan los resultados de un trabajo de investigación en donde se utilizaron los fragmentos recombinantes de la paramiosina de *T. solium*, para modular el arreglo espacial de las moléculas del receptor *scavenger* en la superficie de células, para disparar eventos de internalización de lipoproteínas. Además, otros hallazgos *in vitro* revelaron que la paramiosina de *T. solium* tiene propiedades pro-apoptóticas, lo cual sugiere que podría tener otras funciones disuasivas de la respuesta inmune del huésped cisticercoso. En el Anexo 3, se describe la caracterización de la calreticulina de la *T. solium*, antígeno que recientemente hemos incorporado a los ensayos de vacunación en contra de la cisticercosis. Finalmente, en el Anexo 7 se reportó la respuesta a estrés térmico de *T. solium* y *T. crassiceps*, mediante marcaje metabólico de cisticercos cultivados *in vitro*, lo cual permitió identificar varias proteínas de estrés.

INTRODUCCIÓN

Biología del parásito

Ciclo biológico de la Taenia solium

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

La *Taenia solium* adulta es un gusano que puede medir más de cuatro metros de largo, de color blanquecino, y que se aloja en el intestino del huésped definitivo, causando la llamada teniosis. La *Taenia* posee una estructura cefálica anterior denominada escólex, provista de ganchos y ventosas que le permiten fijarse a la pared intestinal del hombre (Fig. 2). En la parte inferior del escólex se forma un cuello que es una región germinal en la que se originan los llamados proglótidos o segmentos. Los proglótidos unidos entre sí forman el estróbilo. A medida que se alejan del escólex, los proglótidos muestran un grado creciente de diferenciación, encontrándose segmentos maduros en la parte media del estróbilo. Los proglótidos maduros constituyen unidades de reproducción ya que poseen tanto genitales masculinos como femeninos.

Los proglótidos más distales al escólex muestran un útero ramificado lleno de huevos (~ 50,000 en cada uno) por lo que se les llama grávidos (Fig. 3). Los proglótidos grávidos se liberan de la *Taenia* espontáneamente y se desechan en las heces del huésped humano teniásico. Los proglótidos se descomponen en las heces, y liberan los huevos que contienen los embriones u oncosferas hexacanto, que alcanzan al huésped intermediario (cerdo) por ingestión directa de las heces de teniásicos, o por consumo de agua o alimentos contaminados. Las enzimas digestivas y las sales biliares del huésped intermediario activan la oncosfera contenida en el huevo que penetra la pared intestinal y alcanza los capilares linfáticos y sanguíneos para conducirla a una gran variedad de órganos y tejidos (tejido subcutáneo, músculo esquelético, cerebro, ojos, etc...), en donde se desarrolla hasta convertirse en la forma larvaria o cisticerco. El hombre, al igual que el cerdo puede actuar como huésped del cisticerco (intermediario) por ingestión de agua o de alimentos contaminados.

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

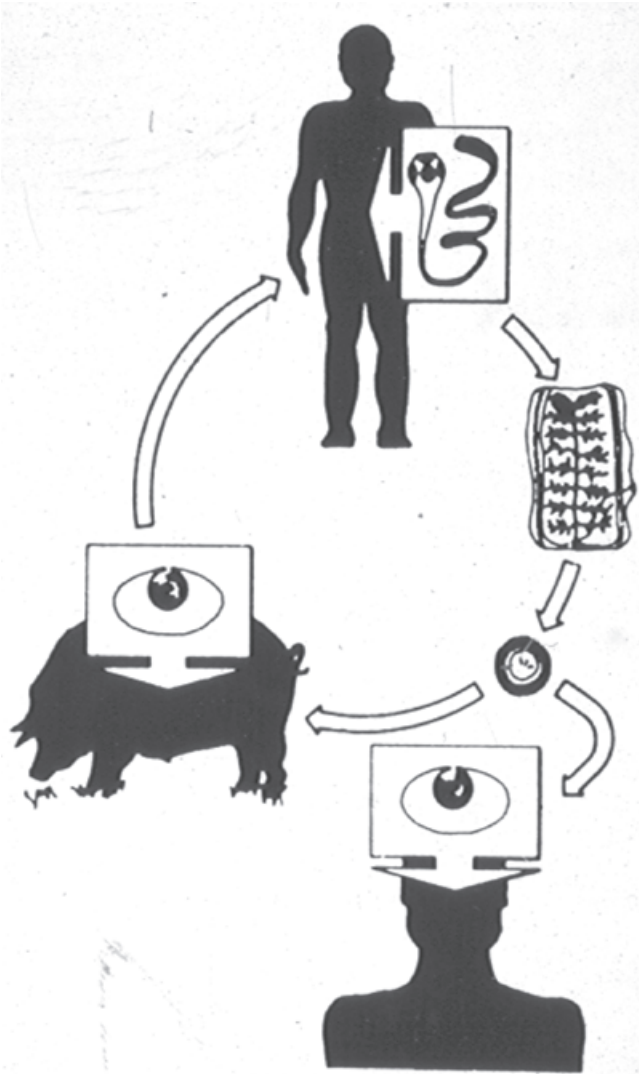


FIG. 1. Ciclo de vida de *Taenia solium*. El hombre es el huésped definitivo del estadio adulto de la *Taenia solium*. El teniásico arroja en las heces fecales segmentos de la *Taenia* (proglótidos), que contienen miles de huevos, que alcanzan al huésped intermediario que es el cerdo. El hombre, al igual que el cerdo, puede actuar como huésped intermediario por ingestión accidental de alimentos o agua contaminada con huevos de *Taenia solium*. Finalmente, el ciclo se cierra cuando el hombre ingiere carne de cerdo con cisticercos. El cisticerco ingerido, evagina por la acción de las enzimas digestivas y sales biliares, y se ancla a la pared del intestino del hombre en donde se desarrolla como un gusano largo y aplanado de varios metros.

La teniosis-cisticercosis humana y porcina

La teniosis se caracteriza por el alojamiento de la fase adulta de *T. solium* en el intestino del hombre. Esta relación puede mantenerse estable por largos periodos de tiempo (varios meses ó años). Una vez alojada, la *Taenia* absorbe nutrientes del contenido intestinal del huésped a través del sincicio celular del tegumento, los cuales toma por difusión o transporte activo de moléculas orgánicas de bajo peso molecular y probablemente

absorbe también por endocitosis [26]. La teniosis se considera un padecimiento de curso clínico benigno que llega a presentar síntomas como hambre dolorosa, anorexia, indigestión crónica, periodos alternos de diarrea y constipación, síntomas nerviosos de origen tóxico y eosinofilia [174]. Generalmente, el diagnóstico se lleva a cabo con la detección de los proglótidos en tamizados de heces o bien por la observación de huevos en exámenes coproparasitológicos. El parásito puede ser desalojado del intestino del huésped mediante el uso de medicamentos altamente efectivos como la Niclosamida o el Paraziquantel [42, 54]. En algunos casos, la *Taenia* se libera de forma espontánea y en otros se emplean remedios caseros (Teofrasto describió el uso de extractos de raíz de helecho macho hace más de 2000 años) que purgan el sistema digestivo del paciente liberando al parásito. Desafortunadamente en ambos casos no siempre se desecha de forma adecuada lo que puede generar un foco de infección por los huevos contenidos en los segmentos que forman el llamado estróbilo de la *Taenia*. La teniosis es un padecimiento con consecuencias moderadas para el paciente pero que constituye un foco de infección constante ya que la incidencia de cisticercosis porcina y humana alrededor de un teniásico aumenta considerablemente [31, 136].

La cisticercosis es una enfermedad parasitaria que resulta de la ingestión de huevos de la fase adulta de *T. solium*. El hombre al igual que el cerdo puede desarrollar esta enfermedad parasitaria al ingerir estos huevos microscópicos. La cisticercosis humana y porcina se caracteriza por el establecimiento de la fase larvaria de *T. solium* en órganos y tejidos del huésped. Desde el punto de vista clínico, existen dos categorías de pacientes cisticercosos: los asintomáticos y los sintomáticos. Estos últimos a su vez se clasifican en cuatro grupos de acuerdo a la localización del parásito (cisticercosis diseminada, oftalmocisticercosis, neurocisticercosis y cisticercosis mixta) [6, 131]. El huésped puede reaccionar en forma variable al entrar en contacto con el parásito, que al alojarse en diversas zonas del cuerpo, dificulta el reconocimiento de una sintomatología definida. La demostración directa del parásito para el diagnóstico de la cisticercosis por medio de una biopsia, sólo es posible cuando la localización del parásito es subcutánea o muscular. En la localización cerebral, se requieren métodos indirectos como puede ser los estudios radiográfico simples, que resultan útiles cuando los cisticercos están calcificados (Fig. 4), o bien la tomografía axial computada con o sin medio de contraste, o la resonancia magnética nuclear, que descubren tanto parásitos vivos (hipodensos) como calcificados (hiperdensos), y la serología, buscando anticuerpos en contra de antígenos parasitarios, o anticuerpos específicos, en suero o líquido cefalorraquídeo, por medio de hemaglutinación, ELISA [10, 37, 80], entre otros.



FIG. 2. Escólex de un cisticerco de *Taenia solium* evaginado, observado con un microscópio electrónico de barrido (Tomado de Cañedo et al., 1982).

Las manifestaciones y síntomas de la cisticercosis humana varían considerablemente, aunque por lo general se agudizan en casos de neurocisticercosis y van desde cuadros epilépticos a cefalalgia, desordenes mentales e hipertensión endocraneal [162]. Existen también otras formas de cisticercosis como son la cisticercosis ocular y la cisticercosis subcutánea, que pueden ocasionar fiebre y mialgia. Existen casos en los que la respuesta inmune se torna aguda a pesar de un cuadro inicial asintomático, pero también existen casos en los que la respuesta por parte del huésped se revierte de tal forma que los síntomas desaparecen por largos periodos de tiempo e incluso de manera permanente. Los cisticercos alojados en el cerebro pueden llegar a producir la muerte del paciente por hipertensión endocraneal, mientras que los localizados en otras regiones del cuerpo pueden pasar desapercibidos durante largos periodos. Diversos reportes indican que la neurocisticercosis es la principal causa de cuadros convulsivos en el mundo [44, 91, 134, 148]. Por ejemplo, estudios realizados en el Perú sugieren que la cisticercosis humana es la causa del 12% de los desordenes neurológicos y del 20% de los casos de epilepsia en hospitales [47].

La cisticercosis porcina se caracteriza por la infestación de diversos órganos y tejidos del cerdo (tejido muscular, cerebro y lengua principalmente). La infestación generalmente se diagnostica por inspección directa de la lengua o por inspección *post-mortem* de la carne del

cerdo (Fig. 5). En algunos casos la carga parasitaria de los cerdos cisticercosos llega a alcanzar la décima parte del peso corporal del cerdo, lo cual disminuye considerablemente el valor comercial del animal, además de que se convierte en un foco potencial de dispersión de la enfermedad. A pesar de ello, un gran número de cerdos cisticercosos se distribuyen clandestinamente para consumo humano (Fig. 6). En la mayoría de los rastros de nuestro país, los inspectores detectan y eliminan a los cerdos infectados, sin embargo, cuando la infestación es mínima (uno o dos cisticercos en la parte del animal inspeccionada), puede pasar desapercibida en la inspección veterinaria [1].

La importancia de la cisticercosis

Epidemiología de la cisticercosis

La cisticercosis es un problema de salud en México y en otros países subdesarrollados de Latinoamérica, Asia y África [13, 40, 108, 115, 119], e incluso en países desarrollados como Estados Unidos y en varios países europeos en donde el gran flujo de migrantes provenientes de zonas endémicas ha provocado un aumento en la incidencia de esta enfermedad parasitaria [50, 126, 138, 154].

La prevalencia de la cisticercosis humana en países latinoamericanos es difícil de calcular (Cuadro 1), pero se estima que en Latinoamérica alrededor de 75 millones

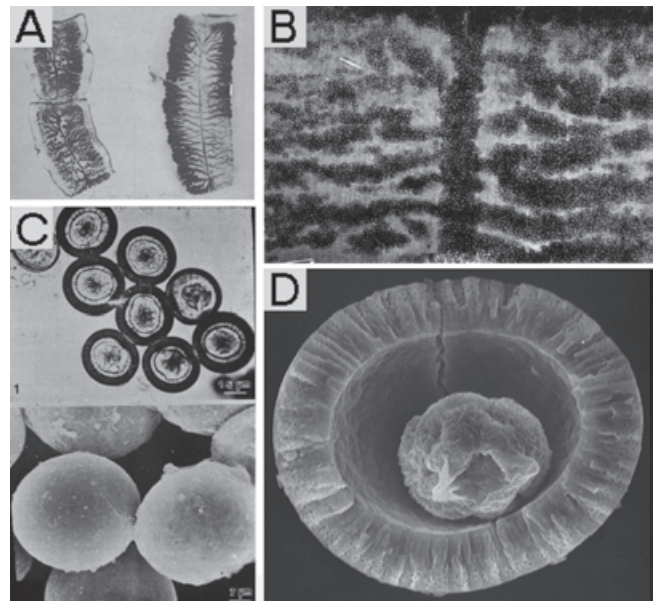


FIG 3. Sistema reproductor de *Taenia solium*. (A) Micrografía de un proglótido grávido de *T. solium*. (B) Micrografía del útero ramificado de un proglótido grávido lleno de huevos de *T. solium*. (C) Huevos de *T. solium* vistos mediante microscopía de luz (arriba) o mediante microscopía electrónica (abajo). (D) Micrografía electrónica de barrido de una oncosfera de *T. solium* rodeada por el embrioforo (Tomada de Lacleite et al., 1982).

CUADRO 1. Seroprevalencia de la cisticercosis humana en varios países de América, Asia y África.

	Presencia de anticuerpos en contra de <i>Taenia solium</i> en sueros obtenidos a partir de muestreos ^a	Referencias
Bolivia	22% en comunidades rurales (37% en cerdos).	[18]
Brasil	0.3% de los pacientes que asisten a hospitales generales. 2.1% en comunidades rurales.	[3] [15]
Chile	1.1% en comunidades rurales.	[5]
Camerún	18.3% en pacientes con cuadro de epilepsia y 14.8% en pacientes sanos.	[34]
China, Corea, Indonesia y Vietnam	0.02 - 12.6% de la población abierta. 0.1 - 6% de tenosis en población abierta.	[119]
Estados Unidos de América	1.3% en una comunidad judía. 10% en trabajadores inmigrantes de Carolina del Norte. 89 hospitalizaciones, 43 nuevos casos diagnosticados y 6 decesos en el estado de Oregon, en el periodo de 1995-2000. 124 decesos en el estado de California (1989-2000).	[106] [24] [161] [147]
Ecuador	4.9% en una región endémica de los Andes.	[125]
Guatemala	10 -17% en dos comunidades rurales.	[48]
India	10.4% de una muestra de pacientes con cuadros de epilepsia.	[100]
México	3.7 -12.2% de la población abierta.	[40]
Mozambique	20.8% en una muestra de niños de la Maputo.	[112]
Occidente de África	1.3 - 2.4% de poblaciones abiertas en Togo y Benin.	[182]
Perú	7.1-26.9% en zonas endémicas.	[45, 46]

^a Los datos reportados se basan en estudios serológicos por inmuno-electro-transferencia y ELISA.

de personas viven en zonas endémicas para cisticercosis y que a proximadamente 400 mil personas presentan síntomas de la enfermedad [12]. En México, los datos más recientes indican que entre el 0.2 y 2.4% de la población abierta padece de tenosis mientras que entre el 3.7 y el 12.2% presentan anticuerpos en contra del cisticerco [40]. Sin embargo, la presencia de anticuerpos en el suero es un indicador de contacto con el parásito pero no necesariamente de infección. Estudios seroepidemiológicos realizados en otros países de Latinoamérica como el Perú, revelan que en las zonas endémicas el porcentaje oscila entre 7.1-26.9% [45], mientras que en Bolivia puede alcanzar hasta el 22% en comunidades rurales [18]. En Asia, países como Vietnam, China, Corea e Indonesia muestran también altos índices de seropositividad, lo que indica un alto grado de exposición al parásito, con porcentajes que oscilan entre 0.02 y 12.6% [119]. Se trata pues de una enfermedad parasitaria de dimensiones globales, que en los últimos años se ha convertido en foco de atención en países desarrollados [46, 126, 135].

Aspectos socio-económicos de la cisticercosis

La cisticercosis tiene consecuencias socioeconómicas pues se trata de un problema de salud pública que además merma la producción de carne ya que al

detectarse un cerdo cisticercoso por inspección veterinaria en los rastros, la carne es decomisada. En nuestro país se presentan condiciones socioeconómicas y hábitos fuertemente arraigados que contribuyen al mantenimiento de la cisticercosis en amplios sectores de la población [175]. Esta enfermedad se agudiza en zonas rurales en donde la falta de higiene y la crianza

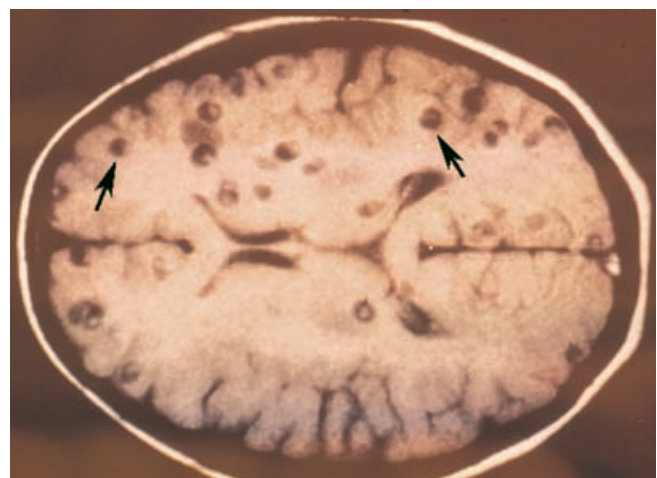


FIG 4. Sección de un cerebro humano con varios cisticercos (ver flecha).

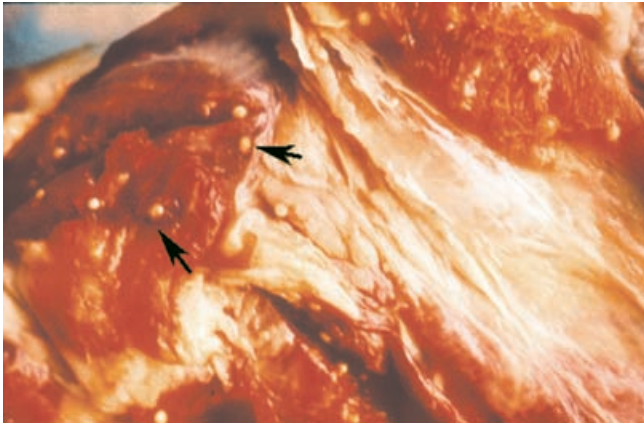


FIG. 5. Carne de cerdo con cisticercos (ver flecha).



FIG. 6. Expendio de carne en un mercado sobre ruedas de México.

rústica de cerdos, favorecen el establecimiento y la continuidad del ciclo biológico de *T. solium* (Fig. 6). En zonas urbanas la incidencia de la cisticercosis es menor, sin embargo las condiciones de insalubridad que persisten en algunos rastros, así como el alto índice de defecación al aire libre mantienen latente la posibilidad de infección.

Estrategias para el control de la cisticercosis

Medidas preventivas contra la cisticercosis

La teniosis-cisticercosis es un problema complejo de salud que incluye aspectos económicos y culturales, además de los biológicos del propio parásito y sus huéspedes. La interrupción de la transmisión de la teniosis-cisticercosis requiere de medidas combinadas que incluyan la educación acerca de la enfermedad entre la población rural [137], la inspección veterinaria en rastros y comunidades, las campañas de desparasitación de teniásicos [136], el manejo adecuado de los excrementos humanos [175], el manejo y procesamiento de la carne de cerdos infectados, así como algunas otras herramientas como el desarrollo de vacunas y/o de huéspedes resistentes que ayuden a controlar la enfermedad.

Algunas de las medidas básicas que se han propuesto para la prevención de la teniosis-cisticercosis en la población en general, tienen que ver principalmente con una buena higiene y con el procesamiento adecuado de las heces fecales (Cuadro 2). Para algunos autores resulta fundamental informar y concientizar a la población sobre el tema de la cisticercosis: recientemente, un grupo de investigadores canadienses se propuso desarrollar material didáctico relacionado con la teniosis-cisticercosis dentro de un sistema multimedia con el propósito de educar a la población mundial sobre esta

enfermedad parasitaria lo cual revela en buena medida la preocupación que también ha despertado esta enfermedad en países desarrollados [133].

Otros autores han propuesto, además de las medidas sanitarias y educativas, el tratamiento masivo de la población principalmente en zonas endémicas como una medida de prevención y erradicación de la teniosis/cisticercosis [118, 136]: un grupo de investigadores del Perú ha propuesto un nuevo protocolo para el tratamiento de teniásicos que consiste en implementar el uso de un agente purgativo además del tratamiento con Niclosamida lo cual facilita que el teniásico arroje a la *Taenia* en su totalidad y en mejores condiciones para su identificación [62].

En las zonas rurales con alta incidencia de teniosis/cisticercosis, la disponibilidad de una vacuna en contra de la cisticercosis porcina, aunque de difícil aplicación, podría convertirse en un factor importante para el control de la enfermedad, tal y como lo sugieren algunos reportes [59].

Mecanismos inmunológicos de la protección en contra de la cisticercosis

Actualmente, poco se sabe sobre los mecanismos involucrados en la protección y destrucción del parásito. Existen, sin embargo, varias observaciones realizadas en modelos experimentales, así como en pacientes y en cerdos cisticercosos que han permitido adelantar posibles explicaciones e hipótesis al respecto.

Los mecanismos de la respuesta inmune del humano y del cerdo que se han propuesto como importantes para la protección y destrucción del cisticerco, dependen de la etapa de desarrollo del parásito. Se ha propuesto que los anticuerpos son importantes para resistir a la infección con huevos de *Ténidos*. Una de las hipótesis más aceptadas a este respecto, sugiere que la destrucción de las oncosferas estaría mediada, en etapas tempranas de la infección con huevos, por anticuerpos y complemento [83, 84].

CUADRO 2. Medidas para la prevención de la cisticercosis^a

Medidas personales
Tratamiento de la teniosis
Lavarse las manos antes de comer
Lavarse las manos antes de preparar alimentos
Lavarse las manos después de ir al baño
No consumir carne con cisticercos
Medidas higiénicas
Evitar el defecar al aire libre; de no ser posible:
Cubrir la materia fecal con cal
Enterar la materia fecal
Quemar la materia fecal
Cocinar suficiente tiempo la carne de cerdo
Congelar la carne de cerdo antes de consumirla
Lavar frutas y verduras lo mejor posible
Medidas porcícolas
Evitar que los cerdos deambulen libremente
Impedir el acceso de los cerdos a la materia fecal
Evitar el acceso de los cerdos a las letrinas
Impedir el acceso de los cerdos a la basura
No defecar en las porquerizas
No comprar ni vender carne de cerdo con cisticercos

^a Tomado de Flisser et al., 1997.

Algunas observaciones hechas en ratas indican que la resistencia natural pasiva en contra de la infección con huevos de *Taenia taeniformis*, transferida de madres a crías durante la lactancia, podría estar mediada por inmunoglobulinas de tipo IgA [176]. Sin embargo, se cree que la resistencia mediada por anticuerpos y complemento, se pierde una vez que las oncosferas desarrollan sus microvellosidades [123]. En estudios más recientes, en donde se vacunaron a ovejas con un antígeno recombinante de oncosfera (45W) en contra la cisticercosis por *Taenia ovis*, se encontró que la disminución de la carga parasitaria posterior al desafío con huevos de *T. ovis*, esta asociada con altos niveles de anticuerpos de tipo IgG1 e IgG2 que se sabe son capaces de activar complemento [128]. Sin embargo, en el caso de las ovejas, no se encontró una co-relación entre los niveles de IgA y la protección inducida por la vacunación con 45W.

Por otra parte, se ha propuesto que algunas células inmunitarias son importantes para la destrucción de las larvas alojadas en los tejidos del huésped cisticercoso. Se ha observado que el parásito puede sobrevivir por largos periodos de tiempo, aún dentro de pacientes cisticercosos con altos niveles de inmunoglobulinas circulantes de tipo G (IgG) dirigidas en contra del parásito. Incluso se han encontrado altos niveles de anticuerpos en el fluido vesicular de cisticercos vivos extraídos de pacientes y cerdos cisticercosos [7]. Estas observaciones sugieren que la respuesta mediada por anticuerpos afecta poco al

estadio larvario de *T. solium*. Además, se sabe que el cisticerco posee mecanismos propios para contrarrestar la respuesta inmune del huésped. En efecto, se han descrito receptores para la porción Fc de los anticuerpos en la superficie del cisticerco que supuestamente promueven la formación de una cubierta de moléculas del huésped en la superficie parasitaria, lo que disminuye su reconocimiento inmune [65]. También se tienen evidencias de que el cisticerco es capaz de desviar, y de modular la respuesta inmune del huésped, liberando ciertos antígenos en la interfase huésped-parásito [149]. En cuanto a la respuesta inmune mediada por células, algunos autores sugieren que la presencia de eosinófilos es relevante en los procesos involucrados en la destrucción de las larvas. Se ha descrito la presencia de varios tipos celulares en la periferia de cisticercos en proceso de destrucción como son eosinófilos, monocitos, linfocitos, macrófagos y células epiteliales. Sin embargo, los eosinófilos parecen jugar un papel principal en la destrucción de las larvas ya que la inmunización protectora induce eosinofilia [102, 104, 111]. Las observaciones directas del proceso de destrucción alrededor del cisticerco, revelan la presencia de eosinófilos en la región más interna de la reacción granulomatosa, en donde estas células degranulan y se infiltran en el tegumento de las larvas. La importancia de los eosinófilos en contra del estadio larvario también ha quedado de manifiesto en la cisticercosis hepática que desarrollan las ratas desafiadas con huevos de *T. taeniformis* en donde, al parecer, contribuyen a la eliminación de las larvas alojadas en el hígado [176]. Otras observaciones realizadas en ratones desafiados con huevos de *T. solium* o *T. saginata* por vía intravenosa, mostraron la presencia de macrófagos, linfocitos y otras células plasmáticas, lo que sugiere que los eosinófilos no confrontan a las larvas en etapas tempranas de su desarrollo, sino que más bien se reclutan en contra de etapas tardías, como ya se ha mencionado que ocurre en el cerdo [103]. En el caso de la cisticercosis murina por *Taenia crassiceps*, se ha encontrado que la protección está asociada a la presencia de linfocitos T de ayuda de tipo 1, junto con niveles altos de interferón(IFN)- γ e interleucina(IL)-12 [155]. En contraste, el desarrollo y la progresión de la infección en los ratones desafiados con cisticercos de *T. crassiceps* está asociada a un perfil de tipo 2, acompañado de niveles altos de interleucina(IL)-4 e interleucina(IL)-10 [156].

Finalmente, cabe mencionar el escaso estudio sobre los posibles mecanismos mediadores de la protección en los trabajos más recientes de vacunación en contra de la cisticercosis porcina, en donde se han alcanzado altos niveles de protección, incluso cercanos al 100%. Las evidencias hasta ahora indican que la respuesta humoral es importante para la protección en

CUADRO 3. Candidatos a vacuna en contra de la cisticercosis

Antígenos	Régimen de vacunación	Tipo de cisticercosis	Protección (%) ^a	Referencias
Cisticercos de <i>T. solium</i>	Extracto crudo	Porcina	82	[101]
			50	[139]
	Extracto crudo	Murina por <i>T. crassiceps</i>	91	[140]
Huevos de <i>T. solium</i>	Extracto crudo	Porcina	91	[51]
			100	[167]
			89	[116]
TSOL18	Producto recombinante	Porcina	99 – 100	[39]
TSOL45	Producto recombinante	Porcina	47 – 97	[39]
Paramiosina	Producto recombinante	Murina por <i>T. crassiceps</i>	52 – 55	[165]
	Vacunación génica	Murina por <i>T. crassiceps</i>	43 – 47	[144]
	Vacunación génica	Porcina	85 – 99	[16]
Tso18	Vacunación génica	Murina por <i>T. crassiceps</i>	57 – 81	[127]
cC1	Vacunación génica	Porcina	53 – 93	[51]
	Producto recombinante		72 – 85	[51]
	Vacunación génica + producto recombinante		73	[171]
Glutation S-Transferasa	Producto recombinante	Murina por <i>T. crassiceps</i>	44 – 90	[169]
KETc7	Vacunación génica	Murina por <i>T. crassiceps</i>	63 – 79	[28]
GK1(Gly 8 -Ser 8 KETc7)	Péptido sintético	Murina por <i>T. crassiceps</i>	85 – 95	[159]
KETc1	Péptido sintético	Murina por <i>T. crassiceps</i>	67 – 100	[158]
KETc12	Péptido sintético	Murina por <i>T. crassiceps</i>	52 – 88	[158]
KETc1, KETc12, GK1(KETc7)	Fago recombinante	Porcina	42 – 95	[93]
	Péptidos sintéticos	Porcina	96	[59]
	Péptidos sintéticos	Murina por <i>T. crassiceps</i>	53 – 100	[158]
45W, 16K, 18K (<i>T. ovis</i>)	Producto recombinante	Porcina	74	[116]
Epítipo PT1 (<i>T. crassiceps</i>)	Fago recombinante	Murina por <i>T. crassiceps</i>	80	[94]

^a El efecto de la vacunación se estimó con o una reducción de la carga parasitaria promedio, con relación a un grupo de animales control no vacunados o inoculados con un placebo según el caso.

contra de la infección con huevos, mientras que algunas células de la respuesta inflamatoria participan en la destrucción de las larvas.

Los resultados de protección más exitosos en contra de la cisticercosis porcina únicamente se han logrado con antígenos estadios específicos. Por ello resulta importante que, en el desarrollo de una vacuna en contra de la cisticercosis, se incluyan componentes protectores tanto en contra de la infección por huevos, así como en contra de las larvas.

Hacia el desarrollo de una vacuna

Actualmente se llevan a cabo grandes esfuerzos por parte de varios grupos para desarrollar una vacuna en contra de la cisticercosis causada por *T. solium* (Cuadro 3). Se han propuesto varias estrategias basadas en el uso de extractos crudos del parásito

[101, 167], productos recombinantes [39, 51, 165], péptidos sintéticos [59], fagos [93] e inmunización génica [51, 127, 144, 145, 171]. Los altos niveles de protección en cerdos presentados por varios de estos grupos, sugieren que el desarrollo de una vacuna en contra de la cisticercosis es posible.

Quizá el prospecto más avanzado de vacuna propone el uso de péptidos sintéticos heterólogos de *T. crassiceps* que en pruebas de vacunación en el campo inducen una disminución de la carga parasitaria casi total [59]. Por otra parte, el uso de antígenos recombinantes de oncosfera en contra de varios céstodos / ténidos entre los que se encuentran *T. ovis*, *T. saginata*, *T. solium*, y *Echinococcus granulosus*, parecen también altamente efectivos [83, 84]. Ensayos recientes de vacunación muestran que cerdos mantenidos en condiciones controladas e inmunizados con el producto recombinante de oncosfera

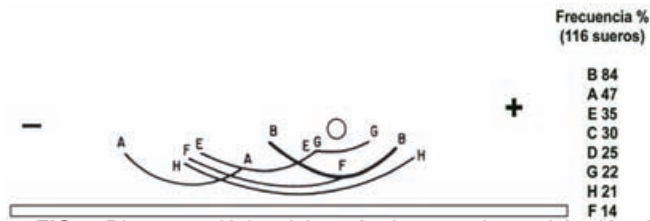


FIG. 7. Diagrama clásico del patrón de arcos de precipitación al enfrentar un extracto crudo de cisticercos y sueros de pacientes neurocisticercosos, mediante técnicas de inmuno-electroforesis (Tomado de Flisser et al., 1986).

denominado TSOL18, producen niveles de protección cercanos al 100% en contra de un reto oral con huevos de *T. solium* [39]. Finalmente, se han reportado niveles de protección también cercanos al 100% en cerdos vacunados génicamente con un antígeno llamado cC1 que se expresa en el estadio larvario [51].

A pesar de que los reportes mencionados arriba son altamente alentadores, el número reducido de animales empleados en estas pruebas de vacunación para evaluar la capacidad protectora de los candidatos a vacuna, debido a las dificultades intrínsecas para llevar a cabo la infección experimental en cerdos con huevos de *T. solium*, también sugiere que la búsqueda de antígenos candidatos podría no estar terminada del todo.

Nuestro grupo ha explorado recientemente el potencial de otro antígeno candidato, como es el AgB o paramiosina de *Taenia solium* (ver Anexos 1, 4 y 5). Sin embargo, nuestros hallazgos contrastan con los resultados reportados en cerdos vacunados génicamente por otro grupo de chinos que reportan niveles de entre 99.5% y 84.9% mediante el uso de un vector plasmídico que codifica para la misma paramiosina [16]. Estos resultados son controvertidos tomando en cuenta que en diversos reportes en

```

atgtctgaatcacacgtcaaaaattctcgtaccatcatacgctgggacttccccagtagctgttcgacttgagagtcgctacgagaactggaggacctgctcgatcttgagcgagatgct 120
M S E S H V K I S R T I I R G T S P S T V R L E S R V R E L E D L L D L E R D A
Cgctccgggctgaacgcaatgcacaagagatgagcattcagctggacaccatggctgaaactcttgacgaattgagtggtacttctctcagacacacagatgctatcgccgtaagga 240
R V R A E R N A N E M S I Q L D T M A E R L D E L S G T S S Q T H D A I R R K D
atggagatctcgaagctgcgcaaggatctggaaaaatgccaacgctgctttcgaactgctgagggcactctgcccgcacaaacacacacatgatctccgagatctcagcgaggttgag 360
M E I S K L R K D L E N A N A A F E T A E A T L R R K H N T M I S S E I S S E V E
aatctgcagaagcagaaggcagggcagagagaaggacaagagccagctcatgcttgaactcgataaaccttcttggtcaactgtagggcgtttaaaggccaaggctgagcgagagcaaa 480
N L Q K Q K G R A E K D K S Q L M L E I D N V L G Q L D G A L K A K A S A E S K
ctggagggttgacagccagctgacgctgtaaggcgtgaccgacgatctcaacgccaatggcgacgctaacctgccaagtcgcttggccgagagaacttcgaattggtt 600
L E G L D S Q L T R L K A L T D D L Q R Q M A D A N S A K S R L A A E N F E L V
cgcgtaatcaggagatgaagcacaagctgctaccttctcgaagacaagggcgcctcttgaaagcagctggtagacctaaacgggcctggaagtagagtcgacgcaatcgctaagc 720
R V N Q E Y E A Q V V T F S K T K A A L E S Q L D D L K R A M D E D A R N R L S
cttcaaacacagttgctgagctgcaaatggactacgacaacctgcaagcagcttacagggaggaagcggcagcgggaaactcgcgcaaccaagttgccaattcaacgcccagatg 840
L Q T Q L S S L Q M D Y D N L Q A R Y E E E A E A A G N L R N Q V A K F N A D M
gctgcctcaagaccgctcttgagagagaacttatggccaagactgaagatttgaagaactcaaacgcaagctgactgttcgacttacgagttgaggaatgagtcgaacatgagcgc 960
A A L K T R L E R E L M A K T E E F E E L K R K L T V R I T E L E D M A E H E R
actgctgccaacaacctggagaagcacaagtttaagctgactcttgagatcaaggatctacagggctgagaaagcagggcgtggcagcagagaatggagagtttaacgcaatggcggaacgag 1180
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 N G E L T H R A N E
gcagagaatcttgccaatgagctgcagcgtcgaatagacgagatgacagtggaactcaaacacctcaactggccaacagcgccttagagggcgaacatgcccctcaagggcaggtc 1300
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
ggtgacctcagcagcagcgaactcgcagccgaaaaccgccaactggcgatcaactgaaggagcgaatcagccctgctgtagcgaatcgtcgcactgacgagattggagggc 1420
G D L T D R I A N L D R E N L R L G D Q L K E T K S A L R D A N R L T D L E A
ctgagcagctgagtgaggcagagcagcaacctgcctctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctcctc 1540
L R S Q L E A E R D N L A S A L H D A E E A L K E M E A K Y V A S Q N A L N H L
aagtcgagatggaacaactgctgctgagagggcagaggaactggagaatctgagaagagcagctgctcagcagatgagggagttgacaaccacatctcagagatggaggttcgcttc 1660
K S E M E Q R L R E L E R E L E L R E L R K S T R T I E E L T T T I S E M E V R F
aagtcgagatgctcgtctgagaagaagtagcagggcgaactcagcagctgagaggtgcaactagcagctggcgaacaagggcgaactcgaactcgaactcgaactcgaactcgaact 1780
K S D M S R L K K K Y E A T I S E L E V Q L D V A N K A N V N L N R E N K T L A
caacgagttcaagagctgcaggtgctggtggaggcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc 1900
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
attcgcagccaactggaactcagtgaccgctcgcagaacgcccagctccgaactcaacagatgc caatggagctatctcggagctcacctatcgggcaactcttaccatgacaaa 2020
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
cgctcrtgaaggcgaattggcgtcagcagggcagctcagatggcggcgaactcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc 2140
R R L E G D I G V M 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
gagctgcgacaggaacaagaaaattacaagcgtgctgagactctcgcgcaagcaacttgagatcgatcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc 2260
E L R Q T E Q E N Y K R A E T L R K Q L E I E I R E I T V K L E E A E A F A T R E
ggtcgcgctggttcaaaagctccagaaatcgggtgagggagcttgagggcagcgtggcaggaagaatctcgcgcgcaaggaagcctcgcgaacgcgcgcaatacagagcgtcaattc 2380
G R M V Q K L Q N R V R E L E A D V D G E I R R A K E A F A N A R K E A F A N A R K E A F A N A R K E A F A N A R K E A F A N A R K E A F A N 2500
gaggaactgcagacacagagcagggatgataaacgcatgatgttgagcttcaagacctgtagacaagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc 2620
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
gtgtctcagctgacgatgagcaactaccgtaagcgcagcaacagatgagggagggagagatgctgctgacatggcggagagacgatcaccatgaagagacaatgggtggaccgggt 2620
V S Q L T M S K Y R K A Q Q I E E A E H R A D M A E R T I I K R T I G G P G
tcccgcgcttctcgtggttgggagatcaacagtgctcctcgtgtaacctgcaaccagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc 2620
S R A V S V V R E I N S V S R G N R A T S I M -
    
```

FIG. 8. Secuencia nucleotídica y de aminoácidos de la paramiosina de *Taenia solium* (Tomado de Landa et al., 1993). El peso molecular teórico de la paramiosina de *T. solium* es de 98,829.07 y su punto isoelectrico es de 5.1.

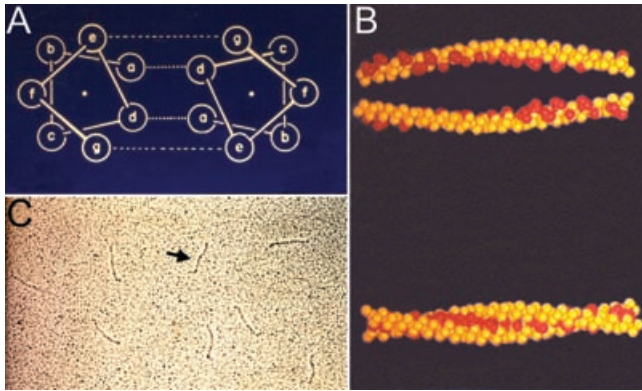


FIG. 9. Estructura de la paramiosina de *Taenia solium*. (A) Representación esquemática de la conformación repetitiva 7/28 que adquieren los aminoácidos en una estructura de alfa-hélice. Los residuos *a, d, e, g* son hidrofóbicos mientras que los residuos *b, c, f, g* son hidrofílicos. (B) Representación esquemática de un homodímero de paramiosina formado por dos moléculas de la proteína, en donde los residuos hidrofóbicos (rojo) de ambas cadenas polipeptídicas (arriba) interactúan entre sí para estabilizar la doble hélice (abajo), mientras que los residuos hidrofílicos (amarillo) quedan expuestos. (C) Micrografía por sobrecolorido en donde se observan los filamentos de paramiosina (ver flecha) (Cortesía de Cohen C.).

modelos experimentales de esquistosomiasis y filariasis, además de los nuestros en el modelo murino de cisticercosis por *T. crassiceps* en donde se ha evaluado la capacidad protectora de la paramiosina, se han encontrado niveles de protección que oscilan entre el 40 y el 60%.

En varios de los reportes de vacunación en donde se reportan niveles altos de protección, existe un porcentaje de cisticercos que logran establecerse, lo cual en condiciones de campo podrían mantener la transmisión del parásito. Por ello, pensamos que una vacuna efectiva en contra de la cisticercosis debiera basarse en un complejo de varios antígenos, tanto de oncosfera como del estadio larvario, que permita inducir un efecto tanto profiláctico como terapéutico.

Antecedentes del proyecto

Esta tesis doctoral presenta algunos avances hacia el desarrollo de una vacuna en contra de la cisticercosis murina y porcina, basada principalmente en la paramiosina de *Taenia solium*. A continuación se describen los aspectos relevantes de la paramiosina como candidato a vacuna, así como los relativos al modelo experimental de cisticercosis utilizado en las pruebas de vacunación. También se describen las bases de la inmunización génica y el porque resulta una estrategia atractiva para el desarrollo de vacunas de uso veterinario.

El Antígeno B o paramiosina de *Taenia solium*

La paramiosina de *T. solium* es sin duda el antígeno mejor caracterizado de este parásito. Originalmente, se describió en pruebas serológicas como uno de los antígenos de *T. solium* que los anticuerpos de pacientes con neurocisticercosis reconocen con más frecuencia [43]. El nombre de antígeno B proviene de ensayos clásicos de inmunoelectroforesis, realizados hace varias décadas, en los que aparecía frecuentemente como un arco de precipitación denominado B, cuando se reaccionaban un extracto crudo del parásito con anticuerpos de pacientes cisticercosos (Fig. 7).

La primera evidencia de que el AgB correspondía a la paramiosina de *T. solium* provino de secuencias parciales de aminoácidos e identidad inmunológica [71]. El cDNA de la paramiosina o AgB de *T. solium* se aisló y caracterizó a partir de una biblioteca de cDNA de cisticercos [78]. La secuencia de aminoácidos deducida a partir de la secuencia nucleotídica codifica una proteína de 863 residuos de aminoácidos (Fig. 8), que tiene una identidad del 75% con la paramiosina del tremátodo *Schistosoma mansoni* caracterizada también por nuestro propio grupo, así como un 35% con paramiosinas de nemátodos como *Caenorhabditis elegans* y *Diraphilaria immitis* [70]. Estos resultados demostraron que el AgB es la paramiosina de la *T. solium* (TPmy), por lo que en lo sucesivo se hará referencia al AgB como la paramiosina.

Cabe mencionar que nuestro grupo describió recientemente la estructura del gen de la paramiosina de *T. solium* que contiene 13 intrones delimitados por señales de *splicing* convencionales [163]. La comparación entre los genes de las paramiosinas de *T. solium*, de *Drosophila melanogaster* y de *Caenorhabditis elegans*, no reveló, a diferencia de otras

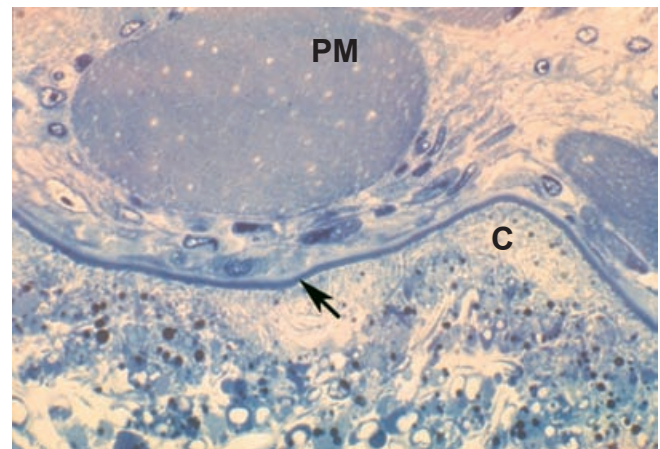


FIG. 10. Micrografía de un cisticercos alojado en el tejido músculo-esquelético de un cerdo cisticercoso. En la parte superior de la interfase huésped-parásito (ver flecha) se observan los paquetes musculares del cerdo (PM) y en la parte inferior al cisticercos (C). Se observa un escaso infiltrado inflamatorio en la periferia de la interfase huésped-parásito (Cortesía de Lactette JP.).

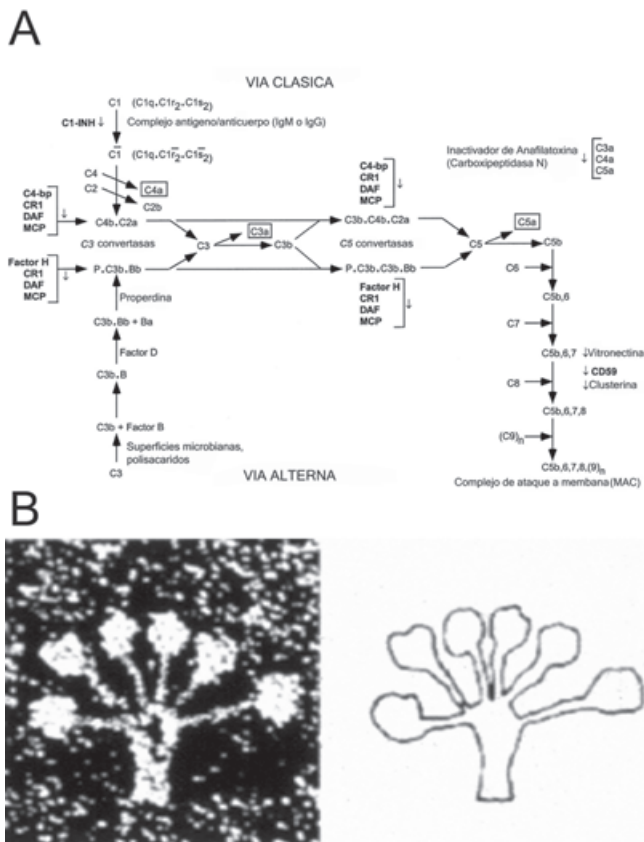


FIG . 11. Cascada del complemento. (A) Representación esquemática de eventos de las vías clásica y alterna del complemento. La vía clásica del complemento es activada por complejos inmunes formados entre antígenos e inmunoglobulinas del isotipo IgM o IgG . La vía alterna es activada por superficies microbianas y lipopolisacáridos complejos (pared celular de levaduras, endotoxinas, partículas virales). En ambas cascadas del complemento, C3 es convertido a C3b por las C3 convertasas, mientras que en la vía clásica, C5 es convertido a C5b por las C5 convertasas. Durante los diversos procesos enzimáticos que ocurren a lo largo de la cascada del complemento, se producen tres anafilatoxinas que son C3a, C4a y C5a. El complejo de ataque a membrana (MAC) es formado por la unión secuencial de C5b a C6, C7, C8 y C9. Ambas cascadas están finamente reguladas por proteínas solubles en circulación (inhibidor de C1, C4bp, factor H, vitronectina, clusterina), así como por proteínas acopladas a la membrana celular (CR1, DAF, MCP, CD59). Las anafilatoxinas son inactivadas por la N-carboxipeptidasa. (información tomada de Makrides et al., 1998). (B) Micrografía electrónica de barrido (izq.) y representación esquemática (der.) del C1q que es el primer subcomponente de la cascada del complemento. El C1q está formado por un tallo central que tiene una estructura colagenoide, del cual se desprenden seis brazos fibrilares. Cada uno de los brazos fibrilares tiene una cabeza globular que se une a la porción Fc de los anticuerpos para fijar al complemento.

existan mini-paramiosinas como en el caso de *D. melanogaster*.

La TPmy es una proteína de 98 kDa con alto contenido de aminoácidos polares y una estructura secundaria de alfa-hélice en más de un 95% de la secuencia de aminoácidos. Esta característica resulta en la formación de homodímeros super-enrollados (Fig. 9) [25]. La TPmy forma parte del músculo liso de los invertebrados y está relacionada con la propiedad de estos músculos de mantener la contracción sin gasto energético. La TPmy es capaz de unirse a la colágena, lo cual permitió su purificación a partir de extractos crudos de cisticercos, a través de un sencillo procedimiento de afinidad [72]. Debido a que la TPmy inhibe la cascada del complemento [70], se le ha relacionado con la pobre respuesta inflamatoria que se observa alrededor de los cisticercos alojados en el tejido muscular del cerdo (Fig.10). Se ha demostrado que la TPmy se une específicamente con el C1q que es uno de los tres subcomponentes del C1 (Fig. 11) [70]. El C1q se compone de 18 cadenas polipeptídicas que forman seis cabezas globulares, unidas entre sí por brazos fibrilares que forman un tallo central. Los brazos fibrilares y el tallo central tienen una estructura colagénica y cada cabeza globular se une al dominio Fc de los anticuerpos [122]. Puesto que la TPmy es capaz de unirse a la colágena, ello sugiere que la interacción con el C1q se lleva a cabo a través de su región colagénica. Los ensayos de correlación estructura-función con fragmentos recombinantes y péptidos sintéticos, diseñados a partir de la secuencia codificadora de TPmy, revelaron que la región mínima que se une al C1q e inhibe la cascada del complemento incluye los primeros 50 aminoácidos de su extremo amino terminal (resultados no publicados).

Puesto que durante la activación de la cascada del complemento se producen varias anafilatoxinas mediadoras de inflamación (C3a, C4a y C5a), nuestro grupo ha propuesto que la TPmy que secreta/excreta el cisticercos impide la activación de la cascada del complemento en la vecindad del parásito. Nuestro grupo también ha propuesto que la TPmy inhibe la producción de mediadores complementarios de inflamación en la interfase huésped-cisticercos y que desempeña un papel inmuno-modulador de la respuesta del huésped al disminuir el reclutamiento de células en la interfase para evitar la confrontación con su huésped humano o porcino. [70, 73].

Un punto sin resolver es el mecanismo por el cual, una proteína supuestamente muscular como la TPmy, se secreta hacia la interfase huésped-parásito para bloquear la cascada del complemento como una posible estrategia de evasión inmune [70, 71]. Al respecto, distintos estudios de inmunolocalización en *S. mansoni* y *S. japonicum*, además de los realizados en *T. solium*, han demostrado más allá de dudas la presencia de paramiosina en estructuras tegumentarias. Por lo

proteínas musculares, una organización de exones/intrones conservada. Tampoco se encontraron evidencias de sitios de *splicing* alternativo, lo cual excluye en el caso de *T. solium*, la posibilidad de que

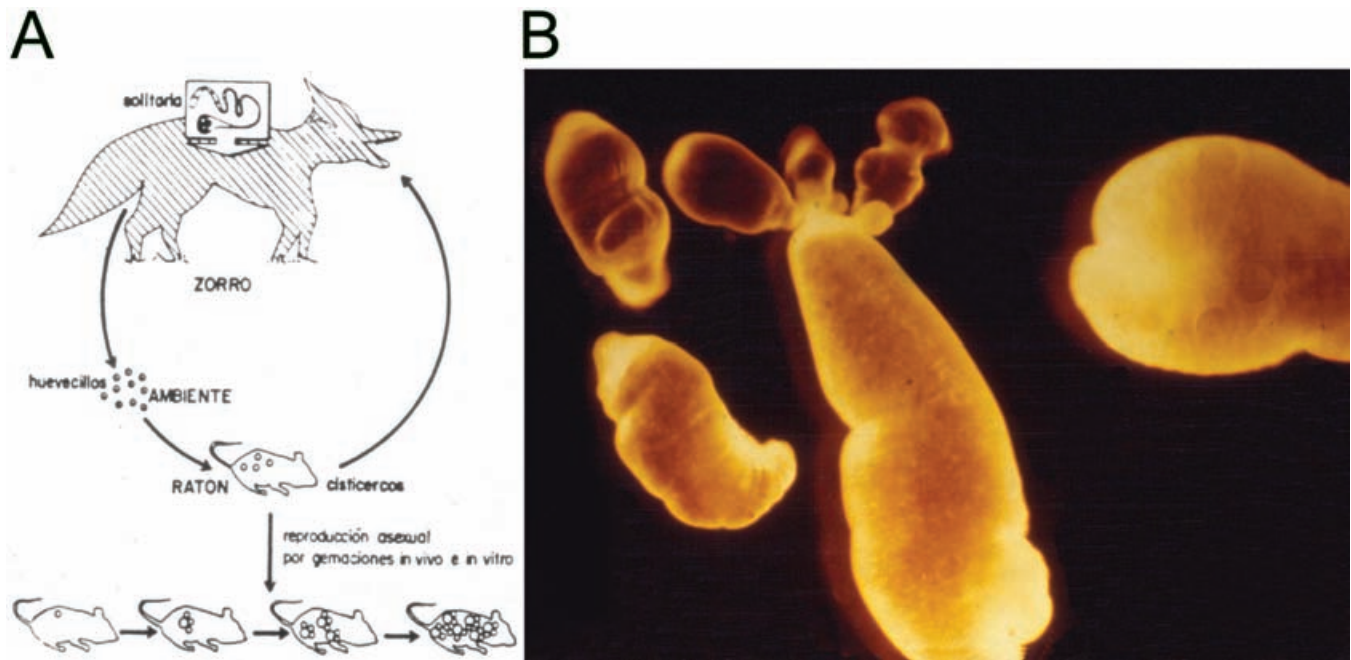


FIG. 12. Ciclo de vida de *Taenia crassiceps*. (A) El zorro es el huésped definitivo del estadio adulto de *T. crassiceps*. El ratón es el huésped intermediario del estadio larvario. Los cisticercos de *T. crassiceps* son capaces de proliferar en forma asexual, por gemación. (B) Cisticercos de *Taenia crassiceps* observados por microscopia de luz. Se observa algunas gemas de cisticercos en proceso de reproducción.

anterior, la TPmy es un candidato para el desarrollo de una vacuna en contra de la cisticercosis. Más adelante se muestra que la respuesta humoral de los ratones y de los humanos en contra de la paramiosina está casi totalmente dirigida hacia el extremo carboxilo, mientras que en individuos sanos que habitan las mismas regiones endémicas, se muestra una fuerte respuesta humoral y celular en contra del extremo amino terminal (ver Resultados). La hipótesis inicial del proyecto de vacunación es que si se genera una respuesta inmune en contra del extremo amino de la TPmy podríamos obtener niveles importantes de protección en contra de la cisticercosis.

Otros grupos han propuesto a las paramiosinas como antígenos candidatos a vacuna en contra de la esquistosomiasis (mansoni y japónica) y varias filariosis [96, 120, 153, 181]. Por ejemplo, en algunos de estos reportes se ha podido mostrar que la inmunización de ratones con paramiosina confiere niveles de protección de 62-86% en contra de un desafío con cercarias en el modelo murino de esquistosomiasis. Algunos de estos autores han mostrado que dicha protección se acompaña por una respuesta asociada a un perfil de tipo Th1 en donde los anticuerpos anti-paramiosina son capaces de mediar citotoxicidad *in vitro*. Estudios menos recientes revelaron que los anticuerpos monoclonales IgE anti-paramiosina de *S. japonicum* inducen protección en contra de la esquistosomiasis murina, además de que reaccionan por *western blot* con otras bandas

supuestamente diferentes a la paramiosina [67]. Sin embargo al analizar los patrones de bandeo de estos investigadores, queda claro que se trata de dímeros de paramiosina o de productos de degradación. En un reporte más reciente los autores caracterizan un epítipo protector de esa paramiosina entre los aminoácidos Glu 301 hasta Ala 413; epítipo común a las paramiosinas de *S. mansoni* y de *T. solium* [110].

El modelo murino de cisticercosis

En los últimos años, se han adoptado una serie de modelos experimentales en animales de laboratorio para el estudio de la teniosis-cisticercosis [66]. El modelo de teniosis en hámsters susceptibles a la infección por vía oral con cisticercos de *T. solium* presenta una gran similitud con la teniosis humana [105, 168]. Los modelos experimentales de cisticercosis murina por *T. taeniaeformis* en ratas [8, 124] o por *T. crassiceps* en ratones (Fig. 12), [56] permiten el estudio de esta enfermedad parasitaria, así como de los efectos curativos y preventivos de fármacos o vacunas con relativa facilidad. Debido a las dificultades que presentan los ensayos de protección en cerdos, el uso del modelo experimental de cisticercosis murina por *T. crassiceps* representa una alternativa para evaluar el potencial inmuno-protector de candidatos a vacuna en contra de la cisticercosis. El modelo murino de cisticercosis por *T. crassiceps* resulta de utilidad para ensayos de protección ya que permite el estudio de un gran número de individuos genéticamente

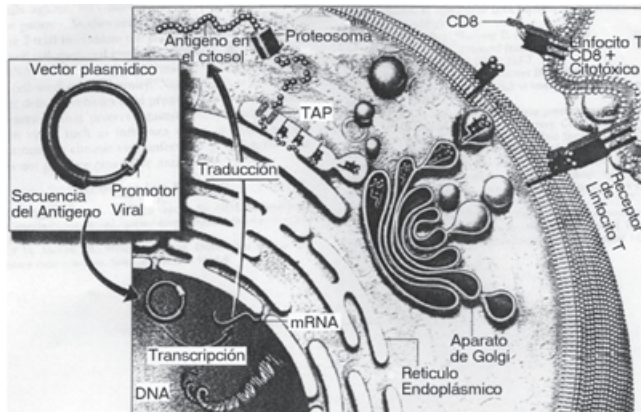


Fig. 13. Representación esquemática de los procesos celulares involucrados durante la expresión in vivo de antígenos administrados por inmunización génica. El DNA plasmídico que contienen la secuencia codificadora del antígeno de interés, alcanza el núcleo de las células y utiliza la maquinaria de síntesis de proteínas para llevar a cabo la expresión antigénica. En ausencia de secuencia secretora, el antígeno administrado por inmunización génica es enviado al citosol para posteriormente ser procesado y presentado a los linfocitos en el contexto de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Cuando el antígeno es expresado como un producto de fusión con una secuencia secretora, este es exportado hacia el espacio extracelular en donde es procesado por otras células presentadoras de antígeno en circulación.

homogéneos, es además de bajo costo y de fácil manejo. Por otro lado, se ha descrito un alto nivel de inmunidad cruzada entre *T. crassiceps* y *T. solium* [140]. Por ejemplo, se han reportado antígenos de *T. solium* que inducen inmunidad protectora en contra de la cisticercosis murina por *T. crassiceps* [140]. También se ha reportado un alto nivel de reconocimiento cruzado por anticuerpos entre ambas especies [68, 79], e incluso se ha propuesto aprovechar este hallazgo para el inmunodiagnóstico de la neurocisticercosis [121]. La cisticercosis murina se induce por inyección intraperitoneal de cisticercos en ratones susceptibles. A diferencia de *T. solium*, los cisticercos de *T. crassiceps* se reproducen asexualmente por gemación (Fig. 12). La posible función inmunomoduladora de la TPmy sugiere que, en caso de que provea protección, estaría dirigida en contra del desarrollo de los cisticercos, y no de su establecimiento en el huésped. En el caso de antígenos específicos de oncosferas, como el de la vacuna contra la cisticercosis por *T. ovis* y *T. solium* [39, 63], la protección se dirige principalmente en contra de las etapas tempranas en el establecimiento de los cisticercos en los órganos y tejidos del huésped [61, 83, 124]. Estas observaciones constituyen una limitación del modelo murino de cisticercosis por *Taenia crassiceps* que solo permite evaluar el efecto inmuno-protector de antígenos candidatos a vacuna en contra del estadio larvario y no en contra de la infección con huevos. La cisticercosis experimental en ratas por *Taenia taeniformis* es más parecida a la cisticercosis humana y porcina en cuanto al

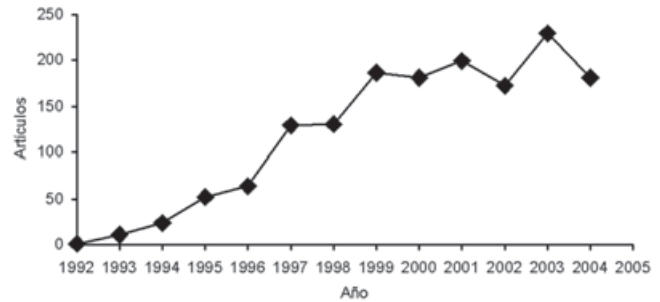


Fig. 14. Número de artículos publicados por año, relativos a estudios de inmunización génica desde su aparición [Tang et al., 1992]. Los números reportados provienen de una búsqueda realizada en enero del 2005 en la base de datos del PubMed (<http://www.ncbi.nih.gov/entrez>).

proceso de infección con huevos, sin embargo se ha utilizado menos debido a la dificultad para producir tenias adultas, que requiere gatos o zorros. En cambio, el modelo murino de cisticercosis por *T. crassiceps* sólo depende de la disponibilidad de ratones y de cisticercos que proliferan rápidamente en el peritoneo de ratones susceptibles (alrededor de 100 cisticercos/ratón/mes) y se mantienen fácilmente por pasajes sucesivos entre ratones.

A pesar de sus limitaciones, el uso del modelo murino de cisticercosis resulta atractivo para los ensayos de protección con antígenos en contra del estadio larvario, ya que permite evaluar el desarrollo y la proliferación de los cisticercos alojados experimentalmente en el peritoneo de ratones previamente inmunizados. Con ello, es posible explorar inicialmente el potencial de antígenos candidatos a vacuna en contra de la cisticercosis por *T. solium*. Posteriormente es necesario realizar los ensayos de vacunación en cerdos para confirmar las observaciones hechas en el modelo murino.

En el presente trabajo de tesis, se evaluó la capacidad protectora de la paramiosina y otros antígenos de *T. solium* en el modelo experimental de cisticercosis murina por *T. crassiceps*, utilizando tanto productos recombinantes como inmunización génica. Posteriormente se llevaron a cabo ensayos iniciales de protección en cerdos para certificar los hallazgos realizados en el modelo de cisticercosis.

La inmunización génica

La inmunización génica es una estrategia reciente de presentación antigénica que consiste en inyectar en los tejidos del huésped, un DNA plasmídico que contiene la secuencia codificadora de uno o varios antígenos de interés (Fig. 13). El DNA plasmídico entra al interior de las células por mecanismos hasta ahora poco conocidos y alcanza el núcleo donde se transcribe, y expresa los antígenos en cuestión [64]. Las construcciones plasmídicas incluyen promotores

CUADRO 4. Vacunas génicas en experimentación

Patógenos	Antígenos	Especie	Referencias
Virus del herpes bovino	Glicoproteína	Genado [†] , Ratón	[19, 180]
Virus de la hepatitis B	Antígeno de cápside Antígeno de superficie	Humanos* Ratón, Conejo, Rata, Chimpancé*	[58, 97, 129, 141, 178]
Virus de la hepatitis C	Nucleocápside	Ratón	[2, 36]
Virus del herpes simples	Glicoproteína B Glicoproteína C Glicoproteína D Glicoproteína I ICP27	Ratón ^{†*}	[57, 81, 113]
VH (SIDA)	Antígeno de superficie gp160 Partículas no-infectivas	Simios*, Ratón	[29, 82, 86, 142, 172]
Virus de la influenza	Hemaglutinina Proteína de Matriz Núcleo-proteína	Simios*, Pollo*, Cerdo [Ⓢ] , Ratón*	[21, 23, 27, 55, 99, 173]
<i>Leishmania mayor</i>	LACK, PSA2, Gp63, LfIF, p20 LIP0	Ratón*	[4, 60, 88, 152]
Virus de la coriomeningitis linfocitaria	Glicoproteína Núcleo-proteína	Ratón* ^{†Ⓢ}	[11, 179]
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Hsp70, Hsp65, ESAT6-Ag85B, Apa, CD80, CD86	Ratón [†]	[30, 38, 95]
<i>Mycoplasma Pulmonis</i>	A7-1, A8-1 Genoteca de expresión	Ratón*	[76, 77]
Virus del Papiloma	E7 p16L1	Ratón*	[33, 132]
<i>Plasmodium yoelii</i>	MSP1 Genoteca de expresión	Ratón [†]	[52, 130]
Virus de la Rabia	Glicoproteína	Ratón* Perro*	[9, 87]
Virus del síndrome de inmunodeficiencia en simios	Env, gag	Ratón Changos	[107, 146]
<i>Esquistosoma japónica</i>	Pmy (Sj97)	Ratón	[181]
<i>Taenia solium</i>	cC1 KETc7 Tso18 TPmy	Cerdo [†] Ratón [†]	[16, 28, 51, 127, 144, 145, 171]

Los símbolos [†] y * se refieren a reportes en donde se han alcanzado niveles de protección parcial o total respectivamente, posterior a un desafío con el agente infeccioso. En algunos casos, se ha reportado una inmunopatología más severa (Ⓢ), posterior al desafío.

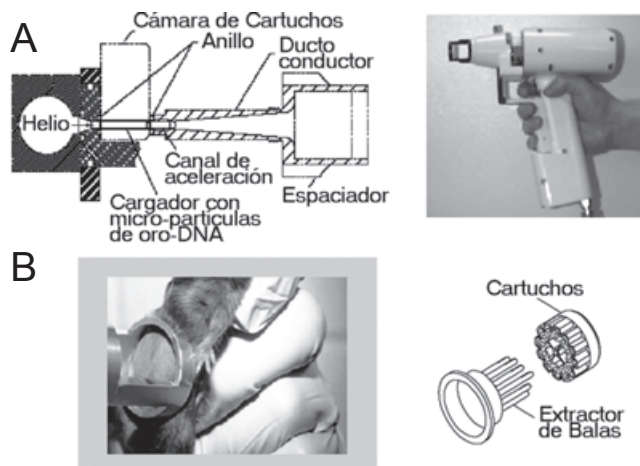


Fig. 15. La inmunización por medio de la pistola génica.

(A) Representación esquemática del principio básico (izq.) de la pistola génica (der.). (B) Los cartuchos de la pistola génica (der.), alojan en el interior de sus orificio, anillos de plástico que constituyen las balas del dispositivo. Estos anillos contienen micro partículas de oro, previamente recubiertas con el DNA plasmídico, adheridas a su superficie interior. Las micro partículas de oro-DNA son disparadas con la pistola génica mediante una descaga de helio, directamente en los tejidos del huésped (izq.).

virales que dirigen la expresión de los genes que a su vez pueden ser expresados como productos de fusión con secuencias secretoras que permiten el transporte de las proteínas hacia el espacio extracelular. La inmunización génica es absolutamente específica en contra del antígeno codificado que se expresa in vivo, lo que resulta en la producción de anticuerpos y en la estimulación de células del sistema inmunitario.

En los últimos años, la inmunización génica ha cobrado fuerza y actualmente se exploran varias rutas de inoculación como son la intramuscular, la subcutánea y la intradérmica (Fig. 14). También se han desarrollado técnicas más sofisticadas como es el uso de la pistola génica (*Gene-Gun*) que es un dispositivo que funciona mediante presión de helio comprimido para expulsar micro partículas de oro recubiertas de DNA, que penetran los tejidos del huésped y alcanzan directamente el núcleo de las células (Fig. 15) [14]. Esta metodología permite reducir la dosis de DNA plasmídico a unos cuantos microgramos (1-6 µg), que son suficientes para lograr una inmunización exitosa en animales de laboratorio y en ganado.

La inmunización génica presenta ventajas para el desarrollo de vacunas con respecto a otros métodos tradicionales como son el uso de extractos o versiones atenuadas de agentes infecciosos, péptidos sintéticos o proteínas recombinantes. Se trata de un inmunógeno relativamente fácil de producir en grandes cantidades. Además, a diferencia de las proteínas, el DNA plasmídico es estable a temperatura ambiente, lo cual permite almacenarlo y transportarlo con facilidad. Otra

de las ventajas que presenta la inmunización génica, es que ofrece versatilidad para orientar el desarrollo de la respuesta inmune mediante la incorporación de otros genes que codifiquen para agentes moduladores como son las interleucinas [90, 114]. El DNA plasmídico no requiere de ser mezclado con vehículos adyuvantes convencionales como pueden ser la saponina o el adyuvante de Freund, ya que únicamente se disuelve en solución salina para ser almacenado y posteriormente inyectado. Existen varios reportes de vacunas génicas en contra de enfermedades infecciosas causadas por virus, bacterias y parásitos con resultados alentadores (Cuadro 4). Varios reportes en modelos animales indican que la inmunización génica induce respuestas de anticuerpos y linfocitos de larga duración, atractivas para el desarrollo de vacunas de uso veterinario, lo cual permite inducir protección a lo largo de la vida económicamente útil del ganado. En opinión de algunos autores su uso en humanos puede estar todavía lejano, ya que aun no se sabe cual es el destino del material genético (DNA plasmídico) inoculado, que podría integrarse al genoma de las células del huésped. El uso de una vacuna génica en contra de la cisticercosis porcina permitiría inducir inmunidad protectora en los cerdos que generalmente se sacrifican al cabo de un año.

Resultados previos

En mi proyecto de tesis de licenciatura realicé ensayos preliminares de protección en contra de la cisticercosis murina por *T. crassiceps* con proteínas recombinantes de TPmy. El objetivo inicial fue determinar si la inmunización de los ratones con productos recombinantes de la TPmy confiere protección en contra de un reto posterior con cisticercos de *T. crassiceps*. Además, se intentó averiguar si había diferencias entre la protección que confieren los distintos fragmentos de la proteína. Puesto que se trata de una proteína filamentosa, la selección de los fragmentos de TPmy que se probaron en los experimentos de protección se basó en una sencilla subdivisión de la proteína en tercios a lo largo de su longitud. Los fragmentos recombinantes de TPmy, correspondientes a los tercios amino, central y carboxilo, se expresaron en cultivos de *Escherichia coli* en cantidades del orden de los miligramos y se purificaron por cromatografía de afinidad (ver Anexo 6, Fig. 1). Una descripción más detallada de nuestros hallazgos relativos a la caracterización de la respuesta inmune protectora inducida por la paramiosina se encuentran en los Anexos 5 y 6.

OBJETIVO DEL PROYECTO

El objetivo de esta tesis es determinar el potencial protector de la paramiosina de *Taenia solium* para el desarrollo de una vacuna en contra de la cisticercosis murina y porcina. Para ello se probaron tanto productos recombinantes como plásmidos para vacunación génica, en ensayos de vacunación en ratones y cerdos.

Objetivos particulares

1. Producción de antígenos recombinantes de *T. solium* a partir de cultivos bacterianos transformados con vectores de expresión procarionte.
2. Ensayos de vacunación con antígenos recombinantes de *T. solium* en el modelo de cisticercosis por *T. crassiceps* en el ratón.
3. Caracterización del perfil de la respuesta inmune protectora en ratones vacunados con antígenos recombinantes de *T. solium*.
4. Desarrollo de vectores plasmídicos para vacunación génica basada en antígenos de *T. solium* de probada capacidad protectora.
5. Desarrollo de vectores plasmídicos para vacunación génica que contengan la secuencia codificadora de citocinas asociadas a la respuesta inmune protectora.
6. Optimización de las construcciones plasmídicas para vacunación génica mediante el desarrollo de genes sintéticos con el uso de codones adaptado para mamífero.
7. Pruebas de expresión *in vitro* con células de mamífero transfectadas con los vectores para vacunación génica.
8. Efecto *in vivo* de las modificaciones en el uso de codones de las secuencias codificadoras de los antígenos protectores de *T. solium*.
9. Caracterización de la respuesta inmune celular y por anticuerpos en ratones vacunados génicamente.
10. Ensayos de vacunación génica en contra de la cisticercosis murina y porcina.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ensayos de vacunación contra la cisticercosis murina

Animales

Se utilizaron ratones Balb/c hembras de 6-8 semanas de edad para los ensayos de vacunación con productos recombinantes, o bien de 8-10 semanas de edad para los ensayos de vacunación génica. Los

animales se mantuvieron con agua y alimento comercial *ad libitum*, en las instalaciones del bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.

Inmunizaciones

El diseño de los ensayos de vacunación con productos recombinantes se encuentran descritos en la sección de Materiales y Métodos del Anexo 5. En el caso de los ensayos de vacunación génica, ver los Anexos 1 y 4.

Sangrado de los ratones

Los ratones se irradiaron con una lámpara de luz infrarroja de 250 *watts* durante aprox. 2 minutos. Posteriormente, se realizó un ligero corte transversal con un bisturí, en el último tercio de la cola (Fig. 16). Este procedimiento permitió colectar alrededor de 0.5 ml de sangre cada vez. La sangre se dejó coagular a 37°C, durante 30 min, con un palillo de madera inmerso en la sangre. Se descartó el coagulo adherido al palillo de madera, se incubó 2h a 4°C y se centrifugó la fracción restante a 10,000 *g* durante 10 min. El sobrenadante obtenido se almacenó a -20°C por espacio de 4-8 semanas o a -70°C por tiempo indefinido [53].

Infección experimental con Taenia crassiceps

Los animales se desafiaron por vía intraperitoneal con cisticercos de *T. crassiceps*, tal y como se describe en los Anexos 1, 4 y 5.

Ensayos de vacunación contra la cisticercosis porcina

Los ensayos de vacunación en cerdos que se reportan en esta tesis, se realizaron en colaboración con el grupo de la Dra. Ana Flisser, que en los últimos años ha establecido condiciones adecuadas para llevar a cabo estos experimentos. El primer experimento se llevó a cabo en las instalaciones del Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (INDRE) y el segundo en las instalaciones del Hospital General "Dr. Manuel Gea González". Nuestro grupo produjo y administró a los cerdos los inmunógenos basados en la paramiosina de *T. solium*. El mantenimiento de los cerdos, así como los sangrados y el desafío con huevos de *T. solium*, corrieron a cargo del grupo de la Dra. Flisser. Las necropsias de los cerdos para evaluar el efecto de la vacunación sobre la carga parasitaria de los animales, corrieron a cargo de nuestro grupo.

Animales

Se adquirieron cerdos de 2 meses de edad de la raza *York* provenientes de granjas libres de

cisticercosis, que fueron alojados en las instalaciones previstas, con alimento comercial y agua *ad libitum*. Se formaron grupos de 5-7 cerdos que se identificaron con aretes metálicos. En el experimento de vacunación con paramiosina recombinante, se formaron dos grupos: el grupo experimental inmunizado con la paramiosina y un grupo de animales control, a los cuales únicamente se les inyectó el adyuvante. En el experimento de la vacunación génica, se formaron tres grupos: el grupo experimental vacunado génicamente con paramiosina, y dos grupos de animales control a los que se les administró el vector vacío o bien únicamente solución salina.

Inmunizaciones

Los cerdos se inmunizaron 3 veces por vía intramuscular (i.m.), en los cuartos traseros, a intervalos de 15 días. Se administró una dosis de 250 μ g de la proteína recombinante adsorbida a 3 mg de alúmina (Ver sección sobre *Preparación de inmunógenos recombinantes*). La dosis de DNA plasmídico fue de 500 μ g disueltos 1 ml de solución salina al 0.9%.

Sangrados

Se tomaron muestras de sangre de los cerdos por punción arterial, antes de las inmunizaciones (suero pre-inmune) y después de ellas, a los 14, 27, 41 y 138 días de vacunados génicamente.

Infección experimental con Taenia solium

Los cerdos fueron desafiados por vía oral con 10,000 o 25,000 huevos de *T. solium* (Experimento de la vacunación génica y Experimento con paramiosina recombinante, respectivamente), tal y como se ha descrito [116]. En breve, los huevos de *T. solium* se mantuvieron a 4°C en una solución salina de fosfatos (PBS) con 1000 U de penicilina G, 1 mg de sulfato de estreptomycin y 0.25 mg de amfotericina B / ml. Los huevos se resuspendieron en PBS y se metieron en cápsulas de gelatina. Posteriormente, las cápsulas se introdujeron en el estómago de cada cerdo, utilizando una manguera de plástico.

Necropsias

Después de 6-8 semanas, los cerdos se desafiaron con huevos de *T. solium*, se sacrificaron a los animales de acuerdo a procedimientos permitidos. Se inspeccionó el tejido muscular, incluyendo la lengua y el corazón, mediante cortes delgados con bisturí de aprox. 1mm de espesor.

Producción de proteínas recombinantes

Vectores para expresión bacteriana

El desarrollo de los vectores para la expresión bacteriana de productos recombinantes de paramiosina y de calreticulina de *T. solium*, se encuentra descrito en los Anexos 6 y 3 respectivamente. En el caso de la construcción plasmídica para la producción de TSOL18 recombinante (recTSOL18), se utilizó el mismo procedimiento descrito en el Anexo 6, con los siguientes oligonucleótidos:

5'GGGAATTCATGGTTTGTCCGGTTCGCTC'3;
5'GGGAAGCTTTCAACTGCGTCCGACCTT'3.

Para la amplificación y la clonación del gen de TSOL18, se utilizó como templado una secuencia codificadora que se sintetizó de novo mediante las técnicas de *Gene Building*, descritas más adelante en la sección sobre Construcción de genes sintéticos.

Expresión y Purificación de las proteínas recombinantes

Los procedimientos para la expresión y la purificación de antígenos recombinantes de *T. solium*, a partir de cultivos bacterianos transformados con vectores plasmídicos, se encuentran descritos en los Anexos 3 y 6. En el caso de la paramiosina y sus fragmentos recombinantes, ver Anexos 6. En el caso de la Calreticulina, el procedimiento incluye un paso de precipitación por punto iso-eléctrico, tal y como se describe en el Anexo 3. El antígeno TSOL18 se purificó siguiendo el mismo procedimiento descrito para los productos recombinantes de la paramiosina de *T. solium*.

Desarrollo de vectores plasmídicos para inmunización génica

Vectores

La primera generación de vectores plasmídicos para la inmunización génica se basaron en los vectores pcDNA3 (Invitrogen) y pTC-Ova (desarrollado y donado por Shoshana Levy de la Universidad de Stanford, CA, USA) [90]. La secuencia codificadora del fragmento VW2-1 de la paramiosina de *T. solium*, se amplificó por PCR, y se clonó en el pcDNA3, utilizando los siguientes oligonucleótidos:

5'GGGAAGCTTAATGTCTGAATCACACGTC'3;
5'GGGAATTC AATTTCCGGCTGCCTCG'3.

Las construcciones basadas en el pTC se describen en el Anexo 4. Para inducir la expresión in vivo de la interleucina (IL)-12 en ratones, se utilizaron los plásmidos pEDP35 y pEDP40 donados por S. Wolf de *Genetics Institute*, Cambridge, MA, USA, que expresan las subunidades P35 y P40 de la IL-12 respectivamente.

La segunda generación de construcciones plasmídicas se basaron en el pCMV-tPA donado por

S.A. Johnston del *Center for Biomedical Inventions*, en la Universidad del Suroeste de Texas, USA. Esta parte está descrita en el Anexo 1. Todas las construcciones desarrolladas se confirmaron por análisis de restricción y secuenciación, antes de ser producidas a gran escala (alrededor de 10 mg por plásmido), a partir de cultivos de bacterias *Escherichia coli* de la cepa XL1-blue que fueron transformadas con los plásmidos arriba descritos. Para aislar gran cantidad de DNA plasmídico libre de endotoxinas se utilizó un kit comercial (Qiagen).

Construcción de genes sintéticos

El uso en las preferencias de codones de los genes que codifican para los antígenos de *Taenia solium* fueron adaptados al uso de codones típico de mamíferos, siguiendo los procedimientos de síntesis de genes antes descritos [150]. Brevemente, se utilizó el programa de computadora DNABuilder (<http://cbi.swmed.edu/computation/cbu>) para generar un juego de oligonucleótidos (sesentámeros) que se sobrepone en forma sucesiva, dejando huecos de 20 nucleótidos. Los oligonucleótidos fueron ensamblados mediante técnicas de PCR e insertados en el vector pCMV utilizando el método de clonación UDG [143]. Los *primers* utilizados para la clonación UDG contienen unas secuencias especiales en los extremos 5'. En el caso del *primer forward*, la secuencia adicional es 5'-ATAUCGAUAUCGAUGAU-3' y en el caso del *primer reverse*, la secuencia adicional es 5'-AGUGAUCGAUCGATUACU-3'. Para preparar el vector pCMV para la clonación UDG se le dirigió con las enzimas de restricción BglIII y XmaI, y posteriormente se le ligaron los siguientes oligonucleótidos a los extremos cohesivos de cuatro bases resultantes antes: 5'-GATCATATCGATATCGATGAT-3' y 5'-CCGGAGTGATCGATGCATTACT-3'. Los genes sintéticos amplificados con los primers para clonación UDG se insertaron en el vector pCMV mezclando 50 ng del vector preparado con 10 ng del producto de PCR, en presencia de 0.5 unidades de uracil DNA glicosilasa (New England Biolabs), 10 mM Tris-HCl, pH 7.9, 10 mM MgCl₂, 50 mM NaCl y 1 mM ditiotritol, en un volumen final de 10 µl. La mezcla de reacción se incubó a 37°C durante 30 minutos, y se utilizó 1 µl para transformar bacterias *Escherichia coli* DH10B competentes (ver sección sobre Transformación de bacterias). En el caso de la construcción de los genes de citocinas de ratón y de cerdo, no se alteraron las preferencias en el uso de los codones, aunque las secuencias sintetizadas fueron distintas debido a que el programa DNABuilder genera mediante una serie de algoritmos en forma aleatoria, un juego de oligonucleótidos compatibles para la PCR.

Análisis de secuencia

La secuenciación del DNA se realizó en la Escuela de Medicina de la Universidad de *Harvard*, el *Center for Biomedical Inventions (University of Texas)* y el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM. Los electroferogramas de la secuenciación (aprox. 400-600 bases por reacción), se analizaron utilizando el programa *Chromas v 2.3* (sitio web: <http://www.technelysium.com.au/index.html>).

Transfección con vectores plasmídicos

Transformación de bacterias

La transformación de bacterias con vectores plasmídicos se llevó a cabo por pulso calórico, utilizando células ultra-competentes preparadas con cloruro de rubidio [35]. Brevemente, las células competentes se prepararon inoculando un cultivo de 10 ml de medio *Luria-Bertani* (LB; 1% de triptona, 0.5% de extracto de levadura, 1% de NaCl, pH 7.0) con bacterias *E. coli* XL1-blue, que se incubó durante toda la noche (aprox. 16hrs.) a 37°C, con agitación a 250 rpm. Al día siguiente, se diluyó el cultivo (1:100) en 100 ml de medio LB y se incubó a 37°C con agitación, hasta alcanzar una densidad óptica de aprox. 0.5 a 600nm de longitud de onda. El cultivo se incubó en hielo durante 10 min. y luego se obtuvo la biomasa por centrifugación a 4,000 rpm, durante 10 min. a 4°C. Se resuspendieron las bacterias en 30 ml de una solución fría de TFB-1 (acetato de potasio 30mM, MnCl 50mM, RbCl 100mM, CaCl₂ 10mM, 15% de glicerol, y esterilización por filtración a través de una membrana de 22 µm) y se incubaron en hielo durante 30 min. Se centrifugó a 4,000 rpm durante 10 min. a 4°C y se resuspendió suavemente la pastilla de células en 4 ml de una solución fría de TFB-II (MOPS 10mM, CaCl₂ 75mM, RbCl 10mM, 15% de glicerol, y esterilización por filtración a través de una membrana de 22 µm). Se prepararon alícuotas de 100 µl de células competentes que fueron congeladas súbitamente en nitrógeno líquido, para después almacenarlas inmediatamente a -70°C.

Las transformaciones se llevaron a cabo descongelando alícuotas de células competentes en hielo durante aproximadamente 5 minutos. Se agregaron 10-100ng de DNA plasmídico (o reacción de ligación)/alícuota de células y se incubó a 4°C durante 30 min. Se aplicó a las células un pulso de calor a 42°C durante 45-60 segundos y se colocaron en hielo durante 2 min. Se agregó 1 ml de medio LB a cada alícuota de células y se incubó a 37°C durante 45 min. con agitación a 250 rpm. Se sembraron 50-100 µl de cada suspensión de células competentes en cajas de LB-agar suplementado con ampicilina (agar, 15g/lit de LB; ampicilina, 100 µg/ml). La eficiencia de

transformación para cada lote de células competentes se determinó en base a las unidades formadoras de colonias (ufc) por microgramo de DNA, utilizando la siguiente fórmula: [(ufc por caja / ng de DNA x 10³ng/1µg) x dilución final sembrada].

Transfección de células eucariontes in vitro

Una línea de células de ovario de hámster chino (CHO) y otra línea de células de riñón de mono (COS-7) se transfectaron transitoriamente con plásmidos de expresión, utilizando el método comercial *Superfect* (Qiagen), siguiendo las indicaciones del fabricante. Las células se sembraron un día antes de la transfección en cajas de 6 pozos, a una densidad de 0.9 x 10⁵, en medio DMEM (Sigma), previamente suplementado (10% de suero fetal bovino, aminoácidos no esenciales, piruvato, bicarbonato de sodio y antibióticos), de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Las células se cultivaron en una incubadora a 37°C, con humedad a saturación y 5% de CO₂. Al día siguiente, las células se transfectaron con 2 µg/pozo de DNA plasmídico, previamente diluido en medio DMEM suplementado (para los ensayos de inmuno-precipitación por marcaje metabólico, se utilizó DMEM sin suero fetal bovino y libre de metionina), en un volumen final de 150 µl y mezclado con 5 µl del reactivo *Superfect*. Las células se cosecharon a los tiempos indicados para cada experimento.

Expresión funcional in vitro con plásmidos para vacunación génica

Inmuno-precipitación

En el caso de las células COS-7 transfectadas, se mantuvieron en cultivo durante 48 hrs. y posteriormente se llevó a cabo la inmuno-precipitación, tal y como se describe más adelante para ambos tipos celulares. En el caso de las células CHO, se utilizó marcaje metabólico con metionina marcada con azufre-35 (³⁵S-metionina). Una hora después de la transfección, se agregaron a las células CHO, 10 µCi/pozo de ³⁵S-metionina (Amersham) diluidos en 10 µl de DMEM libre de metionina, y se cultivaron durante 4 hrs. más.

Se recolectaron los sobrenadantes tanto de las células COS-7 como de las CHO por centrifugación a 12,000g durante 5 min. En el caso de las células CHO, los sobrenadantes colectados se incubaron toda la noche a 4°C con 5 µg de un anticuerpo IgG anti-recVW2-1, previamente purificado por cromatografía de afinidad, a partir de un suero hiper-inmune [165] utilizando una columna comercial de proteína G (*HiTrap protein G*, Amersham), de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Se agregaron a los sobrenadantes de las células CHO 100 µl de proteína G acoplada a

esferas de sefarosa (Amersham) y se incubó a 4°C durante 2 hrs. En el caso de los sobrenadantes colectados de las células COS-7, se incubaron toda la noche a 4°C con el anticuerpo IgG anti-recVW2-1, previamente acoplado covalentemente a esferas de sefarosa (CNBr-activated Sepharose 4B, Amersham), siguiendo las indicaciones del fabricante. Los complejos inmunes se recolectaron por centrifugación a 12,000g durante 5 min. a 4°C y las esferas de sefarosa se lavaron tres veces con 50mM Tris-HCl, pH 7.5, 150mM NaCl, 5mM EDTA y 0.1% v/v Triton X-100. Las esferas de sefarosa se resuspendieron en solución amortiguadora de muestra para electroforesis en poli(acrilamida) y se calentaron las muestras a 100°C durante 3 min., para después centrifugar con antes. Los complejos inmunes presentes en los sobrenadantes se analizaron por electroforesis en geles de poli(acrilamida) (PAGE), tal y como se describe más adelante en Métodos Misceláneos.

En el caso de los sobrenadantes provenientes de las células COS-7 se determinó, por inmune electrotransferencia, la presencia de los antígenos cuya secuencia codificadora fue insertada en los vectores de expresión (ver sección sobre Inmuno-electrotransferencia).

En el caso de las células CHO, los geles fueron preparados para fluorografía con dimetil sulfóxido (DMSO) y 22% p/v de polióxido de fenileno (PPO) en DMSO, secados y expuestos a una pantalla fotosensible, para después ser analizados en un sistema de imágenes *Typhoon* (Amersham).

Tinción intracelular

Para los ensayos de tinción intracelular de VW2-1 por inmune-fluorescencia, se transfectaron transitoriamente células CHO (ver sección Transfección de células eucariontes) y se cultivaron durante 12 hrs. en medio de cultivo DMEM suplementado; se agregaron 3µl del reactivo *BD GolgiPlug* (Pharmingen) y se cultivaron las células durante otras 4 hrs. Se cosecharon las células y se fijaron incubándolas con 250 µl del reactivo *BD Cytofix/Cytoperm* (Pharmingen) durante 20 min. a 4°C. Se lavaron las células dos veces con 1ml de la solución *Perm/Wash* (Pharmingen), se centrifugaron y se resuspendieron en 50 µl de solución *BD Perm/Wash* adicionada con 1µg de una fracción purificada de IgG de ratón anti-recVW2-1 (ver Cuantificación de anticuerpos específicos) y se incubaron durante 30 min. a 4°C. Se lavaron las células y se incubaron con un anticuerpo de conejo anti-IgG de ratón (H+L) acoplado a isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Zymed), 30 min. a 4°C en oscuridad. Después de lavar nuevamente, se resuspendieron las células en paraformaldehído al 4%. Varias alícuotas de células fueron montadas en

laminillas protegidas de la luz, observadas y fotografiadas en un microscopio Carl Zeiss AxioShop 40, utilizando los programas de computadora AxioCam MRc y AxioVision 4 (Carl Zeiss Vision, GmbH; 2002-2003, Germany), tal y como se describe en la sección anterior.

Caracterización de la respuesta inmune por anticuerpos

Ensayos de ELISA

El método de ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) permite evaluar cuantitativamente el reconocimiento de las proteínas adheridas a placas de 96 pozos de plástico rígido por los anticuerpos (Costar). La reacción se estima utilizando un anticuerpo secundario (dirigido en contra del primer anticuerpo), acoplado a una enzima (como la peroxidasa) que en presencia del sustrato adecuado da una reacción colorida, que se cuantifica en unidades de densidad óptica, por espectrofotometría. En algunos casos, cuando se dispone de una fracción purificada del anticuerpo problema (específico en contra del antígeno de interés), se puede cuantificar la cantidad en unidades de peso (µg/ml de anticuerpo) de los anticuerpos antígeno-específicos presentes en un suero, utilizando una curva de referencia construida con cantidades conocidas del anticuerpo problema. En los Anexos 1, 4 y 5 se describe a detalle los ensayos de ELISA utilizados en nuestros experimentos.

Isotipos de anticuerpos

El perfil de isotipos de anticuerpos se caracterizó por ELISA, tal y como se describe en los Anexos 1 y 4. En el caso del cerdo, se utilizó el mismo procedimiento, solo que con anticuerpos secundarios, específicos para IgG1 e IgG2 (Serotec) hechos en ratón (isotipo IgG1) y un tercer anticuerpo anti-IgG1 (H+L) de ratón acoplado a peroxidasa (Zymed).

Cuantificación de anticuerpos específicos

Se purificó una fracción de anticuerpos IgG anti-recVW2-1, a partir de los sueros recolectados de ratones vacunados génicamente, utilizando un procedimiento de cromatografía de afinidad en dos etapas. Brevemente, se mezclaron los sueros recolectados y se aplicaron a una columna de proteína G acoplada a sefarosa (*HiTrap Protein G affinity column*, Amersham) siguiendo las instrucciones del fabricante. La fracción purificada de IgG fue subsecuentemente aplicada a otra columna de recVW2-1 acoplada a sefarosa (aprox. 1.5 mg de recVW2-1/ml de peso húmedo de sefarosa) preparada utilizando esferas de sefarosa-CNBr (Amersham),

siguiendo las instrucciones del fabricante. La fracción purificada de IgG anti-recVW2-1 se cuantificó por ensayo de micro-Bradford (ver más adelante), utilizando como proteína de referencia, una fracción comercial de IgG de ratón purificada (Zymed). La cantidad de IgG anti-recVW2-1 presente en los sueros de los ratones se determinó por ELISA, utilizando como referencia una curva estándar construida con cantidades conocidas de la fracción purificada de IgG anti-recVW2-1.

Ensayos de inmuno-localización

Para los ensayos de inmuno-localización de la paramiosina en los tejidos de cisticercos de *T. crassiceps*, se recolectaron larvas de la cavidad peritoneal de ratones infectados durante 2-3 meses, lavados exhaustivamente con una solución amortiguadora de fosfatos (PBS) fría, incluidos en una resina (O.C.T., Miles, Inc., CA, USA), y congelados a -70°C . Se hicieron rebanadas de 14 micras de los cisticercos que posteriormente fueron montadas en laminillas, tratadas previamente con poli-L-lisina (Sigma) de acuerdo a las indicaciones del fabricante, y fijadas con acetona fría durante 10 min. Las laminillas se hidrataron con PBS frío e incubaron con H_2O_2 al 3% durante 10 min. a temp. ambiente, para bloquear la actividad de peroxidasas endógenas. Se lavaron las laminillas con PBS frío durante 5 minutos y se incubaron con un anticuerpo IgG de conejo anti-IgG de ratón (Sigma) diluido 1:100 en PBS-FCS-T (PBS con 5% de suero fetal bovino (Hyclone) y 0.1% de Tritón X-100, pH 7.4) durante 1 hr. a 4°C y después durante 30 min. a 37°C . Después de lavar las laminillas tres veces, se incubaron toda la noche 4°C con una mezcla de los sueros colectados de ratones, 45 días después de la inmunización génica con la construcción pCMV-synVW2-1 o con el vector pCMV, diluidos 1:5000 en PBS-FCS-T. Después de lavar las laminillas tres veces con PBS-FCS-T, se incubaron con un anticuerpo biotinilado de pato anti-IgG de ratón (Dako, USA) durante 30 min. temp. ambiente, se lavaron y se incubaron con un conjugado de estreptavidina-peroxidasa (Dako, USA) durante 30 min. a temp. ambiente. La actividad de peroxidasa se desarrolló incubando las laminillas con 3'3'-diaminobenzidina (Dako, USA). Se hizo una contra-tinción de las laminillas con hematoxilina de Meyer y se deshidrataron con incubaciones sucesivas de 10 min. en alcohol al 50, 70, 90, 100% y Xilol. Las laminillas se montaron con cubre objetos y se fotografiaron como se describe en la sección sobre Tinción intracelular.

Caracterización de la respuesta inmune celular

Ensayos de proliferación celular

Se realizaron ensayos de proliferación celular con células extraídas de los bazos de ratones controles e inmunizados, por medio de disgregación tisular con una malla de tela "organza". La tela fue previamente tratada con HCl 0.1N durante toda la noche a temperatura ambiente con agitación, y lavada exhaustivamente con agua destilada (aprox. 10 veces a intervalos de 1hr.). En breve, se colocaron los bazos recién extraídos, entre dos círculos de "organza" de aprox. 5 cm de diámetro, colocados en cajas Petri con 10ml de medio de cultivo RPMI. Se trituraron los bazos completamente, utilizando el émbolo de una jeringa de 10 ml y se descartó el emparedado de "organza" con los débris tisulares. La concentración de células en suspensión se determinó utilizando una cámara de Newbauer. Los procedimientos utilizados para los ensayos de proliferación celular se encuentran descritos en los Anexos 1, 4, 5 y 6.

Cuantificación de citocinas

La cuantificación de citocinas presentes en los sobrenadantes de cultivo de células estimuladas *in vitro* con antígenos recombinantes, fue llevada a cabo siguiendo los procedimientos descritos en los Anexos 1 y 5.

Métodos Misceláneos

Cuantificación de proteínas

Las fracciones proteicas se cuantificaron por el microensayo de Bradford que se llevó a cabo en placas de 96 pozos, de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Bio-Rad). Brevemente, se mezclaron $40\ \mu\text{l}$ del reactivo de Bradford concentrado (5X) con $160\ \mu\text{l}$ de una dilución adecuada de proteína ($< 80\ \mu\text{g/ml}$). Se midió la absorbancia de las muestras por espectrofotometría en un lector de placas a 595nm de longitud de onda. La concentración de las proteínas en las muestras problema, se determinó con relación a una curva patrón de referencia, construida con cantidades conocidas de albúmina sérica bovina (BSA). Mediante la fórmula de estimación lineal (EXCEL), se dedujo la pendiente de la curva patrón de referencia. Para calcular la concentración de cada muestra, se utilizó la fórmula $y = mx + b$ (en donde "y" es la absorbancia; "x" es la concentración; "m" es la pendiente de la curva patrón y "b" es la ordenada al origen).

Electroforesis de proteínas

Se utilizó el método de electroforesis en mini-geles de poliacrilamida-SDS al 10, 12 y 15%, en un sistema

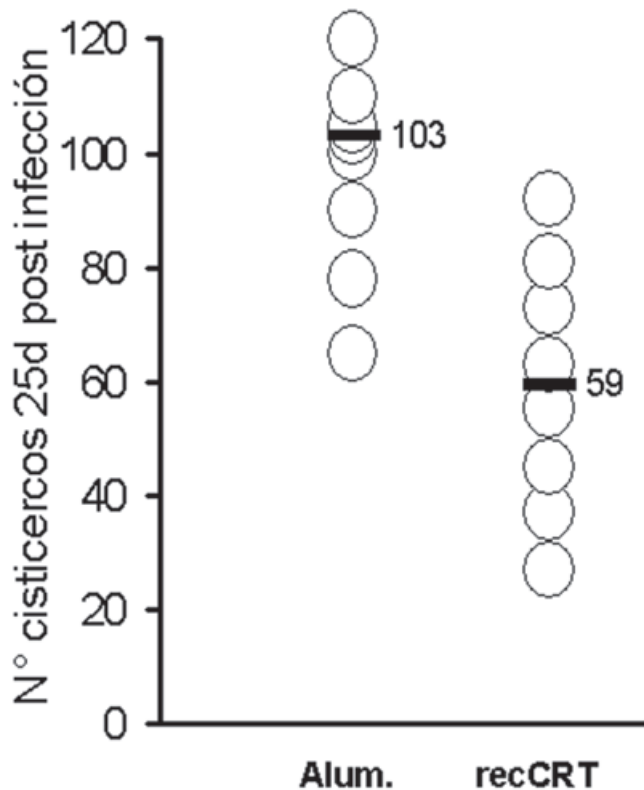


FIG. 17. Ensayo de protección en contra de la cisticercosis murina por *Taenia crassiceps*, en ratones vacunados con calreticulina de *T. solium* recombinante (recCRT). Los ratones fueron inmunizados dos veces a intervalos de 15 días con 25 µg de la proteína recombinante adsorbida a alúmina (Alum.). Quince días después del refuerzo, los animales fueron desafiados con 10 cisticercos de *T. crassiceps* por vía intraperitoneal y sacrificados 25 días después, para determinar el efecto de la vacunación sobre la carga parasitaria. Al grupo control únicamente se le administró Alum. Los círculos representan las cargas parasitarias individuales, y las barras negras el promedio de cada grupo.

de gel discontinuo [75]. Las muestras proteicas se mezclaron con una solución desnaturalizante 2X (glicerol al 10% v.v.; SDS al 23% p.v.; 62 mM de Tris-HCl, pH 6.8; 2-mercaptoetanol al 5% v.v.; azul de bromofenol al 0.001% p.v.) y se hirvieron 5 min antes de ser cargadas en los pozos del gel superior. La electroforesis se realizó en una solución de Tris-glicina (25mM de Tris base; 250mM de glicina; SDS al 0.1% v.v.; pH 8.3), aplicando un voltaje constante de 100. Cuando el frente de corrida formado por el azul de bromofenol alcanzó la parte inferior del gel separador, se interrumpió la electroforesis y se tiñeron las proteínas resueltas en el gel, en una solución de azul de coomassie (metanol al 45% v.v.; ácido acético al 10% v.v.; azul de coomassie R-250 o G-250 (Bio-Rad) al 0.1% p.v), con agitación durante 1 hr; se aclaró el fondo del gel en una solución desteñidora (ácido acético al 10% v.v. y metanol al 5% v.v.), hasta obtener el mejor contraste. Para conservar los geles

indefinidamente, se colocaron entre dos hojas de celofán (Pharmacia Biotech Inc.) previamente humedecidas en agua y se sujetó el emparedado de geles y celofán en un marco de acrílico hasta su deshidratación total (aprox. 12 hrs. a temp. ambiente).

Inmuno electro-transferencia (Western-blot)

Este método es ampliamente utilizado para determinar cualitativamente el reconocimiento por anticuerpos de proteínas transferidas a membranas de nitrocelulosa [160].

Las proteínas de interés se resolvieron por electroforesis en gel y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad) utilizando una solución estándar que contiene Tris-base, 25 mM, glicina, 193 mM, y metanol al 20% v.v., aplicando una corriente de 24 volts durante 30 min. Se verificó la transferencia de las proteínas incubando las membranas con una solución de Ponceau (Sigma) al 0.3% en ácido clorhídrico al 10% v.v. Una vez ubicadas las proteínas en las membranas, se cortaron tiras correspondientes a los carriles de la electroforesis en gel (o bien al gel completo, cuando solo se utilizó un solo anticuerpo), y se destiñeron las membranas con un lavado con agua destilada. Se incubaron las membranas en una solución al 3% p.v. de albúmina sérica bovina disuelta en PBS (PBS/BSA), con agitación lenta, a temp. ambiente durante 1 hr. Se incubaron las membranas con los sueros diluidos en PBS/BSA. Se lavaron las membranas 5 veces con PBS adicionado con Tween-20 al 0.05% v.v. (PBS/Tw), con agitación lenta durante 5 minutos por lavado, y se incubaron con un anticuerpo secundario (anti-IgG de ratón, cerdo o conejo según el caso, de la marca Zymed) conjugado a peroxidasa, diluido en PBS/BSA. Después de lavar las membranas como antes, se reveló la reacción con diaminobenzidina (0.5 mg/ml) y peróxido de hidrógeno (0.001 % v.v) disueltos en PBS. La reacción colorida se detuvo con agua a un tiempo fijo para todas las membranas utilizadas en un mismo ensayo.

Preparación de inmunógenos recombinantes

Las proteínas recombinantes se adsorbieron a alúmina como agente adyuvante, a razón de 1mg / 100µg de proteína [53]. La alúmina se preparó mezclando AlK(SO₄)₂ al 10% en solución acuosa: se agregaron de forma gradual 22.8 ml de una solución acuosa de NaOH, 0.25 N, a 10 ml de la solución de AlK(SO₄)₂; se incubó a temp. ambiente 10 min, se centrifugó a 1000 g / 10 min y se descartó el sobrenadante. Se resuspendió la pastilla en 50 ml de agua destilada; se centrifugó a 1000 g / 10 min; se descartó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla otra vez en 10ml de agua destilada. Determinaciones realizadas indicaron que 1 mg de

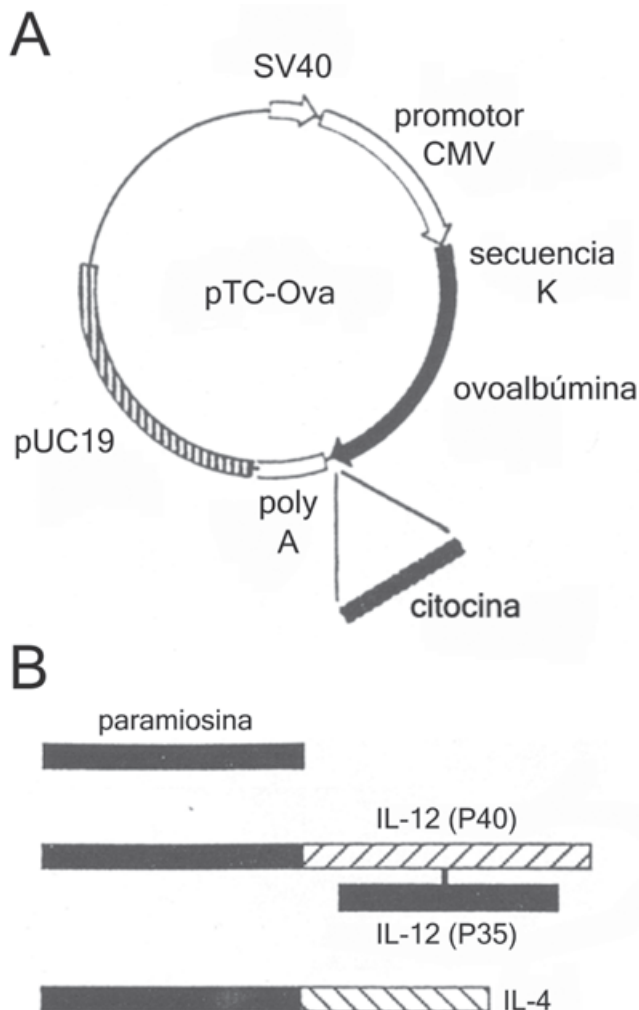


FIG. 18. Construcciones plasmídicas basadas en el vector pTC. (A) Representación esquemática del vector plasmídico pTC-Ova. Este vector que originalmente fue desarrollado a partir del pUC19, fue diseñado para expresar el gen de la ovoalbúmina, sola o como un producto de fusión con varias citocinas [Maecker et al., 1997]. El vector contiene un promotor de citomegalovirus (CMV), una secuencia secretora de la cadena k de las inmunoglobulinas de humano (secuencia K) y una región de poli-adenilación bovina (poly A). (B) Representación esquemática de las construcciones basadas en el pTC-Ova que expresan a la paramiosina (el fragmento VW2-1 o la proteína completa) sola, o acoplada a IL-12 (subunidad P40) o IL-4. La construcción que codifica para la paramiosina junto con la subunidad P40 de la interleucina 12, requiere de otro vector plasmídico (pED-P35) que aporta la otra subunidad P35.

Al₂(OH)₃ permite atrapar 50-100 µg de proteína recombinante. Cantidades adecuadas de proteína y adyuvante se mezclaron e incubaron 20 min. a temp. ambiente. Se centrifugo la mezcla a 1000 g/10 min y se descartó el sobrenadante. El gel de alúmina se resuspendió en 100 µl de PBS/ 50µg de proteína, antes de ser inyectado.

Extremo 5' del gen de ovoalbúmina

```

agatctctcaccatgagggtccccgctcagctcctggggctcctgctgctgctgctccca
M R V P A Q L L G L L L L W L P
BglII      Secuencia lider ----->
gggtgcacgatgtggctccatcgggcag.....
V C R C G S I G A
---> DraIII gen de ova ---->
    
```

Extremo 3' del gen de ovoalbúmina

```

tgtgtttccccctcgagcaccatcaccattataaggatccttgaaatgacc
C V S P L E H H H H H H
ova-----> XhoI cola de His-----> Stop BamHI
gaccaagc.....
    
```

Fusion entre el gen de ova y el de citocinas

```

tgtgtttccccctcgagcgggagcaccaccocgc.....
C V S P S S G A P T R
Ova----->XhoI      Citocina (GMGSF)----->
    
```

FIG. 19. Secuencias críticas para la clonación de la secuencia codificadora de antígenos en el pTC. La versión anterior del pTC (pTC-Ova) contiene la secuencia codificadora de la ovoalbúmina en los sitios DraIII y BamH1, en el mismo marco de lectura que la secuencia líder/secretora que se encuentra río arriba. Las secuencias codificadoras de la paramiosina completa o del fragmento VW2-1 se insertaron en los sitios de restricción DraIII y BamH1 (arriba). Otra serie de construcciones anteriores, basadas en el pTC, expresan a la ovoalbúmina como un producto de fusión con citocinas Th1 o Th2. En este caso, las secuencias codificadoras de la paramiosina se insertaron en los sitios de restricción DraIII y XhoI, respetando el marco de lectura tanto río arriba (secuencia líder/secretora) como río abajo (secuencia codificadora de citocinas). En un estudio realizado por otro grupo se demostró que las construcciones pTC-Ova+citocinas fueron capaces de modular la respuesta inmune de ratones inmunizados génicamente hacia los perfiles Th1 o Th2, dependiendo del tipo de citocina fusionada al antígeno [Maecker et al., 1997].

RESULTADOS

Ensayos de vacunación con antígenos recombinantes de *Taenia solium*

Producción de antígenos recombinantes

Los antígenos recombinantes de *T. solium* (la paramiosina y sus fragmentos, el antígeno de oncosfera TSOL18, y la calreticulina) fueron expresados en cultivos bacterianos, y purificados a partir de la biomasa, mediante un sencillo proceso de cromatografía de afinidad. De esta forma, se obtuvieron fracciones de cada uno de los antígenos con un alto grado de pureza, en cantidades del orden de los miligramos (ver Anexos 3, Fig.2 y Anexo 6, Fig. 1).

*Ensayos de vacunación con antígenos recombinantes de *Taenia solium**

Los ensayos de vacunación en contra de la cisticercosis murina por *T. crassiceps* en el ratón, con antígenos recombinantes de *T. solium*, se basaron

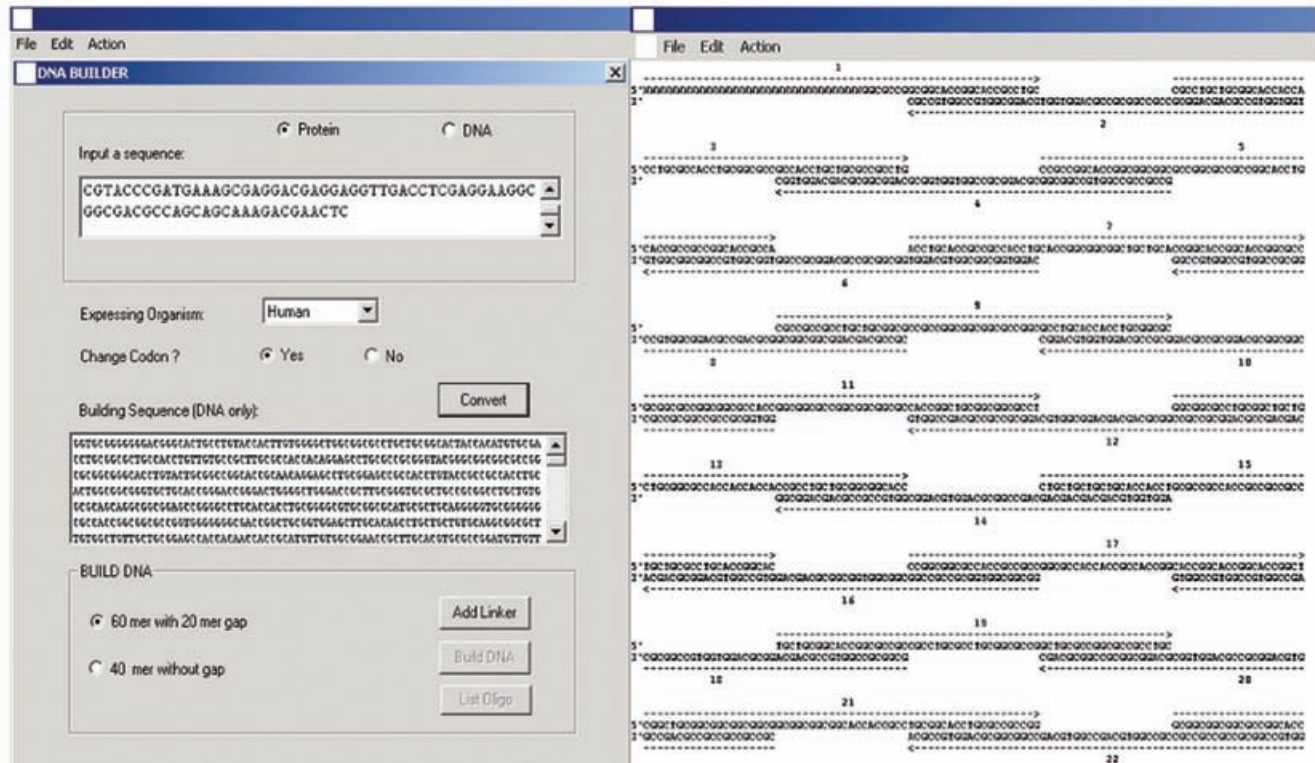


FIG . 20. Software utilizado para llevar a cabo la edición de la secuencia codificadora de los genes de *Taenia solium*. La secuencia nucleotídica o de aminoácidos de interés se inserta en la ventana superior del DNABuilder (arriba izq.), para después seleccionar el organismo cuyo uso en las preferencias de los codones se desea utilizar (*Expressing Organism*). El programa origina a través de una serie de algoritmos, una nueva secuencia codificadora a partir de la cual se genera un juego de oligonucleótidos sucesivos complementarios (derecha). Los oligonucleótidos son ensamblados mediante técnicas de PCR para producir el nuevo gen sintético.

principalmente en la paramiosina, aunque en la etapa final del proyecto se realizaron ensayos iniciales de para evaluar el potencial protector de la calreticulina. El antígeno recombinante TSOL18 no se probó en ensayos de vacunación en contra de la cisticercosis murina por *T. crassiceps*, puesto que se trata de un antígeno exclusivo de oncosfera, de probada capacidad protectora en contra de la cisticercosis porcina [39]. Este antígeno mas bien se incorporó como parte de una nueva estrategia para el desarrollo de una vacuna génica en contra de la cisticercosis porcina, basada en varios antígenos protectores, como se menciona más adelante. Los estudios de protección de TSOL18 se encuentran actualmente en curso pero no constituyen parte del presente trabajo de tesis.

En el caso de la paramiosina de *T. solium*, se hizo un gran esfuerzo por identificar los componentes protectores de este antígeno. Puesto que la paramiosina de *T. solium* es una proteína filamentosa, con una estructura secundaria de α -hélice súper enrollada (Fig. 9), la identificación estructural de componentes protectores se basó en una simple subdivisión de fragmentos a lo largo de su estructura. Los ensayos de vacunación, basados en la paramiosina de *T. solium*, revelaron que la mayoría de los epítomos protectores en contra de la cisticercosis

murina se localizan cerca del extremo amino terminal de la proteína (Cuadro 5 y Anexo 5, Cuadro 1). Varios experimentos realizados a lo largo del doctorado, confirmaron que el fragmento llamado VW2-1, correspondiente a los primeros 268 aminoácidos en el extremo amino terminal (recVW2-1 cuando se hace referencia al producto recombinante) induce

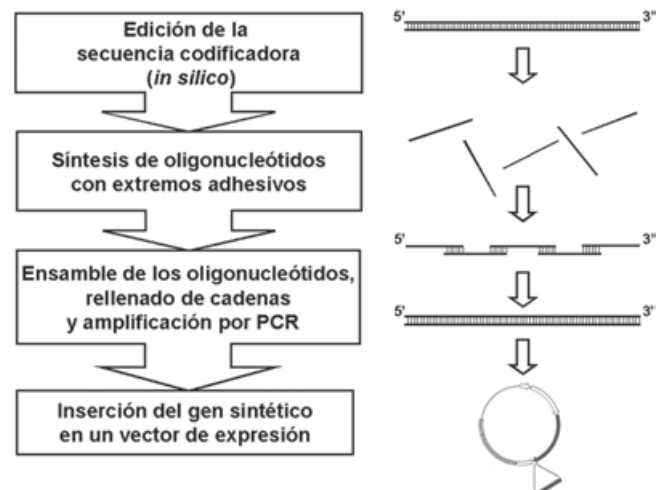


FIG 21. Diagrama de flujo y representación esquemática de los pasos a seguir para la síntesis de genes.

```

atgagcgcagagccatgtgaagatcagtcgtaccattattaggggccactagcccagcagccctgctgcctcgagagccgctgagggaaactggaggaacctgctcgacctcgaacgcgagcgc 120
M S E S H V K I S R T I I R G T S P S T V R L E S R V R E L E D L L D L E R D A
cgagtcggcgcagagcggcaacgcgaacgagatgtccatccagctgggacaccatggctgagagggctcgacgagctctcggggacagctcgcagacccacgagcaatccgcaggaaggac 240
R V R A E R N A N E M S I Q L D T M A E R L D E L S G T S S Q T H D A I R R K D
atggaatcagcaagctccgcaaggacttagagaacccaacgcccgtttcagagctgcagagggcagccctccggaggaagcacaacacatgatctcggaaatctcctccgaggtcgag 360
M E I S K L R K D L E N A N A A F E T A E A T L R R K H M T M I S E I S S E V E
aacctgcagaaagcagaaagggcgtgcccgaagaggaagagcagctgatgctgaaatcgacaacgctgctcggccagctggaaggcgcctcgaaggccaaggcctcagccgagagtaag 480
N L Q K Q K G R A E K D K S Q L M L E I D N V L G Q L D G A L K A K A S A E S K
ctggagggactcgacagctcagctgacacggctgaaggcgtgacggatgacctgcagcgcagatggcgcagccaacagcgcgaagtcctgcctggcagcggagaactcgaactggtg 500
L E G L D S Q L T R L K A L T D D L Q R Q M A D A N S A K S R L A A E N F E L V
cgggtgaaccaggagtagcagggcgcaggtggttacctttc taaaacgaaagcgcgctggagtcctagctggagcagctgaaacgggccaaggacgaggacgctcgcgaatagactgctc 620
R V N Q E Y E A Q V V T F S K T K A A L E S Q L D D L K R A M D E D A R N R L S
ctgcagacacaactgtcctccctacagatggactacgataatcttcaagccagatagaagaggaagccgagccgcggtaat
L Q T Q L S L S L D N K T A E T G S L V A D F D M I P P R T I D D P D A K K P E D W
    
```

FIG. 22. Secuencia nucleotídica sintética y de aminoácidos del fragmento VW2-1 de la p aramosina de *Taenia solium* (synVW2-1).

consistentemente una reducción del 50% en promedio de la carga parasitaria en ratones desafiados por vía intraperitoneal con cisticercos de *T. crassiceps*. Otros fragmentos recombinantes de la p aramosina disminuyeron la carga parasitaria, aunque en forma menos consistente y en un porcentaje menor al alcanzado con VW2-1. En suma, encontramos que los niveles de protección alcanzados con el fragmento recVW2-1, fueron similares a los obtenidos con la paramiosina completa. Por ello, nuestros esfuerzos posteriores en el desarrollo de una vacuna a partir de la paramiosina, se basaron principalmente en el uso de la secuencia codificadora del fragmento VW2-1.

Recientemente, incorporamos a las pruebas de vacunación otro antígeno de *T. solium* llamado calreticulina, cuya secuencia codificadora fue clonada por nuestro grupo, de la cual se caracterizaron algunas propiedades (ver Anexo 3). Este antígeno, ampliamente expresado en los tejidos de *T. solium* [Mendlovic et al., comunicación personal], podría constituir un blanco para el sistema inmunitario del ratón o del cerdo. Los ensayos iniciales revelaron que ratones vacunados

con calreticulina recombinante (recCR T), y posteriormente desafiados con cisticercos de *T. crassiceps*, presentaron una disminución en la carga parasitaria de alrededor del 39% (Fig. 17).

Perfil de la respuesta inmune protectora con productos recombinantes

Las evidencias encontradas a lo largo de varios ensayos en ratones inmunizados con fragmentos recombinantes de la p aramosina de *T. solium*, indicaron que la respuesta protectora esta asociada a un perfil de tipo Th1. La caracterización de la producción de isotipos de anticuerpos en ratones vacunados con el fragmento protector recVW2-1 revelaron la presencia de niveles altos de IgG2a, en contraste con niveles bajos de IgG1. Además, se encontraron altos niveles de IFN- γ e IL-2 en los sobrenadantes de cultivo de células extraídas de los bazos de ratones vacunados y estimuladas con recVW2-1 (ver Anexo 5, Cuadro 4).

```

gaggtgtacttcgaggaccgtttcatcgaatccaacattgacaagtgaggagaagtctaagtatgacgaatc taatctgggctgtgtgagtagcgaacaaaccgaaggagacttcgacgac 120
Y D E S N L G L C E Y A K P K G D F D D E V Y F E D R F I E S N I D K W E K S K
aaggaggatggaggatgcccagctacccaggagcgcgattttaccggctactcagccccctcaataaaaccactgtc caataaggataagattatgtgtgtgacgttccacctgaaacac 240
K E D G G M R T T Q D A R F Y R Y S A P F N K P L S N K D K I M C V Q F T V K H
gagcagaacatcgactcggggggggttacgtcaagctgctgggggagctggttaagcccgacgacttccatggcgagagcccgatgagatcagtttgaccagatatatgcggtac 360
E Q N I D C G G G Y V K L L G E S F K P D D F H G E S P Y E I M F G P D I C G Y
gacaagaagatcgtgacgctgatcttctc ttacaagggcaagaattacctggtcaagagggatgatacccgtgcaagtcgcagacattgactcactgtacacctgtgtagaccggac 480
D K K I V H V I F S Y K G K N Y L V K R D I P C K S D T L T H L Y T L I V R P D
aacaccttcgaagtcctgattgacaacaaagacggcggagacggggtccttctgtggccgactttgacatgatcccgcctcgcactatcgacgatcccgacgcaagaagcccgaggattgg 600
N T F E V L I D N K M T A E T G S L V A D F D M I P P R T I D D P D A K K P E D W
gtggacgagggcggagatccccgacccggacgacaaagaagcctgacgactgggacagccaaaacaaatcgtcgatac caacgcgaagcagcctgaaagactggaacgaggagaccgatggt 720
V D E A E I P D P D D K K P D D W D Q P K T I V D T N A K Q P E D W N E E T D G
gagtgagacagcccatgatcga taaccttgattacaagggcgaatggcaccctaaagatgatccc caaccagcctaccggcgagtggaagcccccagatccccaaacccgaccac 840
E W T A P M I D N P D Y K G E W H P K M I P N P A Y R G E W K P P Q I P N P D H
ttcagagactcgagctcagcctcgcacgttgcctatatcggcttgacctcggcaggtgaaagagcggccaccatcttcgacaactcctcgtgagtgacaacgctgacgagtgccag 960
F E D S E L Y A R T F A Y I G L D L W Q V K S G T I F D N F I V S D N V S E C Q
gctcagcggagatttgcaaaaaagcgttctgcttttgaggagggaggaagagagtttcgaagaaaaagacaagagagcagcaccaccgacaacgtaccctgatgaaagcggaggac 1080
A H A E Y W Q K R F A F E E E E E K K S F E E K D K E S S T T D N V P D E S E D
gaggaggttgacctcgaggaaggcggcgcagccagcagcaaaagacgaactc
E E V D L E E G G D A S S K D E L
    
```

FIG. 23. Secuencia nucleotídica sintética y de aminoácidos de la calreticulina de *Taenia solium* (synCRT).

CUADRO 5. Resumen de ensayos de protección con los productos recombinantes de paramiosina de *Taenia solium*^a

Nº de Exp. (días post reto)	Vacunación	Nº de ratones	x ± D.E. ^b	Protección (%) ^c
Exp.1 (30d)	Alúmina	4	36 ± 11	55 ^d
	recVW7-3	4	16 ± 10	
Exp.2 (40d)	Alúmina	6	65 ± 45	52 ^d
	recVW7-3	6	31 ± 16	
Exp.3 (40d)	Alúmina	5	70 ± 46	87 ^d
	recVW2-1	5	9 ± 18	
	recVW4-1	6	88 ± 36	
Exp.4 (40d)	Alúmina	5	64 ± 29	47 ^d
	recVW 2-1	6	34 ± 30	
	recVW 4-1	6	41 ± 59	
Exp.5 (40d)	Alúmina	6	57 ± 31	52 ^d
	recVW 2-1	6	27 ± 30	
	recVW 4-1	6	42 ± 46	
Exp.6 (40d)	Alúmina	6	67 ± 47	56 ^d
	recVW 2-1	6	29 ± 32	
	recVW 4-1	6	46 ± 50	
Exp.7 (40d)	Alúmina	5	65 ± 29	48 ^d
	recVW 2-1	6	33 ± 29	
	recVW 4-1	6	33 ± 42	
Exp.8 (40d)	Alúmina	6	64 ± 39	63 ^d
	recVW 2-1	6	24 ± 28	
	recVW 4-1	6	56 ± 47	
Exp.9 (40d)	Alúmina	5	88 ± 45	34 ^d
	recVW3-3	5	58 ± 30	
Exp.10 (40d)	Alúmina	6	138 ± 90	52 ^d
	recVW3-3	6	67 ± 42	
Exp. 11 (55d)	Alúmina	7	304 ± 65	
	recVW2-1	7	319 ± 79	
Exp. 12 (60d)	Alúmina	7	358 ± 46	
	recVW2-1	7	344 ± 67	

^a Los ratones fueron inmunizados dos veces por vía i.p. a intervalos de 15 días (ver sección sobre Materiales y Métodos). Quince días después del refuerzo, los animales fueron desafiados por vía i.p. con 10 cisticercos de *Taenia crassiceps*.

^b Los datos representan el promedio de la carga parasitaria de los ratones ± desviación estándar.

^c El porcentaje de protección se midió como una disminución de la carga parasitaria de los grupos vacunados con relación al grupo control, al que únicamente se le administró el adyuvante alúmina.

^d Estadísticamente significativo por análisis de varianza (Anova) *P* < 0.05.

Cabe mencionar que estudios realizados en humanos, mediante ensayos de *western blot*, revelaron que los anticuerpos de pacientes neurocisticercosos reconocen preferentemente el fragmento VW4-1 de la paramiosina que corresponde aproximadamente a un

CUADRO 6. Características de los vectores plasmídicos utilizados para la inmunización génica^a.

Características	Vector		
	pcDNA3	pTC	pCMV
Promotor eucariote	CMV	CMV	CMV
Secuencia secretora	ninguna	hKL	htPA
Poliadenilación	hGH	bGH	hGH
Origen de replicación bacteriano (nº de copias / célula) ^b	CdE1 (15-20)	pMB1 (500-700)	f1 ori
Rendimiento de purificación (mg/lit de cultivo) ^c	< 1	> 4	> 4

^a Los vectores contienen un promotor de citomegalovirus humano (CMV) que dirige la expresión de los antígenos codificados. Dos de los vectores contienen las secuencias secretoras de la cadena capta de las inmunoglobulinas de humano (hKL) o del activador del plasminógeno tisular humano (htPA). Los vectores contienen una secuencia de terminación/poliadenilación de la hormona del crecimiento humana (hGH) o bovina (bGH).

^b Comportamiento de replicación promedio de los vectores que contienen los orígenes de replicación indicados, de acuerdo a la literatura.

^c El rendimiento promedio de la producción del DNA plasmídico se estimó con base a varios ensayos de purificación para las construcciones que contienen la secuencia silvestre del fragmento VW2-1 de la paramiosina (pcDNA3-wtVW2-1 y pTC-wtVW2-1) o bien una versión sintética del mismo fragmento (pCMV-synVW2-1). Para el proceso de purificación del DNA plasmídico se utilizó el paquete comercial *Qiagen Giga kit* (ver Materiales y Métodos).

tercio de la paramiosina hacia el extremo carboxilo terminal (ver Anexo 6, Figuras 1 y 2).

Por otra parte, ensayos de proliferación con células de sangre periférica de pacientes neurocisticercosos, revelaron índices de estimulación similares con los distintos fragmentos recombinantes de la paramiosina (ver Anexo 6, Cuadro 1). Sin embargo, las células de individuos sanos, muestreados en la misma región endémica, proliferaron más activamente al ser estimuladas con el fragmento VW2-1 correspondiente a un tercio de la paramiosina hacia el extremo amino terminal. Estas evidencias en individuos sanos y cisticercosos, que viven en zonas endémicas de México, sugieren que la inmunidad asociada a la protección con paramiosina, estaría mediada por el fragmento amino terminal de la paramiosina llamado VW2-1.

Ensayos de vacunación génica

Construcción de vectores plasmídicos para vacunación génica

En una segunda etapa del proyecto, exploramos otras estrategias de inmunización. La inmunización génica se presentó como una estrategia con ventajas atractivas para el desarrollo de una vacuna de uso veterinario (ver sección Antecedentes del proyecto).


```

atggtttgtcgggttcgctctcatatctcttctgtcgcggtggtgctagcctccggggatagaaacatttggcgacgatatactcgtgccctaactcgtcgtgcttgcgcctgagcgcaccgag 120
M V C R F A L I F L V A V V L A S G D R T F G D D I F V P Y L R C F A L S A T E
atcggcgtctctcgggacgcgggagagatggttggacatggagtcgaggagatcaaagtgaagtggaaaaggccatccaccatacaaaatttggaaacgcaactgtcagcacaacaat 240
I G V F W D A G E M V G H G V E E I K V K V E K A I H P Y K I W N A T V S A N N
ggtaaggtaattattagggacctgaaagc taagacgatctacagagtgagcgtggatgggtaccggaatgaaatcatggatttgggtctcagcgttttgc taccacattgacctgaagaag 360
G K V I I R D L K A K T I Y R V D V D G Y R N E I M V F G S Q R F A T T L P K K
cagatcaaacacaagaaggctccgacgcagt
Q I K H K K V R R S

```

FIG. 24. Secuencia nucleotídica sintética y de aminoácidos del antígeno de oncosfera TSOL18 de *Taenia solium* (synTSOL18).

Nuestra incursión en la vacunación génica comenzó con el desarrollo de una construcción plasmídica para la expresión del fragmento protector de la paramiosina VW2-1, utilizando el vector comercial pcDNA3, que contiene un promotor viral de citomegalovirus (CMV), el cual dirige la expresión de los genes clonados. Con esta construcción que contiene la secuencia codificadora de VW2-1 (pcDNA3-wtVW2-1), se realizaron ensayos iniciales de vacunación génica en ratones, que nos permitieron demostrar por primera vez, mediante pruebas serológicas en ratones, la presencia de anticuerpos circulantes, específicos para el fragmento recVW2-1. Sin embargo, esta construcción basada en el pcDNA3 se descartó rápidamente a causa del pobre rendimiento de purificación, debido probablemente al origen de replicación (Cuadro 6).

Posteriormente, se desarrollaron vectores plasmídicos a partir del pTC que es un plásmido con un origen de replicación bacteriano que resulta en un alto número de copias, previamente reportado en ensayos de vacunación génica [90]. El plásmido pTC, al igual que el pcDNA3, es un vector plasmídico de expresión eucarionte que contiene el promotor de CMV, así como una secuencia secretora de la cadena κ de la inmunoglobulina G de humano, que asegura la liberación del antígeno expresado hacia el espacio extracelular. El plásmido pTC se modificó con el fin de expresar a la paramiosina y al fragmento protector VW2-1, solos o como un producto de fusión con la subunidad P40 de la IL-12 o con la IL-4 (Fig. 18). Entre las secuencias codificadoras del antígeno y de las

citocinas, existe una “bisagra” formada por la secuencia de aminoácidos VSPSSG, tal y como se muestra en la figura 19. La otra subunidad de la IL-12 denominada P35, la aportó otro vector independiente para la expresión de P35, llamado pEDP35, que fue donado por *Genetics Institute*. Puesto que el pTC se diseñó para expresar el gen de la ovoalbúmina, solo o como un producto de fusión con citocinas, simplemente se substituyó la secuencia de la ovoalbúmina por la de la paramiosina, utilizando los sitios de restricción adecuados (Fig. 19). Cabe mencionar que posteriormente también se llevaron a cabo experimentos de vacunación génica con varios vectores para la expresión independientes de los antígenos y de las citocinas de ratón.

Construcción de genes sintéticos para vacunación génica

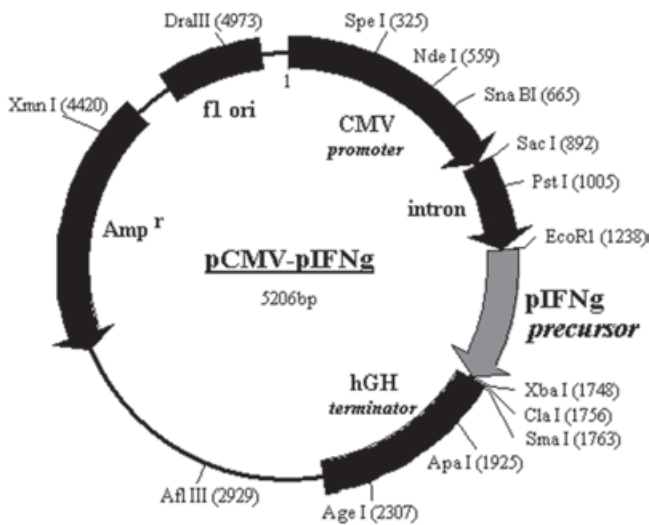
En un esfuerzo por optimizar la eficiencia de nuestras construcciones plasmídicas para vacunación génica, se construyeron genes sintéticos que codifican para los antígenos de *T. solium*, pero con las preferencias de codones adaptadas para mamíferos. Cabe mencionar que esta parte del proyecto se realizó en el laboratorio del Dr. Stephen A. Johnston quien implemento por primera vez el uso de la inmunización génica [151] y quien ha trabajado en los últimos años en el desarrollo de vectores para vacunación génica. El principio de la metodología para la construcción de genes, consiste en obtener mediante un programa de computadora (i.e. *in silico*), una nueva secuencia codificadora para el mismo producto, pero con el uso

```

atggc cccacc cctggc ttactgggacatccggc ccttgc tggagcaatcccg cctgctgcttaaataccctcgggtggagatcaccgacaagagatatacagctgggcccctgc ccccaac 120
M A P T L A Y W D I R G L A E Q S R L L L K Y L G V E Y H D K R Y H V G P A P N
ttcgacaggtc tgaatgctatccgaaaaattacccttggcctcgacttccccaatctgccctactataggacggtgacctcaagctcaccagagcggcgccatccctcagatgacatc 240
F D R S E W L S E K F T L G L D F P N L P Y Y H D G D L K L T Q S G A I L E Y I
ggggtcgcctatggcatgatccccgattgcaagaagcggagggcgtgctccacatgctccagtcgaggtcctggatttacgccaggccttccaccggatctgctactccccgcagctt 360
A D R H G M I P D C K K R R A V L H M L Q C E V L D L R Q A F T R I C Y S P D F
gaggagctcaagcctgggttcttcgagactctggc acagaagctgcccgaacttcgagacgtacctgggcgacaaggaatggctgacgggcgaaaaattaactaccagacttcgcacctg 480
E E L K P G F F E T L A Q K L P N F E T Y L G D K E W L T G E K I N Y P D F A L
tgcgagctgctgagccagctgaccaggttcgagcccacctgctgaagaagtaccctaaagctgagcgcatacctggagcgttgcgagaacctgcccgcagctgctgggatacatgtcaagc 500
C E L L S Q L T K F E P T C L K K Y P K L Q A Y L E R F E N L P Q L S G Y M S S
aaggagttcaagacatgtccatgtaacgggtgagtgcaagtgccgtggagactgt
K E F K T C P C N G V S A K W R G D C

```

FIG. 25. Secuencia nucleotídica sintética y de aminoácidos de glutatión-s-transferasa de *Taenia solium* (synGST).



1. pCMV-mIL-18
2. pCMV-mIFN γ
3. pCMV-mGM-CSF
4. pCMV-pIL-18
5. pCMV-pIFN γ
6. pCMV-pGM-CSF
7. pCMV-pIL-4

FIG. 26. Construcciones plasmídicas basadas en el vector pCMV que contienen las secuencias codificadoras de varias citocinas del cerdo (pIL-18, pIFN- γ , pGM-CSF, pIL-4) y del ratón (mIL-18, mIFN- γ , mGM-CSF). Puesto que la mayor parte de los templados para la amplificación y clonación de las citocinas no estaban disponibles, estas se sintetizaron mediante técnicas de PCR, siguiendo el procedimiento descrito en la figura 21, a partir de las secuencias disponibles en el *GeneBank*.

de codones adaptado para el organismo deseado (Fig. 20). Posteriormente, el programa genera a partir de la nueva secuencia, un mapa de oligonucleótidos que se superponen de manera sucesiva y que abarcan todo el gen. Estos oligonucleótidos se mezclan en cantidades equimolares para posteriormente ensamblar, mediante técnicas de PCR, el nuevo gen sintético (Fig. 21). Siguiendo este procedimiento, se construyeron los genes sintéticos de los antígenos de *T. solium* VW2-1 (synVW2-1, Fig. 22), Calreticulina (synCRT, Fig. 23), TSOL18 (synTSOL18, Fig. 24) y Glutathion-S-Transferasa (synGST, Fig. 25). También aprovechamos el poder de esta metodología para sintetizar los genes de algunas citocinas del ratón y del cerdo, que permitan modular el perfil de la respuesta inmune (Fig. 26), aunque en este caso no se alteró el uso en las preferencias de los codones de las secuencias codificadoras de estos genes.

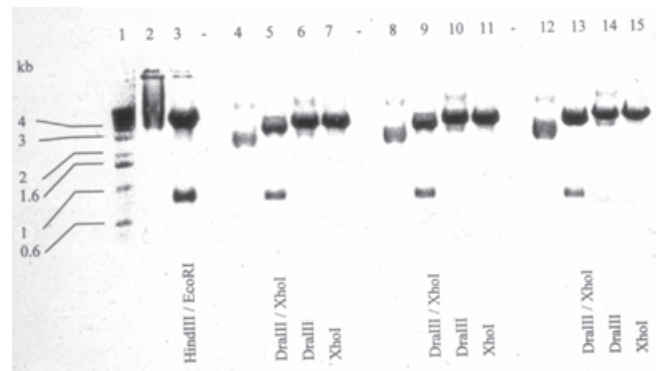


FIG. 27. Análisis por electroforesis en gel de agarosa del patrón de restricción de las construcciones plasmídicas basadas en el vector pTC. Las construcciones pTC-wtVW2-1 (carril 4), pTC-wtVW2-1-P40 (IL-12) (carril 8) y pTC-wtVW2-1-mIL-4 (carril 2) se digirieron con las enzimas de restricción DralIII y XhoI (carriles 5, 9 y 13 respectivamente), lo que liberó el inserto correspondiente a la secuencia codificadora de VW2-1, con el peso molecular esperado (marcadores de peso molecular: carril 1). Para confirmar el peso molecular de VW2-1, se digirió otro vector previamente desarrollado, que contiene la secuencia codificadora de VW2-1 (carril 2) clonada en los sitios de restricción HindIII y EcoRI (carril 3).

Todos los genes sintéticos se clonaron en un vector de expresión eucarionte de última generación llamado pCMV-tPA. En el caso de las citocinas, se utilizaron las secuencias secretoras naturales en lugar de tPA. Algunas de las diferencias entre el vector pTC y el pCMV radican en que el primero contiene otros elementos como son un gen de resistencia a neomicina y un origen de replicación SV40 que constituyen material genético adicional, irrelevante para efectos de vacunación en cerdos o ratones.

Todas las construcciones desarrolladas para la vacunación génica se confirmaron antes de ser utilizadas, mediante el análisis de los patrones de restricción a través de electroforesis en gel, y posteriormente, mediante el análisis de secuencia (Fig. 27). Las construcciones plasmídicas confirmadas se purificaron en cantidades del orden de los miligramos a partir de la biomasa de cultivos bacterianos transformados, utilizando un paquete comercial de purificación basado en cromatografía de afinidad, tal y como se describe en la sección de Materiales y Métodos (Fig. 28).

Expresión de los antígenos in vitro

Un aspecto importante en el desarrollo de las construcciones plasmídicas para vacunación génica, fue confirmar que estos vectores efectivamente inducen la expresión de los antígenos de interés. Una forma de evaluarlo consistió en hacer ensayos de expresión en células COS-7 (células de riñón de mono) y células CHO (células de ovario de hámster chino) transfectadas. Los anticuerpos que se generaron en

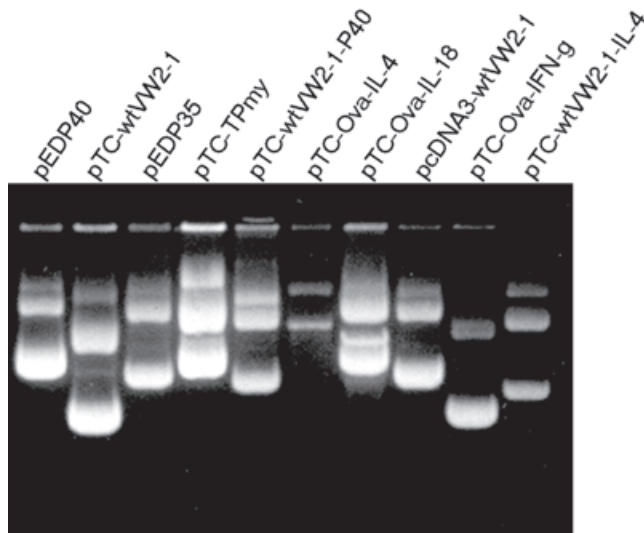


FIG. 28. Análisis por electroforesis en gel de agarosa de varias muestras de DNA plasmídico de las construcciones desarrolladas para vacunación génica.

ratones vacunados con los antígenos recombinantes de *T. solium*, se utilizaron como una herramienta para detectar la presencia de estos antígenos en los sobrenadantes de cultivo de las células transfectadas con los vectores para la vacunación génica. Antes de llevar a cabo los ensayos de inmuno-precipitación, se purificaron los anticuerpos a partir de los sueros colectados por cromatografía de afinidad, a través del sistema de dos columnas descrito en los Materiales y Métodos. Las fracciones purificadas de anticuerpos se titularon y se cuantificaron antes de ser utilizadas para los experimentos de inmuno-precipitación (Fig. 29).

Las células COS-7 y las células CHO se transfirieron transitoriamente con el DNA plasmídico. Este procedimiento se llevó a cabo utilizando lipofectinas comerciales, previamente incluidas con el DNA plasmídico. En los primeros ensayos, las células COS-7 transfectadas con la construcción pTC-wtVW2-1 se mantuvieron en cultivo durante 48 hrs. Los sobrenadantes de cultivo recolectados se incubaron con anticuerpos antígeno específicos, acoplados covalentemente a esferas de sefarosa, se analizaron posteriormente en ensayos *western blot* para demostrar la expresión de paramiosina (Fig. 30).

En otros experimentos, se utilizaron células CHO transfectadas con el DNA plasmídico, pero en presencia de metionina marcada radioactivamente con azufre 35. Esto permitió verificar la expresión de novo de los antígenos cuya secuencia codificadora fue insertada en los vectores de expresión, a tiempos más cortos, siguiendo el mismo procedimiento de inmuno-precipitación con anticuerpos específicos como en el caso de las células COS-7. Los ensayos de inmuno-precipitación con marcaje metabólico en células CHO,

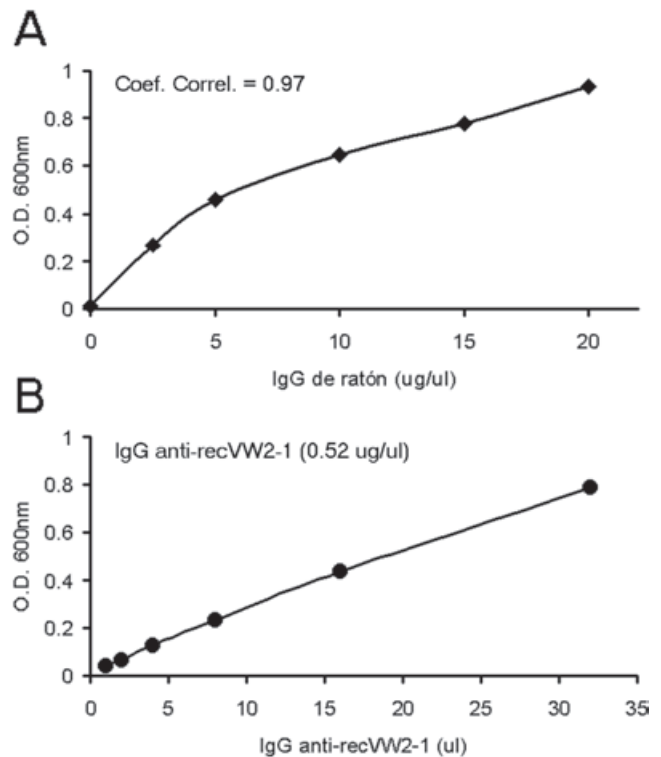


FIG29. Cuantificación de una fracción purificada de IgG de ratón anti-recVW2-1. Se obtuvo una fracción purificada de IgG anti-recVW2-1 a partir de los sueros colectados de los ratones inmunizados con VW2-1, mediante un doble proceso de cromatografía de afinidad a través de una columna de proteína G acoplada a sefarosa y posteriormente a través de otra columna de recVW2-1 acoplada a sefarosa. (A) Se construyó por ELISA, una curva de referencia con cantidades conocidas de una fracción comercial de IgG purificada de ratón. Se utilizó un anticuerpo IgG de conejo anti-IgG de ratón acoplado a peroxidasa como anticuerpo secundario y el sustrato adecuado para revelar la reacción. (B) Para determinar la concentración de la fracción purificada de IgG anti-recVW2-1 se analizaron diluciones seriadas por ELISA, en condiciones iguales y al mismo tiempo en que se construyó la curva de referencia. La concentración "x" de IgG anti-recVW2-1 se calculó siguiendo la fórmula "x = y/m", en donde "y" es la absorbancia y "m" es la pendiente de la curva de referencia (ver sección sobre Materiales y Métodos).

revelaron la presencia de la paramiosina, del fragmento VW2-1 y de la calreticulina, tan solo tres horas después de la transfección de las células (Fig. 31A).

Finalmente, en otra serie de experimentos, se trataron a las células transfectadas con un inhibidor para el transporte de las proteínas, el cual provoca la acumulación de las proteínas sintetizadas de novo. La presencia de los antígenos producidos por las células transfectadas, se llevó a cabo por tinción intracelular con anticuerpos (Fig. 31B).

Los resultados de la transfección *in vitro* constituyeron evidencia sólida para demostrar la funcionalidad de las construcciones plasmídicas, antes de ser utilizadas en ensayos de vacunación génica.

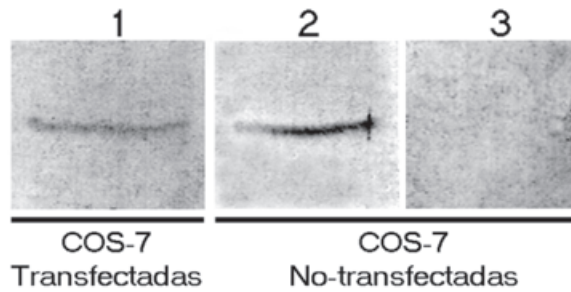


FIG. 30. Análisis por inmuno-electrotransferencia de los productos inmuno-precipitados del sobrenadante de cultivo de células COS-7 transfectadas transitoriamente con la construcción plasmídica pTC-wtVW2-1. Los sobrenadantes de cultivo de las células se incubaron con un anticuerpo IgG de ratón anti-recVW2-1 acoplado a esferas de sefarosa. Los productos inmuno-precipitados se resolvieron por electroforesis en gel de poliacríamida y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Las membranas fueron incubadas con el anticuerpo IgG de ratón anti-recVW2-1 y otro anticuerpo secundario IgG de conejo anti-IgG de ratón acoplado a peroxidasa, en presencia de diaminobenzidina para revelar la reacción. Carril 1: células transfectadas con pTC-wtVW2-1; carril 2: células no-transfectadas, adicionadas con recVW2-1 y carril 3: células no-transfectadas. Las bandas reveladas en los carriles 1 y 2 corresponden al peso molecular esperado de VW2-1.

Respuesta inmune por anticuerpos en ratones vacunados génicamente

Una forma de determinar que los ratones vacunados génicamente producían una respuesta inmune antígeno específica, consistió en detectar por ELISA la presencia de anticuerpos en circulación. Para estudiar la progresión y la magnitud de la respuesta por anticuerpos, se tomaron muestras de sangre de los ratones vacunados génicamente a diferentes tiempos. Se encontraron títulos altos de anticuerpos anti-recVW2-1 en ratones vacunados tanto con el vector pTC-wtVW2-1 como con el pCMV-synVW2-1 (Fig. 32). Encontramos que los anticuerpos antígeno-específicos comenzaron a producirse entre los quince y los treinta días después de la primera inmunización, y alcanzaron los niveles más altos a los cuarenta y cinco días aproximadamente (Fig. 32A). La caracterización de la respuesta por anticuerpos en ratones vacunados génicamente con el fragmento VW2-1 de la paramiosina, reveló la producción de inmunoglobulinas principalmente del isotipo IgG2a (Fig. 32D). A través de un ensayo de *western blot* se determinó que los anticuerpos generados en los ratones vacunados génicamente con la paramiosina, reaccionaron en contra de los productos recombinantes de la proteína y revelaron bandas de igual peso en extractos crudos de *T. solium* y *T. crassiceps* (ver Anexo 1, Fig. 1).

Los ensayos de inmunolocalización, con los sueros de los ratones vacunados génicamente con VW2-1, mostraron una localización de la paramiosina en cortes histológicos de cisticercos de *T. crassiceps* (Fig. 33),

similar a lo reportado anteriormente en cisticercos de *T. solium* [69].

La caracterización de la respuesta inmune por anticuerpos en ratones vacunados génicamente con calreticulina y TSOL18, también demostró la presencia de anticuerpos antígeno-específicos por ELISA y *western blot* (Fig. 34).

Respuesta inmune celular en ratones vacunados génicamente

La respuesta inmune celular desarrollada en los ratones vacunados génicamente se estudió mediante ensayos de proliferación *in vitro*, utilizando células extraídas del bazo de los ratones. Los esplenocitos de los ratones vacunados tanto con wtVW2-1 como con synVW2-1, presentaron índices de estimulación significativos, en presencia de diferentes concentraciones de recVW2-1 (Fig. 35A y Anexos 1 y 4).

Otra forma de evaluar la respuesta inmune celular de los ratones vacunados génicamente, consistió en cuantificar la producción de citocinas presentes en los sobrenadantes de cultivo de los esplenocitos estimulados con los antígenos recombinantes (Fig. 35B y ver Anexo 1, Cuadro 2). En el caso de los ratones vacunados génicamente con VW2-1, encontramos que los esplenocitos producen niveles altos de IFN γ y poca IL-4, en presencia de recVW2-1, lo cual junto con el perfil de isotipos de anticuerpos, indica una respuesta de tipo Th1.

Efecto in vivo de las modificaciones en el uso de codones para vacunación génica

Durante el proceso de la inmunización génica, los vectores plasmídicos inoculados en los tejidos del huésped utilizan la maquinaria de las células para llevar a cabo la síntesis de las proteínas codificadas. Algunos reportes indican que el cambio en el uso de las preferencias de codones de los genes clonados, para adaptarlo al organismo huésped, influye en el desarrollo de la respuesta inmune caracterizada por anticuerpos y células [85, 109]. Ello se debe a la disponibilidad de RNAs de transferencia en la maquinaria de síntesis de proteínas. Por ello, decidimos explorar esta posibilidad con el propósito de hacer más eficientes nuestras construcciones plasmídicas para vacunación génica. Se caracterizó el desenlace de la respuesta inmune en los ratones vacunados con una construcción que codifica para la secuencia silvestre del fragmento protector de la paramiosina VW2-1 (wtVW2-1) y otra que codifica para la secuencia codificadora sintética del mismo fragmento (synVW2-1). Encontramos que la producción de los anticuerpos

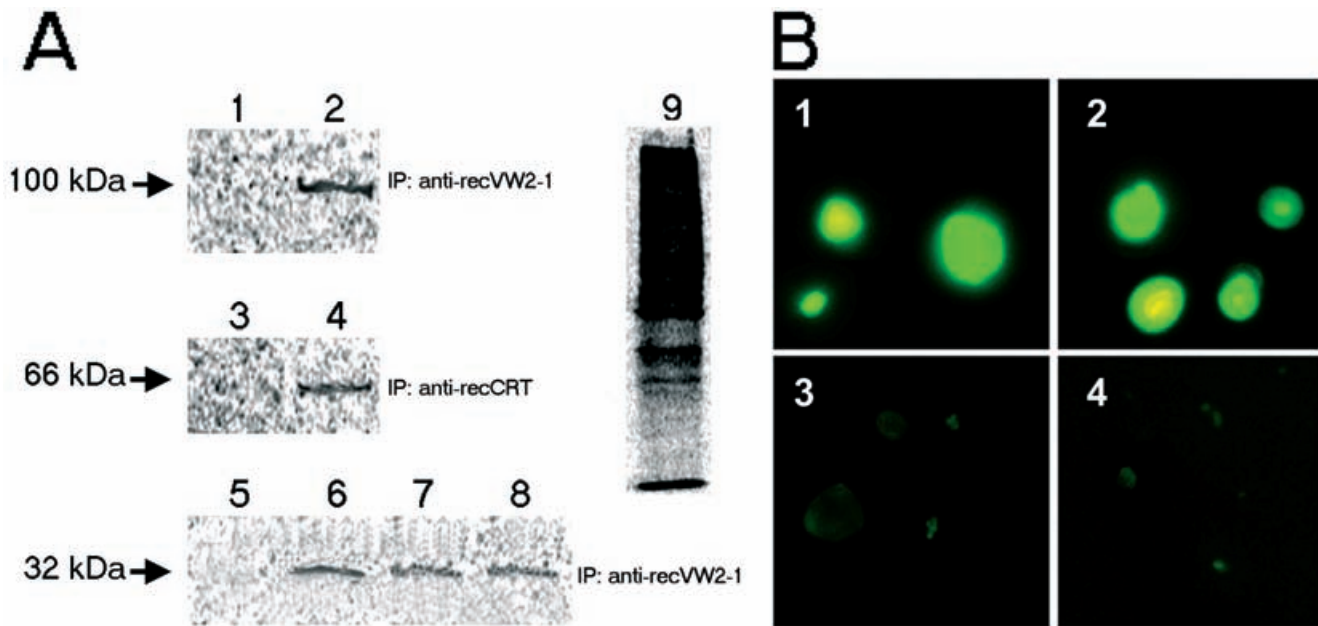


FIG . 31. Caracterización funcional de las construcciones plasmídicas que codifican para la paramiosina y la calreticulina de *Taenia solium*. (A) Autoradiografías de los productos inmuo-precipitados (IP) de los sobrenadantes de cultivo de células CHO transfectadas transitoriamente con las construcciones que expresan a la paramiosina completa (pTC-TPmy), a la calreticulina (pCMV-synCRT) y al fragmento VW2-1 de la paramiosina (pcDNA3-wtVW2-1; pTC-wtVW2-1; pCMV -synVW2-1). Carriles 1, 3 y 5: controles (células no-transfectadas); carril 2, células transfectadas con pTC-TPmy; carril 4, células transfectadas con pCMV-synCRT; carriles 6, 7 y 8, células transfectadas con pcDNA3-wtVW2-1, pTC-wtVW2-1 y pCMV -synVW2-1, respectivamente; carril 9, extracto crudo total de células CHO. Las bandas visualizadas corresponden al peso molecular esperado de las proteínas. (B) Inmuno-fluorescencia indirecta de células CHO transfectadas con dos de las construcciones que codifican para VW2-1. Las células fueron teñidas intracelularmente con un anticuerpo IgG de ratón anti-recVW2-1 y con un anticuerpo secundario IgG de conejo anti-IgG de ratón, acoplado a isotiocianato de fluoresceína (FITC). Micrografías 1 y 2: células transfectadas con pTC-wtVW2-1 y pCMV-synVW2-1, respectivamente; 3: células no-transfectadas y 4: células transfectadas con pTC-wtVW2-1 y tratadas únicamente con el anticuerpo secundario (resultados similares fueron obtenidos con pCMV-synVW2-1).

específicos para recVW2-1 fue más temprana en los ratones vacunados con synVW2-1 y alcanzaron niveles significativamente mayores a los encontrados en los ratones vacunados con wtVW2-1 (Fig. 32). Estas diferencias fueron más evidentes en experimentos de cuantificación de IgG específica para recVW2-1 (Fig. 32C). Los ensayos de proliferación que se llevaron a cabo con las células extraídas de los bazo de ratones vacunados con wtVW2-1 y synVW2-1, resultaron en mayores índices de estimulación en los ratones vacunados con el gen sintético (Fig. 35A). Estas evidencias apoyaron el uso de genes sintéticos en futuros ensayos de vacunación génica.

Vacunación génica en contra de la cisticercosis murina

Los primeros ensayos de vacunación en contra de la cisticercosis murina por *T. crassiceps* se realizaron utilizando las construcciones basadas en los vectores pcDNA3 y pTC, que codifican para la paramiosina o el fragmento VW2-1. También se incluyeron grupos de animales vacunados génicamente con VW2-1, junto con las secuencias codificadoras de IL-12 o IL-4.

En etapas tempranas de la infección, con cargas parasitarias bajas, se encontró que la vacunación génica con VW2-1 resultó en 66-79% de reducción de la carga parasitaria de los ratones infectados con *T. crassiceps* (ver Anexo 4, Fig. 3). La incorporación tanto de IL-12 como de IL-4 resultó en una reducción ligeramente mayor de la carga parasitaria en los ratones (datos no mostrados con IL-4). Cabe mencionar que el grupo de ratones vacunados con la paramiosina completa, junto con IL-12, solo indujo una reducción de 48% en la carga parasitaria de los animales.

Sin embargo, en etapas más avanzadas de la infección, con cargas parasitarias mayores, se encontró una disminución del 20-27% de la carga parasitaria de los ratones vacunados génicamente con VW2-1, tanto con el vector pTC como con el pcDNA3, a diferencia de los ratones vacunados con el producto recombinante de VW2-1, en donde no hubo efecto (Fig. 36). En contraste, los ratones vacunados génicamente con VW2-1, a los cuales además se les administraron los vectores que codifican para la IL-12, presentaron una disminución de la carga parasitaria mayor que fue del 46%.

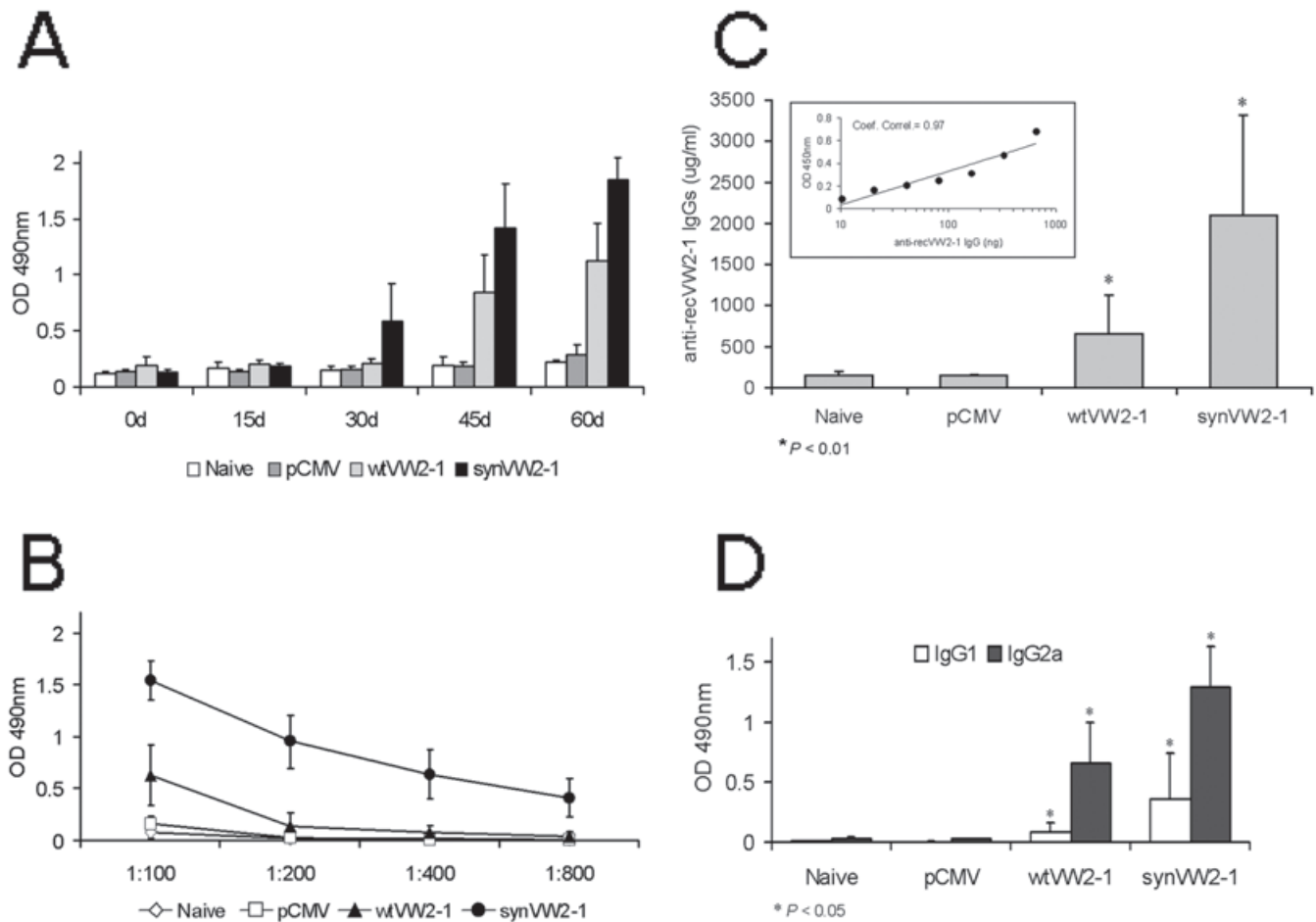


FIG. 32. Respuesta inmune por anticuerpos en ratones vacunados génicamente con wtVW2-1 y synVW2-1. Grupos de 8-12 ratones hembra Balb/c de 8-10 semanas de edad fueron inmunizados 3 veces con 100µg de DNA plasmídico, administrado por vía intramuscular a intervalos de 15 días. Se colectaron muestras de sangre a intervalos de 2 semanas. Los sueros obtenidos a partir de la sangre fueron analizados por ELISA (ver sección sobre Materiales y Métodos). (A) Desarrollo de la respuesta por anticuerpos evaluada en las muestras de los sueros que se utilizaron a una dilución de 1:100. (B) Titulación de los sueros colectados 45 días después de la inmunización inicial. (C) Cuantificación de anticuerpos IgG anti-recVW2-1 en los sueros de los grupos de ratones indicados, 45 días después de la inmunización inicial, utilizando una curva de referencia construida con una fracción purificada de IgG anti-recVW2-1. (D) Caracterización de los isotipos de anticuerpos IgG1 e IgG2a anti-recVW2-1, en los sueros de los grupos indicados, colectados 45 días después de la inmunización inicial. Los valores graficados son promedios ± desviaciones estándar. *Valores estadísticamente significativos ($P < 0.01$).

Ensayos iniciales mostraron que no se encontraron cisticercos en el peritoneo de los ratones vacunados con un régimen mixto de inmunización génica con VW2-1 y los vectores plasmídicos que codifican para IL-12 e IL-18, además de calreticulina y glutatión S-transferasa recombinantes (Fig. 37). La vacunación génica con calreticulina sola indujo en los ratones desafiados con *T. crassiceps*, una reducción de la carga parasitaria cercana al 38 %, similar a la inducida con la proteína recombinante (Fig. 38). En etapas intermedias de la infección, la vacunación génica de ratones con VW2-1 y calreticulina (synVW2-1 + synCRT), no resultó en una mayor disminución de la carga parasitaria (Fig. 39). En contrastes, en etapas tardías de la infección, synVW2-1 + synCRT sí resultaron en una disminución de la carga parasitaria, lo cual sugiere que hay una diferencia con relación a

la inmunidad inducida con estos dos antígenos administrados génicamente por separado (Fig. 40). Finalmente, los ensayos de vacunación génica con synVW2-1 en contra de la cisticercosis murina, que se llevaron a cabo a tiempos intermedios de la infección (80-100 cisticercos / ratón), resultaron en una disminución de 43-47%, similar a la obtenida con la proteína recombinante (ver Anexo 1, Cuadro 3).

Ensayos de vacunación en cerdos

Se llevaron a cabo ensayos de vacunación con VW2-1 en contra de la cisticercosis porcina, tanto por inmunización génica como por el producto recombinante de VW2-1 (Cuadro 7). Los resultados en ambos experimentos arrojaron resultados similares en cuanto a la disminución de la carga parasitaria de los animales. En ambos casos también se observó que

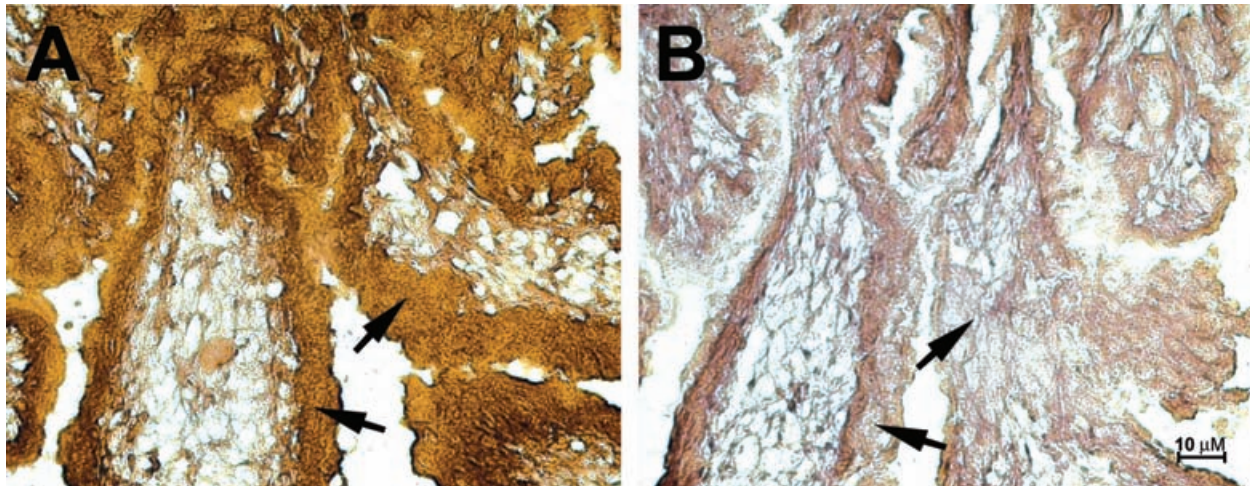


FIG. 33. Inmunolocalización de la paramiosina en los tejidos tegumentarios de cisticercos de *Taenia crassiceps*. Se incubaron secciones de cisticercos montadas en laminillas con los sueros de los ratones inmunizados génicamente con synVW2-1 (A) o con el vector vacío pCMV (B). Se utilizó un anticuerpo de pato anti-IgG de ratón biotinilado y se reveló la reacción con un conjugado de estreptavidina-peroxidasa. Se tiñeron las laminillas con hematoxilina como colorante de contraste. Las flechas indican las regiones del tegumento en donde la paramiosina es abundante.

entre los cerdos vacunados con VW2-1, se encontró una población correspondiente aproximadamente a la mitad de animales, con cargas parasitarias bajas. En el caso del experimento de vacunación génica, hubo grandes dificultades para encontrar las tenias para llevar a cabo la infección experimental de los cerdos. Por ello, se desafiaron a los animales cinco meses después de la inmunización génica. Además, se tuvieron que eliminar dos cerdos de cada grupo, debido al número reducido de huevos de *T. solium* disponibles en ese momento. Debido a la variabilidad de la carga parasitaria de los animales vacunados, así como el número reducido de cerdos incluidos en ambos experimentos, resultó difícil certificar los hallazgos realizados en el modelo murino de cisticercosis por *T. crassiceps*. Sin embargo, la reducción de la carga parasitaria promedio de los cerdos vacunados con VW2-1 sugiere que el efecto podría ser similar al se encontró en los ratones desafiados con *T. crassiceps*.

La caracterización inmunológica de los cerdos vacunados génicamente se llevó a cabo por ELISA para determinar la producción de anticuerpos. Se detectó la presencia de anticuerpos anti-recVW2-1, quince días después de la inmunización (Fig. 41). Estos anticuerpos alcanzaron su nivel más alto cuarenta y un días después de la inmunización, y se mantuvieron en circulación durante por lo menos cinco meses. Los anticuerpos inducidos por la vacunación génica, al igual que en el ratón, también reconocieron a los productos de la paramiosina en ensayos de *western blot* (Fig. 42). Un aspecto interesante de la respuesta inmune encontrada en los cerdos vacunados génicamente, a diferencia de los ratones, fue la heterogeneidad en

cuanto al perfil de isotipos de anticuerpos (Fig. 43). Un grupo mayoritario de cerdos presentó altos niveles de IgG1, asociado a un perfil tipo Th2, opuesto a lo encontrado en los ratones. Encontramos que solo uno de los cinco cerdos vacunados con synVW2-1 presentó una carga parasitaria alta, que además se asoció a la presencia de altos niveles de IgG2a anteriores al reto

CUADRO 7. Ensayos iniciales de protección en contra de la cisticercosis porcina, mediante inmunización génica con VW2-1 o con el producto recombinante^a

Expt N°	Inmunización	No. de cerdos	Carga parasitaria individual	Carga parasitaria promedio ^b	Efecto de la vacunación ^c (%)
1	Naive	5	14, 16, 26, 64, 127	49 ± 21	
	synVW2-1	5	0, 5, 14, 18, 110	29 ± 20	41 ^d
2	Naive	5	50, 121, 176, 184, 330	172 ± 103	
	recVW2-1	2	68, 97		52 ^d

^a Los ensayos de protección se llevaron a cabo en cerdos inmunizados génicamente con el fragmento VW2-1 de la paramiosina de *Taenia solium* (synVW2-1: Experimento 1), o bien con el producto recombinante (recVW2-1: Experimento 2), y desafiados por vía oral con huevos de *T. solium*.

^b Los valores son el promedio ± error estándar de las cargas parasitarias de los cerdos después de 60 días de infección.

^c La carga parasitaria de los cerdos control no-inmunes (naive), fue utilizada como el 100% de referencia para calcular el efecto de la vacunación.

^d El análisis de varianza de las cargas parasitarias de los cerdos control no-inmunizados, indicaron que la $n = 7$, por lo que no se pudo realizar la prueba estadística de los resultados.

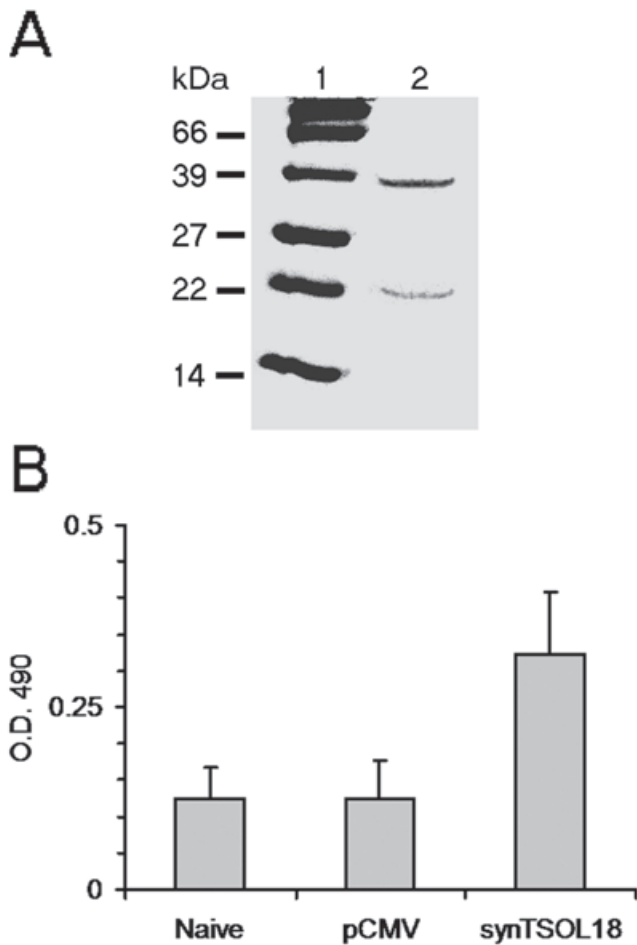


FIG. 34. Caracterización inicial de la respuesta por anticuerpos en ratones inmunizados génicamente con synTSOL18. Se inmunizó a un grupo de ratones Balb/c con la construcción pCMVsynTSOL18 (synTSOL18), siguiendo el mismo diseño experimental utilizado para wtVW2-1 y synVW2-1 (ver sección sobre Materiales y Métodos). Se constituyó un grupo de ratones control no-inmunizados (naive) y otro grupo de ratones control a los cuales se les administró el vector pCMV vacío. Se colectaron muestras de sangre de los grupos de ratones indicados a intervalos de 15 días después de la inmunización inicial. La producción de anticuerpos específicos para TSOL18 se evaluó a través de un ELISA. (A) Análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida de una fracción de recTSOL18 purificada por cromatografía de afinidad (ver sección sobre Materiales y Métodos). Carril 1: marcadores de peso molecular; carril 2: recTSOL18. El análisis electroforético de recTSOL18 reveló una banda con el peso molecular esperado del monómero (19 kDa), y otra banda que al parecer corresponde a la forma dimérica de la proteína (38kDa). Esta fracción purificada de recTSOL18 se utilizó para sensibilizar las placas de ELISA (100ng de proteína por pozo). (B) Respuesta por anticuerpos de tipo IgG específicos para recTSOL18, analizada 45 días después de la inmunización inicial en los sueros de los ratones inmunizados con synTSOL18. La dilución de los sueros utilizada para el ELISA fue de 1:100. Los datos graficados corresponden al promedio ± desviación estándar de 5 ratones.

(perfil Th1). Estas evidencias todavía preliminares, sugieren que los componentes protectores de la respuesta inmune media por la paramiosina son

CUADRO 8. Ensayos de protección con los productos recombinantes de paramiosina de *Taenia solium* en el modelo murino de cisticercosis por *T. taeniformis*^a

Expt N°	Vacunación	N° de ratas	x ± D.E ^b	Protección (%) ^c
Exp. 1	Alúmina	6	106 ± 31	
	recVW2-1	4	187 ± 59	
Exp. 2	Alúmina	3	193 ± 66	
	recVW4-1	6	185 ± 36	
Exp. 3	Alúmina	6	26 ± 6	61 ^d
	recVW5-3	8	10 ± 2	
	recVW6-1	4	12 ± 5	53 ^d
Exp. 4	Alúmina	6	41 ± 10	
	recVW6-1	6	24 ± 11	41 ^d
Exp. 5	Alúmina	6	66 ± 55	
	recVW5-3	6	54 ± 35	

^a Grupos de ratas Wistar fueron inmunizadas dos veces por vía i.p. a intervalos de 15 días con los fragmentos recombinantes de la paramiosina de *Taenia solium* (ver Anexo 2, Fig. 1 y Anexo 6, Fig. 1). La dosis de proteína por inmunización fue de 25µg adsorbidos a alúmina. Quince días después del refuerzo, los animales fueron desafiados por vía oral con 100-500 huevos de *T. taeniformis*. El efecto de la inmunización sobre la carga parasitaria de los animales se evaluó después de 2 meses de infección.

^b Los datos representan el promedio de la carga parasitaria de las ratas ± error estándar.

^c El porcentaje de protección se midió como una disminución de la carga parasitaria de los grupos vacunados con relación al grupo control, al que únicamente se le administró el adyuvante alúmina.

^d Estadísticamente significativo por análisis de varianza (Anova) P < 0.05.

distintos entre la cisticercosis murina por *T. crassiceps* en el ratón y por *T. solium* en el cerdo.

Cabe también mencionar que los resultados iniciales de vacunación en contra de la cisticercosis hepática por *T. taeniformis* en ratas, con gran similitud a la cisticercosis porcina en cuanto al proceso de infección, revelaron una localización distinta de los componentes protectores a lo largo de la paramiosina de *T. solium*, con relación a los hallazgos realizados en el modelo de cisticercosis murina por *T. crassiceps* en el ratón (Cuadro 8). Encontramos que la inmunización con los fragmentos recombinantes de la paramiosina correspondientes a dos tercios hacia el extremo amino terminal (recVW5-3) y dos tercios hacia el extremo carboxilo terminal (recVW6-1) indujeron 61 y 53 % respectivamente de reducción en la carga parasitaria de los animales, mientras que los fragmentos recombinantes correspondientes a los tercios amino y carboxilo terminales no tuvieron efecto alguno. Estos resultados indican que el efecto protector en otros modelos experimentales de cisticercosis amerita un análisis cuidadoso y que las pruebas de vacunación en cerdos son fundamentales para certificar los hallazgos realizados en dichos modelos.

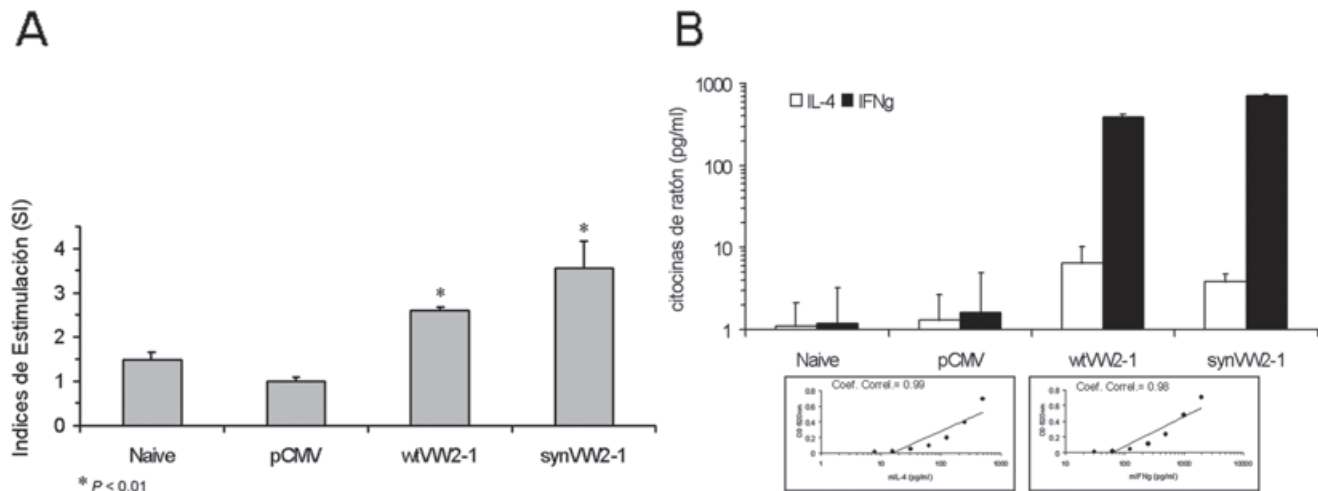


FIG. 35. Respuesta celular de los ratones inmunizados génicamente con wtVW2-1 y synVW2-1. (A) Proliferación típica de células T determinada por incorporación de ^3H -thimidina, 72 horas después de cultivarlas en presencia de recVW2-1 ($5\mu\text{g/ml}$) o de concanavalina A (ConA) ($1\mu\text{g/ml}$) como control. Las células de los bazo de tres ratones incluidos en cada grupos, fueron obtenidas 45 días después de la inmunización inicial y mezcladas. (B) Cuantificación de interferon(IFN) γ e interleucina(IL)-4 en los sobrenadantes de cultivo de células de bazo cultivadas durante 72 horas en presencia de $10\mu\text{g/ml}$ de recVW2-1. La cuantificación se hizo a partir de curvas de referencia construidas con cantidades conocidas de IFN- γ e IL-4. Los valores graficados corresponden a promedios \pm desviaciones estándar de triplicados representativos de por lo menos dos experimentos.

Las pruebas de vacunación en contra de la cisticercosis hepática por *T. taeniformis* en ratas no se utilizó mas, debido a las grandes dificultades para mantener este modelo experimental de cisticercosis en el laboratorio, tal y como se menciona en la introducción.

En consecuencia, los esfuerzos actuales (no incluidos en la presente tesis) son dirigidos a llevar a cabo nuevas pruebas de vacunación génica en cerdos, basadas en la paramiosina de *T. solium* y otros antígenos potencialmente protectores.

DISCUSIÓN

En el presente trabajo de tesis, se evaluó el potencial protector de la paramiosina de *T. solium* como candidato a vacuna en contra de la cisticercosis. También se aportaron las evidencias iniciales del potencial protector de la calreticulina, otro antígeno de *T. solium*. Para tal efecto se emplearon varias estrategias de vacunación que incluyeron el uso de proteínas recombinantes y vacunación génica.

La paramiosina resulta un blanco para la respuesta inmune del huésped cisticercoso, ya que se expresa ampliamente en los tejidos de cisticerco (Fig. 33) [69]. Este antígeno tiene además la interesante propiedad de inhibir la vía clásica de la cascada del complemento al unirse al C1q [70]. Los hallazgos recientes, realizados en colaboración con otro grupo de investigación, sugieren que también podría tratarse de una proteína con propiedades pro-apoptóticas (ver

Anexo 2). Por ello, nuestro grupo ha propuesto que la paramiosina de *T. solium* participa en una posible estrategia de modulación de la respuesta inmune del huésped cisticercoso. La hipótesis inicial es que la inmunización con paramiosina de ratones o cerdos, podría resultar en una disminución de la carga parasitaria posterior a un reto con cisticercos o huevos. La paramiosina también ha sido propuesta como candidato a vacuna en contra de otras enfermedades parasitarias como son la esquistosomiosis y filariasis [96, 120, 153, 181].

En este trabajo de tesis, se estudió el efecto de la vacunación con recTPmy y sus fragmentos en contra de la cisticercosis murina por *T. crassiceps* en el ratón. Los resultados encontrados en este modelo, revelaron un efecto significativo en la disminución de la carga parasitaria de los ratones que fue de alrededor del 40-60% (Cuadro 5 y Anexo 2, Cuadro 1). La protección inducida por la recTPmy se asocia principalmente con el fragmento amino terminal de la paramiosina llamado VW2-1. Otros grupos han adoptado el modelo murino de cisticercosis por *T. crassiceps* para evaluar el potencial protector de antígenos candidatos a vacuna en contra de la cisticercosis [94, 127, 165].

Se enfatizó en la caracterización del desenlace de la respuesta inmune protectora que se asocia a un perfil Th1 (ver Anexo 5), lo cual es consistente con los hallazgos realizados por otros grupos [156, 157, 170]. Se ha reportado que el tratamiento de ratones con IFN- γ e IL-2 resulta en cargas parasitarias bajas, mientras la IL-10 induce un incremento significativo en

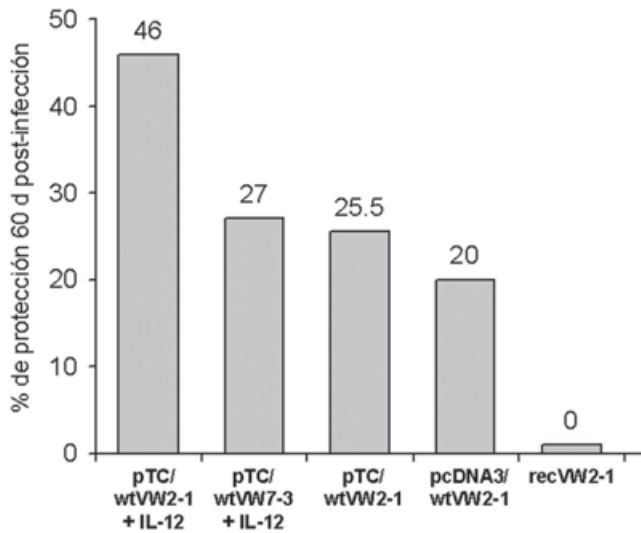


FIG 36. Comparación entre los niveles de reducción de la carga parasitaria de los ratones vacunados génicamente con la paramiosina de *T. solium* o con el fragmento VW2-1, con o sin IL-12. Se vacunaron a grupos de 8 ratones con las construcciones que expresan a la paramiosina (pTC-TPmy) o al fragmento VW2-1 (pTC-wtVW2-1 o pcDNA3-wtVW2-1) tres veces a intervalos de 15 días con 100µg de DNA plasmídico. Los ratones se desafiaron un día después de la última inmunización con 10 cisticercos de *Taenia crassiceps* por vía intraperitoneal. En los grupos indicados se co-administraron los vectores pEDP35 y pEDP 40 que codifican para las subunidades P35 y P40 de la IL-12. También se incluyó un grupo de ratones inmunizados con el fragmento VW2-1 recombinante (recVW2-1) adsorbido a alúmina como adyuvante, siguiendo el mismo esquema de inmunización. Los animales fueron sacrificados 60 días después del desafío con cisticercos. Los porcentajes de reducción de la carga parasitaria (protección) fueron calculados tomando como el 100% la carga parasitaria de los animales control a los cuales únicamente se les administró solución salina (vacunación génica) o el adyuvante alúmina (vacunación con recVW2-1).

la carga parasitaria [155]. También se ha propuesto que una respuesta asociada a un perfil Th1 interfiere en el establecimiento de *T. solium*, en pruebas de vacunación en el campo, en contra de la cisticercosis porcina [32].

El estudio de la proliferación celular en ratones, utilizando los diferentes fragmentos recombinantes de la TPmy, revelaron una respuesta preferencial hacia el extremo amino terminal de la proteína, lo cual sugiere que los principales epítomos T se encuentran en esta región de la proteína (ver Anexo 5, Cuadro 3). Un estudio similar realizado con células mononucleares de sangre periférica tomadas de pacientes neurocisticercosos, no reveló un reconocimiento preferencial hacia alguno de los fragmentos recombinantes de la TPmy. Sin embargo, estas mismas células, tomadas de pacientes sanos que radican en regiones endémicas, proliferan principalmente en presencia de los fragmentos amino terminal y central de la TPmy, lo cual sugiere un desenlace diferencial

de la respuesta inmune en individuos susceptibles y resistentes (ver Anexo 6, Cuadro 1). Distintos perfiles inmunológicos en individuos igualmente expuestos, también han sido relacionados con el desenlace de la neurocisticercosis humana [22].

En un estudio reciente, se aportaron evidencias en cuanto a la presencia de un epítipo T CD4+ a lo largo del fragmento VW2-1, abarcando los aminoácidos 176 a 192 de la TPmy [89], aunque queda por demostrar si este participa en la respuesta protectora Th1 en contra de la cisticercosis murina.

Con base en la caracterización de la respuesta inmune inducida por los diferentes fragmentos de la paramiosina en humanos, cerdos y ratones, los ensayos de vacunación subsecuentes se basaron principalmente en el fragmento VW2-1 de la paramiosina de *T. solium*.

Dentro del desarrollo de una vacuna en contra de la cisticercosis, también se buscó incorporar otros antígenos con potencial protector en colaboración con otros grupos de investigación. Ensayos iniciales de protección, en ratones vacunados con la calreticulina recombinante de *T. solium*, revelaron niveles de protección cercanos al 40% en contra de la cisticercosis murina.

Sin embargo, el uso de la inmunización génica permitió incorporar en forma relativamente sencilla varios antígenos. Dentro de esta nueva estrategia de vacunación se puso especial atención en el desarrollo y optimización de los vectores plasmídicos de expresión eucarionte que codifican para la paramiosina y la calreticulina de *T. solium*, así como para otros antígenos de probada capacidad protectora, como son TSOL18 [39] y glutatión-s-transferasa [169].

Se probaron tres diferentes vectores (pcDNA3, pTC y pCMV), previamente utilizados en forma exitosa para la expresión *in vitro*, así como para la inmunización génica en mamíferos [20, 90]. Las primeras construcciones se basaron en los vectores pcDNA3 y pTC a los cuales se les insertó la secuencia silvestre del fragmento protector de la TPmy denominado VW2-1 (wtVW2-1). Sin embargo, el vector comercial pcDNA3 se descartó rápidamente, debido al bajo rendimiento de purificación, probablemente a causa del origen de replicación bacteriano que resulta en un bajo número de copias.

Mediante las técnicas de construcción de genes [150], se desarrolló una secuencia sintética que codifica para VW2-1 adaptada a la preferencia en el uso de codones en células de mamífero (synVW2-1), y se insertó en el vector pCMV. Las pruebas de expresión *in vitro* tanto con wtVW2-1 como con synVW2-1, mostraron una buena expresión de paramiosina. También se encontraron altos niveles de anticuerpos en ratones inmunizados génicamente con wtVW2-1 y synVW2-1, aunque el uso del gen sintético resultó en

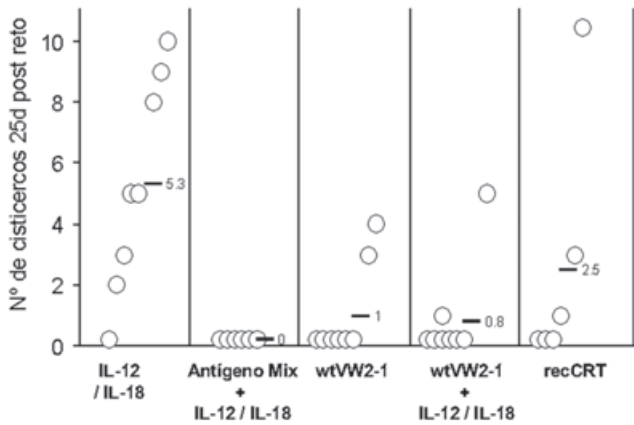


FIG . 37. Ensayo de protección con un régimen mixto de inmunización génica mas interleucinas y calreticulina de *T. solium* recombinante (recCRT). Se vacunaron a grupos de 8 ratones dos veces a intervalos de 15 días con el vector pTC-wtVW2-1 solo (wtVW2-1), o co-administrado con los vectores que codifican para IL-12 e IL-18 (wtVW2-1 + IL-12/IL-18). A otro grupo de ratones se les vacunó con wtVW2-1 + IL-12/IL-18, junto con la calreticulina de *T. solium* recombinante (Antígeno mix). Al grupo de ratones control únicamente se les administraron los vectores plasmídicos que codifican para IL-12 e IL-18. También se incluyó otro grupo de ratones inmunizados con recCRT. Se desafiaron a los animales 15 días después del refuerzo y se sacrificaron a los 25 días de infección. Los círculos representan las cargas parasitarias individuales y las barras negras el promedio de cada grupo.

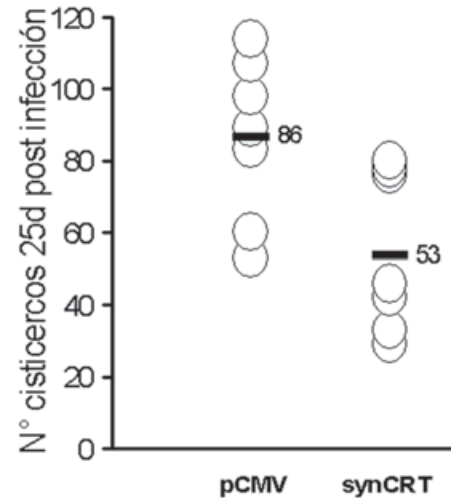


FIG 38. Ensayo de vacunación génica con calreticulina de *Taenia solium* (synCRT) en contra de la cisticercosis murina por *T. crassiceps*. Los ratones fueron vacunados tres veces a intervalos de 15 días con la construcción plasmídica pCMV-synCRT (synCRT) y desafiados 15 días después. Al grupo control únicamente se le administró el vector vacío (pCMV). Los animales fueron sacrificados 25 días después del desafío. Los círculos representan las cargas parasitarias individuales y las barras negras el promedio de cada grupo.

forma consistente en mayores niveles de anticuerpos. Se reportó anteriormente que la adaptación en el uso de los codones p para mamífero de la secuencia de interés, generalmente resulta en una mejor expresión y/o niveles mayores de anticuerpos antigénico específicos [85, 109]. Siguiendo el mismo procedimiento de síntesis de genes, también se construyeron las secuencias codificadoras de los antígenos TSOL18, calreticulina y glutatión-S-transferasa, con la idea de utilizarlos conjuntamente para inducir sinergias protectoras que resulten en una vacuna altamente protectora. Las secuencias codificadoras obtenidas se insertaron posteriormente en el vector pCMV. Además, se sintetizaron las secuencias codificadoras de algunas citocinas del cerdo y del ratón que fueron también insertadas en el pCMV para utilizarse como agentes co-adyuvantes que modulen la respuesta inmune. Varios reportes indican que el uso de vectores que codifican p para citocinas permiten orientar la respuesta inmune hacia el perfil Th1 o Th2 [114]. Cabe mencionar que, aprovechando el diseño original de algunas de las construcciones hechas en el pTC [90], anteriormente habíamos desarrollado construcciones que codifican para VW2-1 como un producto de fusión con IL-12 o IL-4.

Los anticuerpos que se indujeron en respuesta a la inmunización génica con wtVW2-1 y synVW2-1 fueron capaces de reconocer a la paramiosina recombinante

completa y al fragmento amino terminal de la TPmy, así como la paramiosina presente en extractos crudos de cisticercos de *T. solium* y *T. crassiceps*. La similitud antigénica entre las dos especies de tenidos ya ha sido reportada anteriormente [140]. Además, se ha reportado reacción cruzada entre paramiosinas obtenidas de invertebrados distantes en la escala filogenética [70].

La inmunización génica de ratones con VW2-1 resultó en una respuesta celular significativa (ver Anexo 1, Cuadro 2 y Anexo 4, Cuadro 5): Las células extraídas de los bazo de ratones inmunizados respondieron claramente al ser estimuladas con recVW2-1. La caracterización de la respuesta inmune en los ratones vacunados génicamente con VW2-1, resultó en un perfil Th1, similar al encontrado con la proteína recombinante.

Al respecto de la posibilidad de utilizar citocinas para modular la respuesta inmune, nuestros resultados iniciales mostraron que la inmunización génica con wtVW2-1 más IL-12 no resultó, de acuerdo al perfil de isotipos de anticuerpos IgG1/IgG2a, en un perfil Th1 cuantitativamente superior al encontrado en ratones inmunizados únicamente con wtVW2-1. Inesperadamente, la construcción que codifica para wtVW2-1 junto con la IL-4, tampoco produjo un perfil tipo Th2. Lo anterior sugiere que las interleucinas no se expresan debidamente o que no ejercen el papel

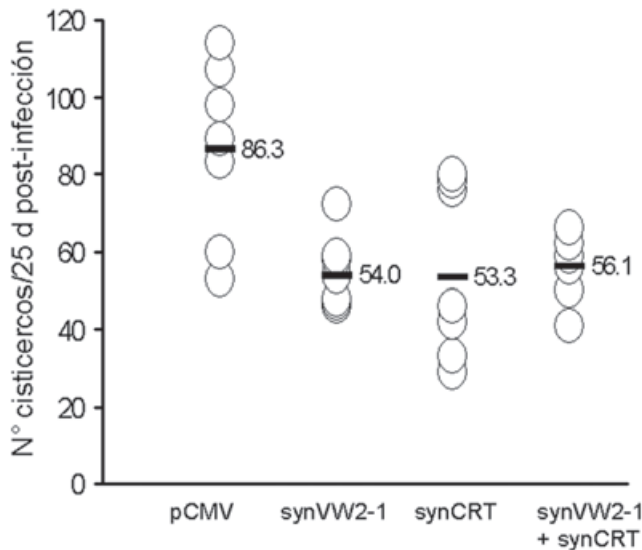


FIG . 39. Ensayo de vacunación génica en contra de la cisticercosis murina por *Taenia crassiceps*, en ratones inmunizados con la calreticulina y el fragmento VW2-1 de la paramiosina de *T. solium*. Los ratones fueron vacunados tres veces a intervalos de 15 días con las construcciones plasmídicas pCMV-synVW2-1 (synVW2-1) y pCMV-synCRT (synCRT), y desafiados 15 días después por vía intraperitoneal con 10 cisticercos de *T. crassiceps*. Se incluyó un grupo de ratones a los cuales se les administró de manera conjunta synVW2-1 y synCRT. Al grupo de ratones control únicamente se les administró el vector vacío (pCMV). Los animales fueron sacrificados 25 días después del desafío. Los círculos representan las cargas parasitarias individuales y las barras negras el promedio de cada grupo.

modulador esperado. Se requieren experimentos subsecuentes para explorar ambas posibilidades.

El efecto de la vacunación génica en contra de la cisticercosis murina por *T. crassiceps* se estudió en diferentes tiempos de la infección. En etapas tempranas de la infección (cuando la carga parasitaria es menor de 20 cisticercos por ratón), se encontró que los ratones vacunados génicamente con wtVW2-1 muestran una disminución de la carga parasitaria de 66%. El uso del vector que codifica para wtVW2-1 como un producto de fusión con IL-12, no resultó en un incremento significativo de la protección. En contraste, los ratones vacunados con una mezcla de los antígenos de *T. solium* (synVW2-1, synCRT), junto con los vectores que codifican para la IL-12 e IL-18, condujo a una protección cercana al 100%. Estos resultados sugieren que la protección se debe más a la respuesta inmune en contra de los antígenos que a la modulación esperada de las interleucinas. Se trata pues de ensayos preliminares que merecen subsecuente exploración.

Por otra parte, en etapas intermedias de la infección por *T. crassiceps* (cuando la carga parasitaria es cercana a los 100 cisticercos por ratón: similar al rango estudiado en los ratones vacunados con los productos recombinantes de la TPmy), se encontró que la disminución de la carga parasitaria en los ratones

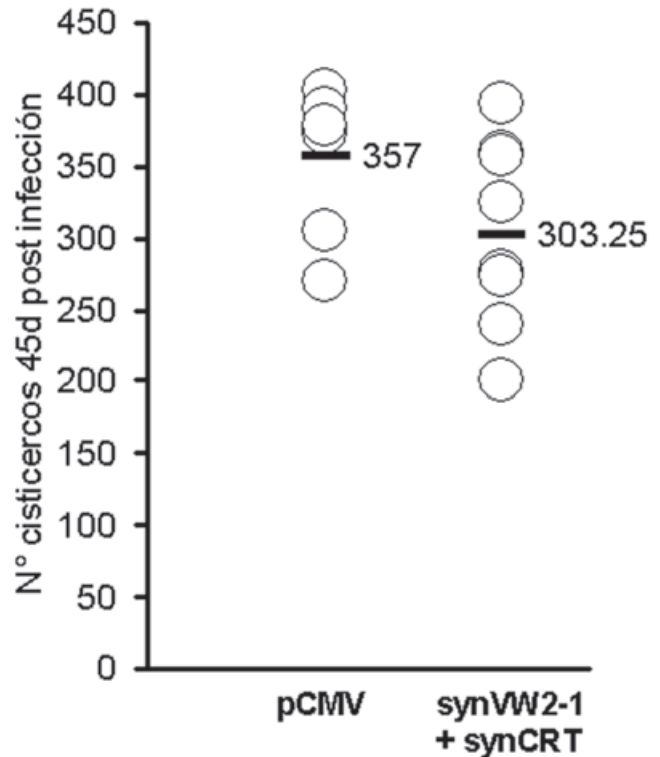


FIG . 40. Ensayo de vacunación génica en contra de la cisticercosis murina por *Taenia crassiceps*, en etapas tardías de la infección, en ratones inmunizados con la calreticulina y el fragmento VW2-1 de la paramiosina de *T. solium*. Los ratones fueron vacunados dos veces a intervalos de 15 días con las construcciones plasmídicas pCMV-synVW2-1 (synVW2-1) y pCMV -synCRT (synCRT), y desafiados 15 días después por vía intraperitoneal con 10 cisticercos de *T. crassiceps*. Al grupo control únicamente se le administró el vector vacío (pCMV). Los animales fueron sacrificados 45 días después del desafío. Los círculos representan las cargas parasitarias individuales y las barras negras el promedio de cada grupo.

vacunados génicamente con wtVW2-1 y synVW2-1 fue del 40-50%, similar a los niveles alcanzados con la proteína recombinante sola. Niveles similares en la disminución de la carga parasitaria de alrededor del 40% se encontraron en los ratones vacunados génicamente con calreticulina.

Finalmente, en etapas tardías de la infección (cuando la carga parasitaria es mayor de 200 cisticercos por ratón), el efecto de la vacunación génica con VW2-1, produjo una disminución mínima de alrededor del 15-20%, aunque mayor a la alcanzada con el producto recombinante que no tuvo efecto en estas condiciones. La co-administración de los vectores que codifican para las subunidades P35 y P40 de la IL-12, junto con el vector que codifica para wtVW2-1, significó en una disminución ligeramente mayor de la carga parasitaria, lo cual sugiere que la modulación de la respuesta con citocinas podría ser importante. El efecto conjunto de los antígenos VW2-1 y calreticulina no resultó, en etapas tardías de la

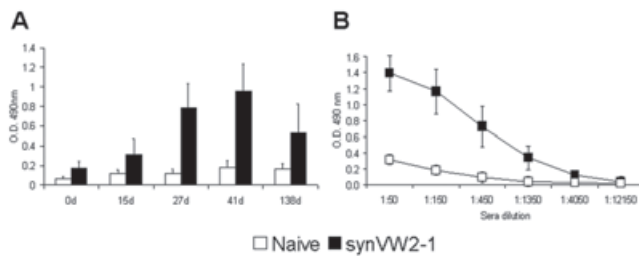


FIG41. Respuesta inmune por anticuerpos en cerdos vacunados genéticamente con synVW2-1. Grupos de 7 cerdos de la raza *York* fueron inmunizados tres veces a intervalos de 15 días. Se colectaron muestras de sangre en los tiempos indicados. Los sueros obtenidos a partir de las muestras de sangre fueron analizados por ELISA, utilizando recVW2-1 (ver Materiales y Métodos). (A) Desarrollo de la respuesta por anticuerpos evaluada en las muestras de los sueros diluidos 1:500. (B) Titulación de los sueros colectados 41 días después de la inmunización inicial.

infección, en una mayor disminución de la carga parasitaria con relación al uso de VW2-1 sola. La colección de construcciones plasmídicas que inducen la expresión de interleucinas están disponibles en nuestro laboratorio para estudios futuros.

Los estudios preliminares de vacunación en cerdos inmunizados por los métodos convencionales con recVW2-1 o por inmunización génica con synVW2-1, resultaron en aproximadamente 50% de reducción en la carga parasitaria.

En resumen, diferentes protocolos de inmunización basados en la paramiosina y sus derivados resultaron en niveles consistentes de protección que podrían ser utilizados en combinación con agentes inmunomoduladores como citocinas o con otros antígenos para desarrollar una vacuna efectiva en contra de la cisticercosis. Cabe mencionar que otro grupo de investigación, reportó niveles significativamente superiores en la disminución de la carga parasitaria de 85-99%, en cerdos vacunados genéticamente con la paramiosina completa, en contra de la cisticercosis por *T. solium* [16]. Sin embargo, no ha habido continuidad en los reportes de ese grupo lo que plantea una duda acerca de la reproducibilidad del hallazgo.

Las pruebas recientes de vacunación en cerdos, utilizando una gran variedad de estrategias que van desde el uso de extractos crudos de oncosfera [167], péptidos sintéticos [59], proteínas recombinantes [39], fagos [93] e inmunización génica [51, 171], ostentan niveles sorprendentemente altos de protección, cercanos al 100%. Sin embargo, las dificultades intrínsecas para llevar a cabo la infección experimental de los cerdos, y en particular, la dificultad para localizar pacientes teniásicos y obtener los huevos de *T. solium*

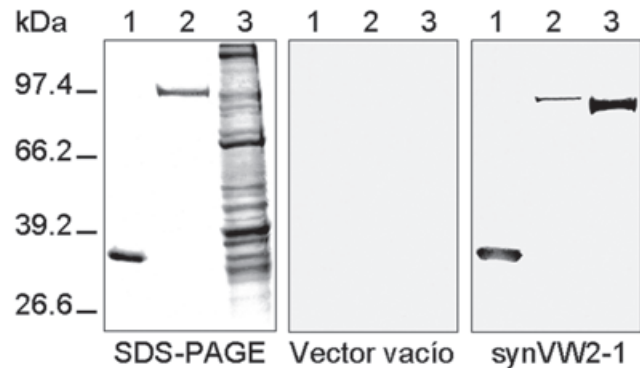


FIG 42. Reconocimiento de la paramiosina por los sueros de los cerdos vacunados genéticamente con synVW2-1. Se resolvieron muestras del fragmento VW2-1 recombinante (recVW2-1, carril 1), de la paramiosina completa recombinante (recTPmy, carril 2), y de un extracto crudo de *T. solium* (carril 3) por electroforesis en gel (SDS-PAGE) (panel izquierdo), transferidas a membranas de nitrocelulosa, e incubadas con una mezcla de los sueros de tres cerdos (tomados al azar) de cada grupo, colectados 41 días después de la inmunización inicial, diluidos 1:1000.

para llevar a cabo el desafío oral de los cerdos, ha forzado a la mayor parte de los grupos a utilizar números reducidos de animales en los experimentos. Por otra parte, buenos candidatos a vacuna en contra de la cisticercosis porcina como son TSOL18 [39] o de cC1 [51], únicamente se expresan en el estadio oncosférico o larvario respectivamente. Por ello, el uso individual de estos candidatos dificulta el desarrollo de una vacuna de amplio espectro. En el caso de las pruebas de campo, en condiciones no controladas, las vacunas requieren de mostrar propiedades tanto profilácticas (en contra de la infección con huevos)

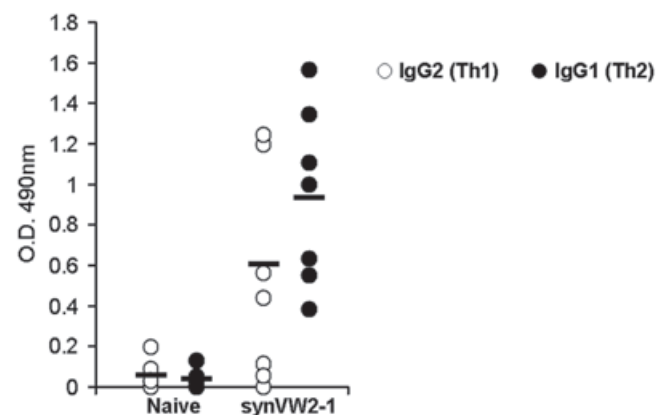


FIG 43. Perfil de isotipos de anticuerpos anti-recVW2-1 en cerdos inmunizados genéticamente con synVW2-1. Se analizaron por ELISA los sueros colectados 41 días después de la inmunización inicial, utilizando anticuerpos secundarios específicos para las inmunoglobulinas de los isotipos IgG1 e IgG2 del cerdo (ver Materiales y Métodos). A los animales control (naive), únicamente se les administró solución salina. Los círculos representan niveles individuales de anticuerpos del isotipo indicado.

como terapéuticas (en contra del cisticerco) puesto que algunos cerdos ya tienen la infección antes de iniciar la aplicación de la vacuna.

En nuestra opinión, la búsqueda de una vacuna en contra de la cisticercosis no ha concluido a pesar de que nuestros resultados y los de otros grupos sugieren que es posible desarrollar una vacuna altamente protectora. En este sentido, una vacuna multi-funcional, que incluya varios antígenos protectores (de oncosfera y del cisticerco), podría ser la forma de producir una vacuna de amplio espectro, tanto profiláctica como terapéutica, que contribuya efectivamente al control de la teniosis/cisticercosis.

Finalmente, un valor agregado del presente trabajo de tesis es el desarrollo de una colección de construcciones plasmídicas con secuencias codificadoras de varios antígenos (paramiosina, calreticulina, TSOL18, glutatión-S-transferasa) e interleucinas del cerdo y del ratón (IL-4, IL-12, IL18, IFN- γ), que debido a las limitaciones temporales de un proyecto doctoral no se exploraron cabalmente. Actualmente se prueban en nuestro laboratorio y serán materia de reportes futuros.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco el apoyo económico por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), y por parte de la Dirección General de Estudios de Posgrado (DGEP) de la UNAM para la realización de mis estudios de doctorado. Agradezco en forma muy especial al Dr. Juan Pedro Laclette por su apoyo, sus enseñanzas y sus valiosos consejos a lo largo del doctorado. Agradezco a la Dra. Ana Flisser y a la Dra. Edda Sciutto por formar parte de mi comité tutorial. Agradezco a los Drs. Charles B. Shoemaker y Patrick Skelly de la Escuela de Salud Pública de Harvard, así como al Dr. Stephen A. Johnston de la Universidad de Texas por permitirme llevar a cabo estancias de investigación en sus respectivos laboratorios, como parte de mis estudios de doctorado. Agradezco en estricto orden de antigüedad a mis compañeros de laboratorio José Vázquez, Laura Vargas, Pedro Ostoa, Haydée Lugo, Fela Mendlovic y Adrián R. Díaz quienes han participado con gran entusiasmo en este proyecto. También agradezco a los miembros de mi jurado de examen (Dra. Kaethe Williams, Dr. Miguel Angel Cevallos, Dr. José Moreno, Dra. Leticia Rocha, Dr. Alfonso Dueñas, Dr. Karlen Gazarian) por sus valiosas observaciones sobre esta tesis y que contribuyeron a mejorar el manuscrito.

REFERENCIAS

1. ACEVEDO-HERNANDEZ A. (1982). Economic impact of porcine cysticercosis. *Cysticercosis: Present State of Knowledge and Perspectives*. Academic Press, Inc. p 63.
2. ACOSTA-RIVERO N, DUENAS-CARRERA S, ALVAREZ-LAJONCHERE L, MORALES-GRILLO J. (2004). HCV core protein-expressing DNA vaccine induces a strong class I-binding peptide DTH response in mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 314: 781-786.
3. AGAPEJEV S. (2003). [Clinical and epidemiological aspects of neurocysticercosis in Brazil: a critical approach] [Article in Portuguese]. *Arq Neuropsiquiatr*. 61: 822-828.
4. AHMED SB, BAHLOUL C, ROBBANA C, ASKRI S, DELLAGI K. (2004). A comparative evaluation of different DNA vaccine candidates against experiment al murine leishmaniasis due to *L. major*. *Vaccine*. 22: 1631-1639.
5. ALIAGA F, CONTRERAS MC, MERCADO Y, STEGMEIER H, IBACACHE J, VARGAS R, NOV A J, NANCO J, NEIRA J, PAREDES E. (1994). [Seroepidemiological investigation of various tissue helminthiasis, by means of indirect hemagglutination test, in Lonquimay County, Chile] [Article in Spanish]. *Bol Chil Parasitol*. 49: 43-45.
6. AMARAL L, MASCHIE TTO M, MASCHIETT O R, CUR Y R, FERREIRA NF, MENDONCAR, LIMA SS. (2003). Unusual manifestations of neurocysticercosis in MR imagng: analysis of 172 cases. *Arq Neuropsiquiatr*. 61: 533-541.
7. AMBROSIO J, LANDAA, MERCHANT MT, LACLETTE JP. (1994). Protein uptake by cysticerci of *Taenia crassiceps*. *Arch Med Res*. 25: 325-330.
8. AYUYA JM, WILLIAMS JF. (1979). The immunological response of the rat to infection with *Taenia taeniaeformis*. VII. Immunization by oral and parental administration of antigens. *Immunology*. 36: 825-834.
9. BAHLOUL C, AHMED SB, B'CHIR BI, KHARMACHI H, HAYOUNI EL A, DELLAGI K. (2003). Post-exposure therapy in mice against experiment al rabies: a single injection of DNA vaccine is as effective as five injections of cell culture-derived vaccine. *Vaccine*. 22: 177-184.
10. BAILY GC, MASSON PR. (1988). Serological diagnosis of neurocysticercosis: evaluation of ELISA test using cyst fluid and other components of *Taenia solium* cysticerci as antigens. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg*. 82: 295.
11. BARTHOLDY C, STRYHN A, CHRISTENSEN JP, THOMSEN AR. (2004). Single-epitope DNA vaccination prevents exhaustion and facilitates a broad antiviral CD8+ T cell response during chronic viral infection. *J Immunol*. 173: 6284-6293.
12. BERN C, GARCIA H H, EVANS C, GONZALEZ AE, VERASTEGUI M, TSANG VC, GILMAN RH. (1999). Magnitude of the disease burden from neurocysticercosis in a developing country. *Clin Infect Dis*. 29: 1203-1209.
13. BOAM, MUKARATIRWA S, WILLINGHAMAL, JOHANSEN MV. (2003). Regional action plan for combating *Taenia solium* cysticercosis/taeniosis in Eastern and Southern Africa. *Acta Trop*. 87: 183-186.
14. BOYLE CM, ROBINSON HL. (2000). Basic mechanisms of DNA-raised antibody responses to intramuscular and gene gun immunizations. *DNA Cell Biol*. 19: 157-165.
15. BRAGAZZA LM, VAZ AJ, PASSOS AD, TAKAYANAGUI OM, NAKAMURA PM, ESPINDOLANM, PARDINIA, BUENO EC. (2002). Frequency of serum anti-cysticercus antibodies in the population of a rural Brazilian community determined by Elisa and immunoblotting using *Taenia crassiceps* antigens. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 44: 7-12.
16. CAI X, CHAI Z, JING Z, WANG P, LUO X, 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. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 32: 105-110.
17. CAÑEDO L, LACLETTE JP, MORALES E. (1982). Evagination of the metacystode of *Taenia solium*. In: Flisser A, Willms K, Laclette JP, Larralde C, Ridaura C, and Beltran F (eds); Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives. Academic Press. New York, USA.
 18. CARRIQUE-MAS J, IIHOSHI N, WIDDOWSON MA, ROCA Y, MORALES G, QUIROGA J, CEJAS F, CAIHUARA M, IBARRA R, EDELSTEN M. (2001). An epidemiological study of *Taenia solium* cysticercosis in a rural population in the Bolivian Chaco. Acta Trop. 80: 229-235.
 19. CASELLI E, BONI M, DI LUCA D, SALVATORI D, VITA A, CASSAI E. (2005). A combined bovine herpesvirus 1 gB-gD DNA vaccine induces immune response in mice. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 28: 155-166.
 20. CHAMBERS RS, JOHNSTON SA. (2003). High-level generation of polyclonal antibodies by genetic immunization. Nat Biotechnol. 21: 1088-1092.
 21. CHARO J, LINDENCRONA JA, CARLSON LM, HINKULA J, KIESSLING R. (2004). Protective efficacy of a DNA influenza virus vaccine is markedly increased by the coadministration of a Schiff base-forming drug. J Virol. 78: 11321-11326.
 22. CHAVARRIA A, ROGER B, FRAGOSO G, TAPIA G, FLEURY A, DUMAS M, DESSEIN A, SARRALDE C, SCIUTTO C. (2003). Th2 profile in asymptomatic *Taenia solium* human neurocysticercosis. Microbes Infect. 5: 1109-1115.
 23. CHERBONNEL M, ROUSSET J, JESTIN V. (2003). Strategies to improve protection against low-pathogenicity H7 avian influenza virus infection using DNA vaccines. Avian Dis. 47: 1181-1186.
 24. CIESIELSKI S, SEED JR, ESTRADA J, WRENN E. (1993). The seroprevalence of cysticercosis, malaria, and *Trypanosoma cruzi* among North Carolina migrant farmworkers. Public Health Rep. 108: 736-741.
 25. COHEN C, PARRY D. (1990). Alfa-helical coiled coils and bundles: how to design an alfa-helical protein. Proteins. 7: 1-15.
 26. COX F.E.G. (1993). Modern parasitology: a textbook of parasitology. Oxford, Boston: Blackwell Scientific Publications.
 27. COX RJ, MYKKELTVEDT E, ROBERTSON J, HAAHEIM LR. (2002). Non-lethal viral challenge of influenza haemagglutinin and nucleoprotein DNA vaccinated mice results in reduced viral replication. Scand J Immunol. 55: 14-23.
 28. CRUZ-REVILLA C, ROSAS G, FRAGOSO G, LOPEZ-CASILLAS F, TOLEDO A, LARRALDE C, SCIUTTO E. (2000). *Taenia crassiceps* cysticercosis: protective effect and immune response elicited by DNA immunization. J Parasitol. 86: 67-74.
 29. DALE CJ, DE ROSE R, WILSON KM, CROOM HA, THOMSON S, COUPAR BE, RAMSAY A, PURCELL DF, FFRENCH R, LAW M, EMER Y S, COOPER DA, RAMSHA W IA, BOYLE DB, KENT SJ; AUSTRALIAN THAI HIV VACCINE CONSORTIUM. (2004). Evaluation in macaques of HIV-1 DNA vaccines containing primate CpG motifs and fowlpoxvirus vaccines co-expressing IFN γ or IL-12. Vaccine. 23: 188-197.
 30. DERRICK SC, YANG AL, MORRIS SL. (2004). A polyvalent DNA vaccine expressing an ESAT6-Ag85B fusion protein protects mice against a primary infection with *Mycobacterium tuberculosis* and boosts BCG-induced protective immunity. Vaccine. 23: 780-788.
 31. DIAZ-CAMACHO SP, CANDIL-RUIZ A, SUATE-PERAZA V, ZAZUETA-RAMOS ML, FELIX-MEDINA M, LOZANO R, WILLMS K. (1991). Epidemiologic study and control of *Taenia solium* infections with praziquantel in a rural village of Mexico. Am J Trop Med Hyg. 45: 522-531.
 32. DIAZ MA, VILLALOBOS N, DE ALUJA A, ROSAS G, GOMEZ-CONDE E, HERNANDEZ P, SARRALDE C, SCIUTTO E, FRAGOSO G. (2003). Th1 and Th2 indices of the immune response in pigs vaccinated against *Taenia solium* cysticercosis suggest various host immune strategies against the parasite. Vet Immunol Immunopathol. 93: 81-90.
 33. DOAN T, HERD K, RAMSHAW I, THOMSON S, TINDLE RW. (2005). A polytope DNA vaccine elicits multiple effector and memory CTL responses and protects against human papillomavirus 16 E7-expressing tumour. Cancer Immunol Immunother. 54: 157-171.
 34. DONGMO L, DRUET-CABANAC M, MOYOU SR, ZEBAZE DR, NJAMNSHI AK, SINI V, MAPOURE N, ECHOUFFO TJ, DJEUMEN WC, NDUMBE PM. (2004). [Cysticercosis and epilepsy: a case-control study in Mbam Valley, Cameroon][Article in French]. Bull Soc Pathol Exot. 97: 105-108.
 35. DOYLE K. (1996). In: Protocols and applications guide. Third edition. Promega Corporation. p. 45-46.
 36. ENCKE J, ZU PUTLITZ J, STREMMELW, WANDS JR. (2003). CpG immuno-stimulatory motifs enhance humoral immune responses against hepatitis C virus core protein after DNA-based immunization. Arch Virol. 148: 435-448.
 37. ESPINOZA B, RUIZ-PALACIOS G, TOVAR A, SANDOVAL MA, PLANCARTE A, FLISSER A. (1986). Characterization by enzyme-linked immunosorbent assay of the humoral immune response in patients with neurocysticercosis and its application in immunodiagnosis. J Clin Microbiol. 24: 536-541.
 38. FERRAZ JC, STAVROPOULOS E, YANG M, COADE S, ESPITIA C, LOWRIE DB, COLSTON MJ, TASCONE RE. (2004). A heterologous DNA priming-*Mycobacterium bovis* BCG boosting immunization strategy using mycobacterial Hsp70, Hsp65, and Apa antigens improves protection against tuberculosis in mice. Infect Immun. 72: 6945-6950.
 39. FLISSER A, GAUCI CG, ZOLIA, MARTINEZ-OCANA J, GARZARODRIGUEZA, DOMINGUEZ-ALPIZAR JL, MARAVILLA P, RODRIGUEZ-CANUL R, AVILA G, AGUILAR-VEGA L, KYNGDON C, GEER TS S, LIGHT OWLERS MW. (2004). Induction of protection against porcine cysticercosis by vaccination with recombinant oncosphere antigens. Infect Immun. 72: 5292-5297.
 40. FLISSER A, SARTI E, LIGHTOWLERS M, SCHANTZ P. (2003). Neurocysticercosis: regional status, epidemiology, impact and control measures in the Americas. Acta Trop. 87: 43-51.
 41. FLISSER A, MADRAZO I, DELGADO H. (1997). Cisticercosis humana. Coeditado por la Universidad Nacional Autónoma de México y Editorial El Manual Moderno S.A. de C.V.
 42. FLISSER A. (1988). Neurocysticercosis in Mexico. Parasitol Today. 4: 131-137.
 43. FLISSER A, WOODHOUSE E, LARRALDE C. (1980). Human cysticercosis: antigens, antibodies and non-responders. Clin. Exp. Immunol. 39: 27-37.
 44. GARCIA HH, PRETELL EJ, GILMAN RH, MARTINEZ SM, MOULTON LH, DEL BRUTTO OH, HERRERA G, EVANS CA, GONZALEZ AE; CYSTICERCOSIS WORKING GROUP IN PERU. (2004). A trial of antiparasitic treatment to reduce the rate of seizures due to cerebral cysticercosis. N Engl J Med. 350: 249-258.
 45. GARCIA HH, GILMAN RH, GONZALEZ AE, VERASTEGUI M, RODRIGUEZ S, GAVIDIA C, TSANG VC, FALCON N, LESCANO AG, MOULTON LH, BERNAL T, TOVAR M; CYSTICERCOSIS WORKING GROUP IN PERU. (2003). Hyperendemic human and porcine *Taenia solium* infection in Peru. Am J Trop Med Hyg. 68: 268-275.

46. GARCIA HH, GONZALEZ AE, EVANS CA, GILMAN RH; CYSTICERCOSIS WORKING GROUP IN PERU. (2003). *Taenia solium* cysticercosis. *Lancet*. 362: 547-556.
47. GARCIA HH, MARTINEZ M, GILMAN R, HERRERA G, TSANG VCW, PILCHER JB, DÍAZ F, VERASTEGUI M, GALLO C, PORRAS M, ALVARADO M, NARANJO J, MIRANDA E, AND THE CYSTICERCOSIS WORKING GROUP IN PERU. (1991). Diagnosis of cysticercosis in endemic regions. *Lancet*. 338: 549-552.
48. GARCIA-NOVAL J, ALLAN JC, FLETES C, MORENO E, DEMATA F, TORRES-ALVAREZ R, SOTO DE ALFARO H, YURRITA P, HIGUEROS-MORALES H, MENCOS F, CRAIG PS. (1996). Epidemiology of *Taenia solium* taeniasis and cysticercosis in two rural Guatemalan communities. *Am J Trop Med Hyg*. 55: 282-289.
49. GAUCI CG, FLISSER A, LIGHTOWLERS MW. (1998). A *Taenia solium* oncosphere protein homologous to host-protective *Taenia ovis* and *Taenia saginata* 18 kDa antigens. *Int J Parasitol*. 28: 757-760.
50. GIMENEZ-ROLDAN S, DIAZ F, ESQUIVEL A. (2003). Neurocysticercosis and immigration. *Neurologia*. 18: 385-388.
51. GUO YJ, SUN SH, ZHANG Y, CHEN ZH, WANG KY, HUANG L, ZHANG S, ZHANG HY, WANG QM, WU D, ZHU WJ. (2004). Protection of pigs against *Taenia solium* cysticercosis using recombinant antigen or in combination with DNA vaccine. *Vaccine*. 22: 3841-3847.
52. HADDAD D, BILCIKOVA E, WITNEYAA, CARLTON JM, WHITE CE, BLAIR PL, CHATTOPADHYAY R, RUSSELL J, ABOT E, CHAROENVIT Y, AGUIAR JC, CARUCCI DJ, WEISS WR. (2004). Novel antigen identification method for discovery of protective malaria antigens by rapid testing of DNA vaccines encoding exons from the parasite genome. *Infect Immun*. 72: 1594-1602.
53. HARLOW E, & LANE D. (1988). Collecting sera from a mouse by tail bleed. *Antibodies: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, NY. USA. p 172.
54. HARNETT W. (1988). The anthelmintic action of Paraziquantel. *Parasitol Today*. 4: 144.
55. HEINEN PP, RIJSEWIJK FA, DE BOER-LUIJTZE EA, BIANCHI AT. (2002). Vaccination of pigs with a DNA construct expressing an influenza virus M2-nucleoprotein fusion protein exacerbates disease after challenge with influenza A virus. *J Gen Virol*. 83: 1851-1859.
56. HINZ E. (1965). Contribution to the standardization of experimental cysticercosis of the mouse as a model experiment for testing of agents affective against cysticercosis. 16: 322-331.
57. HOSHINO Y, DALAI SK, WANG K, PESNICAK L, LAU TY, KNIPE DM, COHEN JI, STRAUS SE (2005). Comparative efficacy and immunogenicity of replication-defective, recombinant glycoprotein, and DNA vaccines for herpes simplex virus 2 infections in mice and guinea pigs. *J Virol*. 79: 410-418.
58. HU H, PENG XM, HUANGYS, GU L, XIE QF, GAO ZL. (2004). Yeast expression and DNA immunization of hepatitis B virus S gene with second-loop deletion of alpha determinant region. *World J Gastroenterol*. 10: 2989-2993.
59. HUERTA, M., A.S. DE ALUJA, G. FRAGOSO, A. TOLEDO, N. VILLALOBOS, M. HERNANDEZ, G. GEVORKIAN, G. ACERO, A. DIAZ, I. ALVAREZ, R. AVILA, C. BELTRAN, G. GARCIA, J.J. MARTINEZ, C. LARRALDE, E. Sciuotto. (2001). Synthetic peptide vaccine against *Taenia solium* pig cysticercosis: successful vaccination in a controlled field trial in rural Mexico. *Vaccine*. 20: 262-266.
60. IBORRA S, SOTO M, CARRION J, NIETO A, FERNANDEZ E, ALONSO C, REQUEENA JM. (2003). The *Leishmania infantum* acidic ribosomal protein P0 administered as a DNA vaccine confers protective immunity to *Leishmania major* infection in BALB/c mice. *Infect Immun*. 71: 6562-6572.
61. ITO A, TAKAMI T, ITOH M. (1991). Vaccination effect of intact metacestodes of *Taenia crassiceps* against *T. taeniaeformis* infection in rat s. *Am J Trop Med Hyg*. 44: 696-701.
62. JERI C, GILMAN RH, LESCANOAG, MAYTA H, RAMIREZ ME, GONZALEZ AE, NAZERALI R, GARCIA HH. (2004). Species identification after treatment for human taeniasis. *Lancet*. 363: 949-950.
63. JOHNSON KS, HARRISON GB, LIGHTOWLERS MW, O'HOY KL, COUGLE WG, DEMPSTER RP, LAWRENCE SB, VINTON JG, HEATH DD, RICKARD MD. 1989. Vaccination against ovine cysticercosis using a defined recombinant antigen. *Nature*. 338: 585-587.
64. JOHNSTON SA, TALAAT AM., MCGUIRE MJ. (2002). Genetic Immunization. What's in a name?. *Archives of Medical Research*. 33: 325-329.
65. KALINNA B, MCMANUS DP. (1993). An IgG (Fc)-binding protein of *Taenia crassiceps* (Cestoda) exhibits sequence homology and antigenic similarity with Schistosome paramyosin. *Parasitol*. 106: 289-296.
66. KAMIYA M, SATO H, KITAOKA M, OKU Y, ITO M, GATHURA P. (1991). Laboratory rodent models for the tapeworm-stage of *Taenia saginata* and other related taeniid species. *Southeast Asian J. Trop. Med Public Health*. 22: 262-267.
67. KOJIMA S, NIIMURAM, KANAZAWA T. (1987). Production and properties of a mouse monoclonal IgE antibody to *Schistosoma japonicum*. *J Immunol*. 139: 2044-2049.
68. KUNZ J, KALINNA B, WATSCHKE V, GEYER E. (1989). *Taenia crassiceps* metacestode vesicular fluid antigens shared with the *Taenia solium* larval stage and reactive with serum antibodies from patients with neurocysticercosis. *Zentralbl Bakteriol*. 271: 510-520.
69. LACLETTE JP, SKELLY P, MERCHANT M, Shoemaker CB. (1995). Aldehyde fixation dramatically alters the immunolocalization pattern of paramyosin in helminth parasites. *Exp. Parasitol*. 81:140-144.
70. 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.
71. LACLETTE JP, LANDA A, ARCOS L, WILLMS K, DA VIS A, SHOEMAKER CB. (1991). Paramyosin is the *Schistosoma mansoni* (trematoda) homologue of antigen B from *Taenia solium* (Cestoda). *Mol. Biochem. Parasitol*. 44: 287-296.
72. LACLETTE JP, ALAGON 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.
73. LACLETTE JP, RODRIGUEZ M, LANDAA, ARCOS L, DE ALBA P, MANCILLA R, WILLMS K. (1989). The coexistence of *Taenia solium* cysticerci and the pig: role of the antigen B. *Acta Leiden*. 57: 115-122.
74. LACLETTE JP, ORNELAS Y, MERCHANT MT, WILLMS K. (1982). Ultrastructure of the surrounding envelopes of *Taenia solium* eggs. In: Flisser A, Willms K, Laclette JP, Larralde C, Ridaura C, and Beltran F (eds); *Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives*. Academic Press. New York, USA.
75. LAEMMLI UK. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-685.
76. LAI WC, PAKES SP, REN K, LU YS, BENNETT M. (1997). Therapeutic effect of DNA immunization of genetically susceptible mice infected with virulent *Mycoplasma pulmonis*. *J Immunol*. 158: 2513-2516.
77. LAI WC, BENNETT M, JOHNSTON SA, BARRY MA, PAKES SP. (1995). Protection against *Mycoplasma pulmonis*

- infection by genetic vaccination. *DNA Cell Biol.* 14: 643-651.
78. LANDA A, LACLETTE JP, NICHOLSON-WELLER A, SHOEMAKER CB. (1993). cDNA cloning and expression of collagen-binding and complement inhibitory activity of *Taenia solium* paramyosin (AgB). *Mol. Biochem. Parasitol.* 60: 343-348.
 79. LARRALDE C, MONTOYA RM, SCIUTTO E, DÍAZ ML, GOVEZENSKY T, COLTORTI E. (1989). Deciphering Western Blots of tapeworm antigen (*Taenia solium*, *Echinococcus granulosus* and *Taenia crassiceps*) reacting with sera from neurocysticercosis and hydatid disease patients. *Am J Trop Med Hyg.* 40: 282-290.
 80. LARRALDE C, LACLETTE JP, OWEN CS. (1986). Reliable serology of *Taenia solium* cysticercosis with antigen from cyst vesicular fluid: ELISA and hemglutination test. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 35: 965-973.
 81. LEE S, GIERYSKA M, EO SK, KUKLIN N, ROUSE BT (2003). Influence of DNA encoding cytokines on systemic and mucosal immunity following genetic vaccination against *herpes simplex* virus. *Microbes Infect.* 5: 571-578.
 82. LETVIN NL, HUANG Y, CHAKRABARTI BK, XU L, SEAMAN MS, BEAUDRY K, KORIOTH-SCHMITZ B, YU F, ROHNE D, MARTIN KL, MIURAA, KONG WP, YANG ZY, GELMAN RS, GOLUBEVA OG, MONTEFIORI DC, MASCOLA JR, NABEL GJ. (2004). Heterologous envelope immunogens contribute to AIDS vaccine protection in *rhesus* monkeys. *J Virol.* 78: 7490-7497.
 83. LIGHTOWLERS MW, COLEBROOK AL, GAUCI CG, GAUCI SM, KYNGDON CT, MONKHOUSE JL, VALLEJO RODRIGUEZ C, READ AJ, ROLFE RA, SATO C. (2003). Vaccination against cestode parasites: anti-helminth vaccines that work and why. *Vet Parasitol.* 115: 83-123.
 84. LIGHTOWLERS MW. (2003). Vaccines for prevention of cysticercosis. *Acta Trop.* 87: 129-35.
 85. LIM LH, LI HY, CHEONG N, LEE BW, CHUA KY. (2004). High-level expression of a codon optimized recombinant dust mite allergen, Blo t 5, in Chinese hamster ovary cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 316: 991-996.
 86. LOCHER CP, WITT SA, ASHLOCK BM, POLACINO P, HU SL, SHIBOSKI S, SCHMIDT AM, AGY MB, ANDERSON DM, STAPRANS SI, ZUR MEGEDE J, LEVY JA. (2004). Human immunodeficiency virus type 2 DNA vaccine provides partial protection from acute baboon infection. *Vaccine.* 22: 2261-2272.
 87. LODMELL DL, PARNELL MJ, WEYHRICH JT, EWALT LC. (2003). Canine rabies DNA vaccination: a single-dose intradermal injection into ear pinnae elicits elevated and persistent levels of neutralizing antibody. *Vaccine.* 21: 3998-4002.
 88. LOPEZ-FUERTES L, PEREZ-JIMENEZ E, VILA-CORO AJ, SACK F, MORENO S, KONIG SA, JUNGHANS C, WITTIG B, TIMON M, ESTEBAN M. (2002). DNA vaccination with linear minimalistic (MIDGE) vectors confers protection against *Leishmania major* infection in mice. *Vaccine.* 21: 247-257.
 89. LOPEZ-MORENO HS, CORREA D, LACLETTE JP, ORTIZ-NAVARRETE VF. (2003). Identification of CD4+ T cell epitopes of *Taenia solium* paramyosin. *Parasite Immunol.* 25: 513-516.
 90. MAECKER HT, UMETSU DT, DEKRUYFF RH, LEVY S. (1997). DNA vaccination with cytokine fusion constructs biases the immune response to ovalbumin. *Vaccine.* 15: 1687-1696.
 91. MAGUIRE JH. (2004). Tapeworms and seizures-treatment and prevention. *N Engl J Med.* 350: 215-217.
 92. MAKRIDES SC. (1998). Therapeutic inhibition of the complement system. *Pharmacol Rev.* 50: 59-87.
 93. MANOUTCHARIAN K, DIAZ-OREA A, GEVORKIAN G, FRAGOSO G, ACERO G, GONZALEZ E, DE ALUJA A, VILLALOBOS N, GOMEZ-CONDE E, SCIUTTO E. (2004). Recombinant bacteriophage-based multiepitope vaccine against *Taenia solium* pig cysticercosis. *Vet Immunol Immunopathol.* 99: 11-24.
 94. MANOUTCHARIAN, K., TERRAZAS, L.I., GEVORKIAN, G., ACERO, G., PETROSSIAN, P., RODRIGUEZ, M., AND T. GOVENZENSKY. (1999). Phage-displayed T-cell epitope grafted into immunoglobulin heavy-chain complementarity-determining regions: an effective vaccine design tested in murine cysticercosis. *Infect. Immun.* 67: 4764-4770.
 95. MAUE AC, WATERS WR, PALMER MV, WHIPPLE DL, MINION FC, BROWN WC, ESTES DM. (2004). CD80 and CD86, but not CD154, augment DNA vaccine-induced protection in experimental bovine tuberculosis. *Vaccine.* 23: 769-779.
 96. McMANUS DP, LIU S, SONG Q, XU Y, WONG JM. (1998). The vaccine efficacy of native paramyosin (Sj-97) against Chinese *Schistosoma japonicum*. *Int J Parasitol.* 28: 1739-1742.
 97. MELE A, TANCREDI F, ROMANO L, GIUSEPPONE A, COLUCCI M, SANGIUOLO A, LECCE R, ADAMO B, TOSTI ME, TALIANI G, ZANETTIAR. (2001). Effectiveness of hepatitis B vaccination in babies born to hepatitis B surface antigen-positive mothers in Italy. *J Infect Dis.* 184: 905-908.
 98. MENDLOVIC F, OSTOJA-SALOMA, P., SOLIS CF, FLISSER A, AND LACLETTE JP. (2004). Cloning, characterization, and functional expression of *Taenia solium* Calreticulin. *J Parasitol.* 90: 891-893.
 99. MITCHELL JA, GREEN TD, BRIGHT RA, ROSS TM. (2003). Induction of heterosubtypic immunity to influenza A virus using a DNA vaccine expressing hemagglutinin-C3d fusion proteins. *Vaccine.* 21: 902-914.
 100. MITTAL V, SINGH VK, ICHHPUJANI RL. (2001). Detection of antibodies to *Taenia solium* in sera of patient with epilepsy using ELISA. *J Commun Dis.* 33: 23-27.
 101. MOLINARI JL, RODRIGUEZ D, TATO P, SOTO R, ARECHAVALETA F, SOLANO S. (1997). Field trial for reducing porcine *Taenia solium* cysticercosis in Mexico by systematic vaccination of pigs. *Vet Parasitol.* 69: 55-63.
 102. MOLINARI JL, SOTO R, TATO P, RODRIGUEZ D, RETANA A, SEPULVEDA J, PALET A. (1993). Immunization against porcine cysticercosis in an endemic area in Mexico: a field and laboratory study. *Am J Trop Med Hyg.* 49: 502-512.
 103. MOLINARI JL, TATO P, AGUILAR T, PALET A. (1988). Immunity in mice to an oncosphere infection by using oncospherical antigens from *Taenia solium* or *Taeniarrhynchus saginatus*. *Rev Latinoam Microbiol.* 30: 325-333.
 104. MOLINARI JL, MEZA R, TATO P. (1983). *Taenia solium*: cell reactions to the larva (*Cysticercus cellulosae*) in naturally parasitized, immunized hogs. *Exp Parasitol.* 56: 327-338.
 105. MONROY-OSTRIA A, MONROY-OSTRIA TJ, GOMEZ GJ, HERNANDEZ MO. (1993). Some studies on the experimental infection of golden hamsters with *Taenia solium*. *Rev Latinoam Microbiol.* 35: 91-98.
 106. MOORE AC, LUTWICK LI, SCHANTZ PM, PILCHER JB, WILSON M, HIGHTOWER AW, CHAPNICK EK, ABTER EI, GROSSMAN JR, FRIED JA, ET AL. (1995). Seroprevalence of cysticercosis in an Orthodox Jewish community. *Am J Trop Med Hyg.* 53: 439-442.
 107. MOSSMAN SP, PIERCE CC, WATSON AJ, ROBERTSON MN, MONTEFIORI DC, KULLER L, RICHARDSON BA, BRADSHAW JD, MUNN RJ, HU SL, GREENBERG PD, BENVENISTE RE, HAIGWOOD NL. (2004). Protective immunity to SIV challenge elicited by vaccination of macaques with multigenic DNA vaccines producing virus-like particles. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 20: 425-434.

108. MUKARATIRWA S, KASSUKU AA, WILLINGHAM AL, DARWIN MURRELL K. (2003). Background to the international action planning workshop on *Taenia solium* cysticercosis/taeniosis with special focus on Eastern and Southern Africa. *Acta Trop.* 87: 3-5.
109. NAGATA T, UCHIJIMA M, YOSHIDA A, KAWASHIMA M, KOIDE Y. (1999). Codon Optimization Effect on Translational Efficiency of DNA Vaccine in Mammalian Cells: Analysis of Plasmid DNA Encoding a CTL Epitope Derived from Microorganisms. *Biochem Biophys Res Commun.* 261: 445-451.
110. NARA T, TANABE K, MAHAKUNJCHAROE Y, OSADA Y, MATSUMOTO N, KITA K, KOJIMA S. (1997). The B cell epitope of paramyosin recognized by a protective monoclonal IgE antibody to *Schistosoma japonicum*. *Vaccine.* 15: 78-84.
111. NASCIMENTO E, COSTA JO, GUIMARAES MP, TAVARES CA. (1995). Effective immune protection of pigs against cysticercosis. *Vet Immunol Immunopathol.* 45: 127-137.
112. NOORMAHOMED EV, PIVIDAL JG, AZZOUC S, MASCARO C, DELGADO-RODRIGUEZ M, OSUNA A. (2003). Seroprevalence of anti-cysticercus antibodies among the children living in the urban environs of Maputo, Mozambique. *Ann Trop Med Parasitol.* 97: 31-35.
113. OSORIO Y, COHEN J, GHIASI H. (2004). Improved protection from primary ocular HSV-1 infection and establishment of latency using multigenic DNA vaccines. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 45: 506-514.
114. PAN CH, CHEN HW, TAO MH. (1999). Modulation of immune responses to DNA vaccines by codelivery of cytokine genes. *J Formos Med Assoc.* 98: 722-729.
115. PHIRI IK, NGOWI H, AFONSO S, MATENGA E, BOA M, MUKARATIRWA S, GITHIGIA S, SAIMO M, SIKASUNGE C, MAINGI N, LUBEGA GW, KASSUKU A, MICHAEL L, SIZIYA S, KRECEK RC, NOORMAHOMED E, VILHENA M, DORNY P, WILLINGHAM AL. (2003). The emergence of *Taenia solium* cysticercosis in Eastern and Southern Africa as a serious agricultural problem and public health risk. *Acta Trop.* 87: 13-23.
116. PLANCARTE A, FLISSERA, GAUCI CG, LIGHTOWLERS MW. (1999). Vaccination against *Taenia solium* cysticercosis in pigs using native and recombinant oncosphere antigens. *Int J Parasitol.* 29: 643-647.
117. PREFACE. (2003). Declaration on *Taenia solium* cysticercosis/taeniosis. *Acta Trop.* 87: 1-2.
118. RAJSHEKHAR V. (2004). Purging the worm: management of *Taenia solium* taeniasis. *Lancet.* 363: 912.
119. RAJSHEKHAR V, JOSHI DD, DOANH NQ, VAN DE N, XIAONONG Z. (2003). *Taenia solium* taeniosis/cysticercosis in Asia: epidemiology, impact and issues. *Acta Trop.* 87: 53-60.
120. RAMIREZ 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.
121. RAMOS-KURI M, MONTROYA RM, PADILLA A, GOVEZENSKY T, DÍAZ ML, SCIUTTO E, SOTELO J, LARRALDE C. (1992). Immunodiagnosis of neurocysticercosis. *Arch Neurol.* 49: 633-636.
122. REID K. (1983). Proteins involved in the activation and control of the two pathways of the complement system. *Biochem Soc Trans.* 11: 1-12.
123. RICKARD MD, WILLIAMS JF. (1982). Hydatidosis/cysticercosis: immune mechanisms and immunization against infection. *Adv Parasitol.* 21: 229-296.
124. RICKARD MD, BELL KJ. (1971). Immunity produced against *Taenia ovis* and *T. taeniaeformis* infection in lambs and rats following in vivo growth of their larvae in filtration membrane diffusion chambers. *J Parasitol.* 57: 571-575.
125. RODRIGUEZ-HIDALGO R, BENITEZ-ORTIZ W, DORNY P, GEERTS S, GEYSEN D, RON-ROMAN J, PROANO-PEREZ F, CHAVEZ-LARREAMA, BARRIONUEVO-SAMANIEGO M, CELI-ERAZO M, VIZCAINO-ORDONEZ L, BRANDT J. (2003). Taeniosis-cysticercosis in man and animals in the Sierra of Northern Ecuador. *Vet Parasitol.* 118: 51-60.
126. ROMAN G, SOTELO J, DEL BRUTTO O, FLISSERA, DUMAS M, WADIA N, BOTERO D, CRUZ M, GARCIA H, DE BITTENCOURT PR, TRELLES L, ARRIAGADA C, LORENZANA P, NASH TE, SPINA-FRANCA A. (2000). A proposal to declare neurocysticercosis an international reportable disease. *Bull World Health Organ.* 78: 399-406.
127. ROSAS G, FRAGOSO G, GARATE T, HERNANDEZ B, FERRERO P, FOSTER-CUEVAS M, PARKHOUSE RM, HARRISON LJ, BRIONES SL, GONZALEZ LM, SCIUTTO E. (2002). Protective immunity against *Taenia crassiceps* murine cysticercosis induced by DNA vaccination with a *Taenia saginata* tegument antigen. *Microbes Infect.* 4: 1417-1426.
128. ROTHEL JS, LIGHTOWLERS MW, SEOW HF, WOOD PR, ROTHEL LJ, HEATH DD, HARRISON GBL. (1996). Immune responses associated with protection in sheep vaccinated with a recombinant antigen from *Taenia ovis*. *Parasite Immunol.* 18: 201-208.
129. ROTTINGHAUS ST, POLAND GA, JACOBSON RM, BARR LJ, ROY MJ. (2003). Hepatitis B DNA vaccine induces protective antibody responses in human non-responders to conventional vaccination. *Vaccine.* 21: 4604-4608.
130. SAKAI T, HISAEDA H, NAKANO Y, ZHANG M, TAKASHIMA M, ISHII K, MAEKA WA Y, MATSUMOTO S, NITTA Y, MIYAZAKI J, YAMAMOTO S, HIMENO K. (2003). Gene gun-based co-immunization of merozoite surface protein-1 cDNA with IL-12 expression plasmid confers protection against lethal *Plasmodium yoelii* in A/J mice. *Vaccine.* 21: 1432-1444.
131. SALGADO P, ROJAS R, SOTELO J. (1997). Cysticercosis. Clinical classification based on imaging studies. *Arch Intern Med.* 157: 1991-1997.
132. SANCHEZ AE, AQUINO G, OSTOIA-SALOMA P, LACLETTE JP, ROCHA-ZAVALETA L. (2004). Cholera toxin B-subunit gene enhances mucosal immunoglobulin A, Th1-type, and CD8+ cytotoxic responses when coadministered intradermally with a DNA vaccine. *Clin Diagn Lab Immunol.* 11: 711-719.
133. SANCHEZ AL, FAIRFIELD T. (2003). Using electronic technology for *Taenia solium* education: educating the educators. *Acta Trop.* 87: 165-170.
134. SANDER HW, CASTRO C. (2004). Images in clinical medicine. Neurocysticercosis. *N Engl J Med.* 350: 266.
135. SANDER JW, PERUCCA E. (2003). Epilepsy and comorbidity: infections and antimicrobials usage in relation to epilepsy management. *Acta Neurol Scand.* 180:16-22.
136. SARTI E, SCHANTZ PM, AVILA G, AMBROSIO J, MEDINA-SANTILLAN R, FLISSER A. (2000). Mass treatment against human taeniasis for the control of cysticercosis: a population-based intervention study. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 94: 85-89.
137. SARTI E, FLISSER A, SCHANTZ PM, GLEIZER M, LOYA M, PLANCARTE A, AVILA G, ALLAN J, CRAIG P, BRONFMAN M, WIJAYARATNE P. (1997). Development and evaluation of a health education intervention against *Taenia solium* in a rural community in Mexico. *Am J Trop Med Hyg.* 56: 127-132.
138. SCHANTZ PM, TSANG VCW. (2003). The US Centers for Disease Control and Prevention (CDC) and research and control of cysticercosis. *Acta Trop.* 87: 161-163.
139. SCIUTTO E, ALUJA A, FRAGOSO G, RODARTE LF, HERNANDEZ M, VILLALOBOS MN, PADILLA A, KEILBACH N, BACA M, GOVEZENSKY T, ET AL. (1995).

- Immunization of pigs against *Taenia solium* cysticercosis: factors related to effective protection. *Vet Parasitol.* 60: 53-67.
140. SCIUTTO E, FRAGOSO G, TRUEBAL, LEMUS D, MONTOYA RM, DÍAZ ML, GOVEZENSKY T, LOMELÍ C, TAPIA G, LARRALDE C. (1990). Cysticercosis vaccine: cross protecting immunity with *Taenia solium* antigens against experimental murine *Taenia crassiceps* cysticercosis. *Parasite Immunol.* 12: 687-696.
 141. SHAO HJ, CHEN L, SHEN MS, YU GF. (2003). Enhancement of immune responses to the hepatitis B virus core protein through DNA vaccines with a DNA fragment encoding human IL-1 β 163-171 peptide. *Acta Virol.* 47: 217-221.
 142. SHINODA K, XIN KQ, JOUNAI N, KOJIMA Y, TAMURA Y, OKADA E, KAWAMOTO S, OKUDA K, KLINMAN D, OKUDA K. (2004). Polygene DNA vaccine induces a high level of protective effect against HIV-vaccinia virus challenge in mice. *Vaccine.* 22: 3676-3690.
 143. SMITH C, DAY PJ, WALKER MR. (1993). Generation of cohesive ends on PCR products by UDG-mediated excision of dU, and application for cloning into restriction digest-linearized vectors. *PCR Methods Appl.* 4: 328-332.
 144. SOLIS CF, OSTOJA-SALOMA P, LUGO-MARTINEZ VH, JOHNSTON SA, LACLETTE JP. (2005). Genetic vaccination against murine cysticercosis by using a plasmid vector carrying *Taenia solium* paramyosin. *Infect Immun.* 73: 1895-1897.
 145. SOLIS CF, VAZQUEZ-TALAVERA J, LACLETTE JP. (2004). [Toward development of a *Taenia solium* paramyosin-based vaccine against porcine cysticercosis][Article in Spanish]. *Gac Med Mex.* 140:129-138.
 146. SOMEYA K, XIN KQ, MATSUO K, OKUDA K, YAMAMOTO N, HONDA M. (2004). A consecutive priming-boosting vaccination of mice with simian immunodeficiency virus (SIV) gag/pol DNA and recombinant vaccinia virus strain DIs elicits effective anti-SIV immunity. *J Virol.* 78: 9842-9853.
 147. SORVILLO FJ, PORTIGAL L, DEGIORGIO C, SMITH L, WATERMAN SH, BERLIN GW, ASH LR. (2004). Cysticercosis-related deaths, California. *Emerg Infect Dis.* 10: 465-469.
 148. SOTELO J. (2004). Neurocysticercosis: is the elimination of parasites beneficial? *N Engl J Med.* 350: 280-282.
 149. SPOLSKI RJ, CORSON J, THOMAS PG, KUHN RE. (2000). Parasite-secreted products regulate the host response to larval *Taenia crassiceps*. *Parasite Immunol.* 22: 297-305.
 150. STEMMER WP, CRAMERI A, HA KD, BRENNAN TM, HEYNEKER HL. (1995). Single-step assembly of a gene and entire plasmid from large numbers of oligodeoxyribonucleotides. *Gene.* 164: 49-53.
 151. TANG DC, DEVIT M, JOHNSTON SA. (1992). Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature.* 356: 152-154.
 152. TAPIA E, PEREZ-JIMENEZ E, LOPEZFUERTES L, GONZALO R, GHERARDI MM, ESTEBAN M. (2003). The combination of DNA vectors expressing IL-12 + IL-18 elicits a high protective immune response against cutaneous leishmaniasis after priming with DNA-p36/LACK and the cytokines, followed by a booster with a vaccinia virus recombinant expressing p36/LACK. *Microbes Infect.* 5: 73-84.
 153. TAYLOR MG, HUGGINS MC, SHI F, LIN J, TIAN E, YE P, SHEN W, QIAN CG, LIN BF, BICKLE QD. (1998). Production and testing of *Schistosoma japonicum* candidate vaccine antigens in the natural ovine host. *Vaccine.* 16: 1290-1298.
 154. TERRAZA S, PUJOLA T, GASCÓN J, CORACHÁN M. (2001). Neurocysticercosis, an imported disease? *Medicina Clínica.* 116: 261-263.
 155. TERRAZAS LI, CRUZ M, RODRIGUEZ-SOSA M, BOJALIL R, GARCIA-TAMAYO F, LARRALDE C. (1999). Th1-type cytokines improve resistance to murine cysticercosis caused by *Taenia crassiceps*. *Parasitol Res.* 85:135-141.
 156. TERRAZAS LI, BOJALIL R, GOVEZENSKY T, LARRALDE C. (1998). Shift from an early protective Th1-type immune response to a late permissive Th2-type response in murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). *Parasitol.* 84: 74-81.
 157. TOENJES SA, SPOLSKI RJ, MOONEY KA, KUHN RE. (1999). The systemic immune response of BALB/c mice infected with larval *Taenia crassiceps* is a mixed Th1/Th2-type response. *J Parasitol.* 118: 623-633.
 158. TOLEDO A, FRAGOSO G, ROSAS G, HERNANDEZ M, GEVORKIAN G, LOPEZ-CASILLAS F, HERNANDEZ B, ACERO G, HUERTA M, LARRALDE C, SCIUTTO E. (2001). Two epitopes shared by *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* confer protection against murine *T. crassiceps* cysticercosis along with a prominent Th1 response. *Infect Immun.* 69: 1766-1773.
 159. TOLEDO A, LARRALDE C, FRAGOSO G, GEVORKIAN G, MANOUTCHARIAN K, HERNANDEZ M, ACERO G, ROSAS G, LOPEZ-CASILLAS F, GARFIAS CK, VAZQUEZ R, TERRAZAS LI, SCIUTTO E. (1999). Towards a *Taenia solium* cysticercosis vaccine: an epitope shared by *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* protects mice against experimental cysticercosis. *Infect Immun.* 67: 2522-2530.
 160. TOWBIN H, STAHELIN T, GORDON J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA.* 76: 4350-4354.
 161. TOWNES J M, HOFFMANN C J, KÖHN M A. (2004). Neurocysticercosis in Oregon, 1995-(2000). *Emerg Infect Dis.* 10: 508-510.
 162. TRUJILLO-VALDES VM, GONZÁLEZ-BARRANCO D, SANDOVAL-ISLAS ME, VILLANUEVA-DÍAZ G, OROZCO-BOHNE R. Chemotherapy of human cysticercosis using metrifonate. (1982). In: *Cysticercosis: Present State of Knowledge and Perspectives.* Academic Press, Inc.
 163. VARGAS-PARADA L, LACLETTE JP. (2003). Gene structure of *Taenia solium* paramyosin. *Parasitol Res.* 89: 375-378.
 164. VAZQUEZ-TALAVERA J, SOLIS CF, MEDINA-ESCUITA E, LOPEZ ZM, PROANO J, CORREA D, LACLETTE JP. (2001). Human T and B cell epitope mapping of *Taenia solium* paramyosin. *Parasite Immunol.* 23: 575-579.
 165. VAZQUEZ-TALAVERA J, SOLIS CF, TERRAZAS LI, LACLETTE JP. (2001). Characterization and protective potential of the immune response to *Taenia solium* paramyosin in a murine model of cysticercosis. *Infect Immun.* 69: 5412-5416.
 166. VAZQUEZ-TALAVERA J. (2001). Tesis Doctorado: Caracterización de la respuesta inmune hacia paramiosina en la cisticercosis humana y murina. Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto de Investigaciones Biomédicas.
 167. VERASTEGUI, M., R.H. GILMAN, A. GONZALES, H.H. GARCIA, C. GAVIDIA, N. FALCON, T. BERNAL, Y. ARANA, V.C. TSANG; CYSTICERCOSIS WORKING GROUP IN PERU. (2002). *Taenia solium* oncosphere antigens induce immunity in pigs against experimental cysticercosis. *Vet Parasitol.* 108: 49-62.
 168. VERSTER A. (1974). The golden hamster as a definitive host of *Taenia solium* and *Taenia saginata*. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 41: 23-28.
 169. VIBANCO-PEREZ N, JIMENEZ L, MENDOZA-HERNANDEZ G, LANDA A. (2002). Characterization of a recombinant mu-class glutathione S-transferase from *Taenia solium*. *Parasitol Res.* 88: 398-404.
 170. VILLA OF, KUHN RE. (1996). Mice infected with the larvae of *Taenia crassiceps* exhibit a Th2-like immune response with

- concomitant energy and downregulation of Th1-associated phenomena. *Parasitol.* 112: 561-570.
171. WANG QM, SUN SH, HU ZL, WU D, WANG ZC. (2003). Immune response and protection elicited by DNA immunisation against *Taenia* cysticercosis. *Vaccine.* 21: 1672-80.
172. WANG SW, BERTLEY FM, KOZLOWSKI PA, HERRMANN L, MANSON K, MAZZARA G, PIATAK M, JOHNSON RP, CARVILLE A, MANSFIELD K, ALDOVINI A. (2004). An SHIV DNA/MVA rectal vaccination in macaques provides systemic and mucosal virus-specific responses and protection against AIDS. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 20: 846-859.
173. WATABE S, XIN KQ, IHATA A, LIU LJ, HONSHO A, AOKI I, HAMAJIMA K, WAHREN B, OKUDA K (2001). Protection against influenza virus challenge by topical application of influenza DNA vaccine. *Vaccine.* 19: 4434-4444.
174. WATSON JM. (1960). *Medical helminthology*, London, Baillière, Tindall & Cox.
175. WIDDOWSON MA, COOK AJ, WILLIAMS JJ, ARGAES F, RODRIGUEZ I, DOMINGUEZ JL, RODRIGUEZ R. (2000). Investigation of risk factors for porcine *Taenia solium* cysticercosis: a multiple regression analysis of a cross-sectional study in the Yucatan Peninsula, Mexico. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 94: 620-624.
176. WILLIAMS JF, ENGLEKIRK PG, LINDSAY MC. (1982). Mechanisms of immunity in rodent cysticercosis. p 621-632. In: Flisser A, Willms K, Lacleste JP, Larralde C, Ridaura C, and Beltran F (eds); *Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives*. Academic Press. New York, USA.
177. 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.
178. XING YP, HUANG ZH, WANG SX, CAI J, LI J, LU S. (2004). [Immunogenicity of new DNA vaccine encoding for hepatitis B virus core antigen][Article in Chinese] *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi.* 12: 338-340.
179. YOKOYAMA M, ZHANG J, WHITTON JL. (1995). DNA immunization confers protection against lethal lymphocytic choriomeningitis virus infection. *J Virol.* 69: 2684-2688.
180. ZHENG C, BABIUK LA, VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK S. (2005). Bovine herpesvirus 1 VP22 enhances the efficacy of a DNA vaccine in cattle. *J Virol.* 79:1948-1953.
181. 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.* 18: 3196-3204.
182. ZOLI A, SHEY-NJILA O, ASSANA E, NGUEKAM JP, DORNY P, BRANDT J, GEER TS S. (2003). Regional status, epidemiology and impact of *Taenia solium* cysticercosis in Western and Central Africa. *Acta Trop.* 87: 35-42.

ANEXO 1

Genetic Vaccination against Murine Cysticercosis by Using a Plasmid Vector Carrying *Taenia solium* Paramyosin

Carlos F. Solís,¹ Pedro Ostoa-Saloma,¹ Verónica H. Lugo-Martínez,¹ Stephen Albert Johnston,² and Juan Pedro Lacleste^{1*}

Department of Immunology, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico,¹ and Center for Biomedical Inventions, Department of Internal Medicine, University of Texas-Southwestern Medical Center, Dallas, Texas²

Received 23 October 2004/Returned for modification 2 November 2004/Accepted 22 November 2004

A plasmid vector carrying the immunoprotective amino-terminal fragment of *Taenia solium* paramyosin (VW2-1) was designed for genetic vaccination studies. Mice that were genetically immunized with VW2-1 and challenged by intraperitoneal inoculation of *Taenia crassiceps* cysticerci showed 43 to 48% reductions in the parasite burden, values which were similar to values obtained previously when the recombinant protein was used.

Human and porcine cysticercosis caused by *Taenia solium* is still prevalent in several countries of Latin America, Africa, and Asia (11). A strong effort is currently being directed toward the development of an effective vaccine against porcine cysticercosis. A number of strategies have been proposed, including the use of parasite crude extracts (9, 17), recombinant proteins (2, 3, 15), synthetic peptides (4), phage display (8), and genetic immunization (10, 18). Genetic vaccines are particularly appealing for applications in developing countries as they can be inexpensive to produce and store (5). In the present study, we evaluated the use of genetic immunization with the amino-terminal fragment of *T. solium* paramyosin (VW2-1), which was previously shown to be protective (15), as an alternative strategy for vaccination in the murine model of *Taenia crassiceps* cysticercosis.

A plasmid construct encoding a synthetic sequence for VW2-1 was designed for genetic immunization. The codon usage of the wild-type coding sequence for VW2-1 was adapted for mammalian cells (synVW2-1) by using procedures for gene synthesis (1). Briefly, a set of overlapping 60-mer oligonucleotides were assembled by PCR to construct synVW2-1, which was inserted into the pCMV plasmid vector (14). The construct was confirmed by DNA sequencing before large-scale purification with a QIAGEN Endofree Plasmid Giga kit (QIAGEN). A comparison of the wild-type and synthetic sequences of VW2-1 showed substantial changes in first (11.2%), second (4.85%), and third (52.6%) positions of codons. An extensive comparison of the outcomes of the immune responses elicited in mice genetically immunized with wild-type VW2-1 and with synVW2-1 consistently showed higher antibody and cellular immune responses with the synthetic gene (data not shown). The synthetic coding sequence is available from us upon request.

Vaccination assays were carried out by using 8- to 10-week-old female BALB/c mice that were bilaterally inoculated in the tibialis anterior muscle with pCMV-synVW2-1 or pCMV blank vector (100 µg of DNA per mouse in 100 µl of 0.9% saline). A third group contained naïve mice. After 2 and 4 weeks, mice were boosted with identical doses of plasmid DNA.

In order to evaluate if the antibodies raised by genetic immunization were cross-reactive with paramyosins of *T. solium* and *T. crassiceps*, Western blot assays were carried out as described previously (16). Briefly, nitrocellulose membranes were blotted with recombinant full-length TPmy (recTPmy) and recombinant VW2-1 (recVW2-1) or with crude protein extracts from *T. solium* and *T. crassiceps* cysts (6). Membranes were reacted with pooled mouse sera that were collected 45 days after genetic immunization. Blots were developed by using a peroxidase-conjugated rabbit anti-mouse immunoglobulin G(H+L) (Zymed) secondary antibody, followed by diaminobenzidine (Sigma). A single 98-kDa protein, a size consistent with the expected size of paramyosins, was recognized in both crude extracts (Fig. 1). Moreover, recTPmy and recVW2-1 were also recognized by the sera from genetically immunized mice. These findings are consistent with the antigenic similarity between the two species of taeniids (12), as well as with the cross-reactivity of paramyosins from distant invertebrate sources (7).

The cellular immune response elicited in genetically immunized mice was characterized by proliferation assays and cytokine production by using spleen cells cultured in vitro as described previously (15). Briefly, a pool of spleen cells from each group, obtained 45 days after immunization, was cultured in the presence of 1 to 5 µg of recVW2-1 per ml for 72 h to a density of 5×10^5 cells per well. The responsiveness of spleen cells to concanavalin A was also checked by stimulation with 1 µg of concanavalin A per ml. Eighteen hours before harvesting, cells were pulsed with [*methyl*-³H]thymidine (1 µCi/well; NEN Life Science), and the amount of incorporated radioactive label was measured with a liquid scintillation counter (Beckman, Turku, Finland). The results of proliferation studies showed that significant stimulation indices were obtained for

* Corresponding author. Mailing address: Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, A.P. 70228, Ciudad Universitaria, C.P. 04510, México D.F., Mexico. Phone: (525) 5622-3862. Fax: (525) 5550-6447. E-mail: lacleste@servidor.unam.mx.

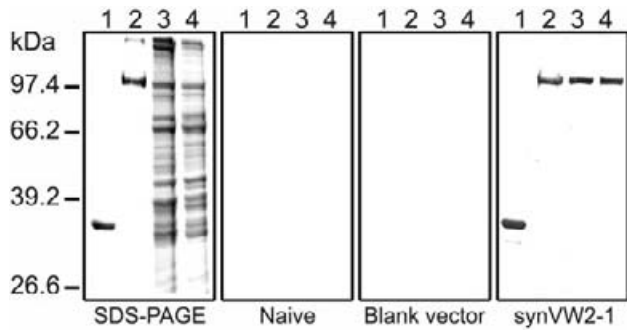


FIG. 1. Recognition of *T. solium* and *T. crassiceps* paramyosins by sera from mice that were genetically immunized with pCMV-synVW2-1. Samples of recVW2-1 (lane 1), recTPmy (lane 2), and crude extracts from *T. solium* (lane 3) and *T. crassiceps* (lane 4) were resolved by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and stained with Coomassie blue (SDS-PAGE panel) or transferred to nitrocellulose membranes (Naive, Blank vector, and synVW2-1 panels). Blots were reacted with pooled sera from each group of mice and developed by using a peroxidase-conjugated rabbit anti-mouse immunoglobulin G(H+L) secondary antibody.

spleen cells from mice that were immunized with pCMV-synVW2-1 (Table 1). Spleen cells from naïve and immune animals showed similar responses to concanavalin A. The amounts of gamma interferon (IFN- γ) and interleukin-4 present in supernatants of spleen cells stimulated with recVW2-1 were determined by a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay by using BD OptEIA cytokine kits (PharMingen). High levels of IFN- γ were detected in the supernatant of spleen cells from mice that were immunized with pCMV-synVW2-1 (Table 2). Assays with spleen cells from naïve and pCMV-inoculated mice showed that there was almost no IFN- γ and interleukin-4 production. The cellular immune response elicited in genetically immunized mice is consistent with a Th1 profile that has previously been related to protection in the murine model of cysticercosis (13).

The effect of genetic immunization with plasmid pCMV-synVW2-1 on a challenge with *T. crassiceps* cysts was evaluated in the murine model of cysticercosis as described previously (15). Two weeks after the last boost, mice were intraperitoneally challenged with 10 *T. crassiceps* cysts in saline, and they

TABLE 1. Antigen-specific proliferation of spleen cells from genetically immunized mice

Stimulation ^a	Stimulation index ^b		
	Naïve	Blank vector	synVW2-1
RPMI ^c	1 \pm 0.09	1 \pm 0.37	1 \pm 0.06
RPMI + recVW2-1	1.49 \pm 0.15	0.99 \pm 0.01	3.55 \pm 0.61 ^d
RPMI + ConA	22.89 \pm 1.19	23.79 \pm 0.18	21.62 \pm 1.85

^a Proliferative responses of spleen cells were determined by incorporation of [³H]thymidine, after 72 h of culture in the presence of recVW2-1 (1 and 5 μ g/ml) or concanavalin A (ConA) (1 μ g/ml) as a control.

^b Mean \pm standard deviation, calculated from the means of triplicate samples for radioactivity incorporation after a 18-h pulse with [³H]thymidine.

^c The absolute values for RPMI-stimulated cells were 16.87 \pm 1.43, 15.7 \pm 5.76, and 16.93 \pm 1.03 kcpm (means \pm standard deviations) for the naïve, blank vector, and synVW2-1 groups, respectively.

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

TABLE 2. Cytokine profiles of spleen cells from genetically immunized mice

Spleen cells ^a	Production (pg/ml) of ^b :	
	Interleukin-4 ^c	IFN- γ ^c
Naïve	≤ 7.8	≤ 31
Blank vector	≤ 7.8	≤ 31
syn VW2-1	≤ 7.8	705.66 \pm 32.62 ^d

^a Spleen cells from different groups were cultured in vitro in the presence of recVW2-1 (5 μ g/ml) to quantify interleukin-4 and IFN- γ in the culture supernatants.

^b The values are means \pm standard deviations for triplicate representatives of at least two experiments.

^c The lower detection limits for interleukin-4 and IFN- γ were 7.8 and 31 pg/ml, respectively.

^d Statistically significant difference between naïve cells and immune cells ($P < 0.01$).

were sacrificed 25 days later. The cysts from the peritoneal cavities were collected and counted by individual, ignoring the experimental design. Genetic immunization with synVW2-1 resulted in 43 to 48% reductions in the parasite load (Table 3); these values were close to the 52% obtained with the recombinant product (15). No statistically significant differences were observed between the pCMV blank vector and naïve mouse groups.

Preliminary vaccination trials with pigs in which conventional or genetic immunization with recVW2-1 and synVW2-1 was used also produced about 50% reductions in the parasite load (data not shown). Recent vaccination trials with pigs in which the workers used a variety of strategies, including the use of oncosphere or metacystode crude antigens, synthetic peptides, recombinant proteins, phage display, and genetic immunization (2–4, 8–10, 17, 18), have resulted in claims of remarkably high levels of protection against *T. solium* cysticercosis. However, the intrinsic problems with carrying out experimental infection of pigs have meant that most groups have had to use small numbers of animals or low challenge doses in experiments. In the case of field trials under uncontrolled conditions, vaccines are required to show prophylactic as well as therapeutic properties. It appears that a multifunctional vaccine formulation that includes several protective antigens (on-

TABLE 3. Effect of genetic immunization against murine cysticercosis caused by *T. crassiceps*

Expt	Immunization	No. of mice	Individual parasite loads (No. of cysts)	Avg load ^a	Load reduction (%) ^b
1	Naïve	9	52, 57, 75, 77, 80, 89, 98, 107, 109	83 \pm 7	
	Blank vector	9	67, 75, 88, 89, 90, 95, 101, 101, 111	91 \pm 5	
	synVW2-1	9	9, 13, 42, 44, 50, 58, 62, 65, 80	47 \pm 8	43 ^c
2	Naïve	8	65, 78, 90, 100, 102, 103, 105, 177	102 \pm 12	
	Blank vector	9	45, 53, 60, 83, 89, 98, 107, 114, 116	85 \pm 9	
	synVW2-1	9	35, 46, 47, 48, 49, 54, 59, 72, 72	54 \pm 4	48 ^c

^a The values are means \pm standard errors after 25 days of infection.

^b The parasite load in naïve control mice was defined as 100% to calculate the effect of immunization on the parasite loads in other groups of mice.

^c There was a statistically significant difference between naïve control mice and immunized mice ($P < 0.05$).

cosphere and metacestode) might be the way to produce a broad-spectrum vaccine to aid in the control of taeniosis/cysticercosis.

This work was supported in part by grants from CONACYT (grant 41693-M to J.P.L. and P.O.-S) and DGAPA-UNAM (grant IN215702-3 to P.O.-S). C.F.S. was supported by scholarships from DGAPA-UNAM and SNI-CONACYT.

REFERENCES

1. Chambers, R. S., and S. A. Johnston. 2003. High-level generation of polyclonal antibodies by genetic immunization. *Nat. Biotechnol.* **21**:1088–1092.
2. Flisser, A., C. G. Gauci, A. Zoli, J. Martínez-Ocana, A. Garza-Rodríguez, J. L. Domínguez-Alpizar, P. Maravilla, R. Rodríguez-Canul, G. Avila, L. Aguilar-Vega, C. Kyngdon, S. Geerts, and M. W. Lightowers. 2004. Induction of protection against porcine cysticercosis by vaccination with recombinant oncosphere antigens. *Infect. Immun.* **72**:5292–5297.
3. Guo, Y. J., S. H. Sun, Y. Zhang, Z. H. Chen, K. Y. Wang, L. Huang, S. Zhang, H. Y. Zhang, Q. M. Wang, D. Wu, and W. J. Zhu. 2004. Protection of pigs against *Taenia solium* cysticercosis using recombinant antigen or in combination with DNA vaccine. *Vaccine* **22**:3841–3847.
4. Huerta, M., A. S. de Aluja, G. Fragoso, A. Toledo, N. Villalobos, M. Hernandez, G. Gevorkian, G. Acero, A. Diaz, I. Alvarez, R. Avila, C. Beltran, G. Garcia, J. J. Martinez, C. Larralde, and E. Sciufto. 2001. Synthetic peptide vaccine against *Taenia solium* pig cysticercosis: successful vaccination in a controlled field trial in rural Mexico. *Vaccine* **20**:262–266.
5. Johnston, S. A., A. M. Talaat, and M. J. McGuire. 2002. Genetic immunization: what's in a name? *Arch. Med. Res.* **33**:325–329.
6. Laclette, J. P., A. Alagon, K. Willms, and A. Torre-Blanco. 1990. Purification of antigen B from *Taenia solium* cysticerci by affinity to mammalian collagen. *J. Parasitol.* **76**:273–275.
7. Laclette, J. P., C. B. Shoemaker, D. Richter, L. Arcos, N. Pante, C. Cohen, D. Bing, and A. Nicholson-Weller. 1992. Paramyosin inhibits complement C1. *J. Immunol.* **148**:124–128.
8. Manoutcharian, K., A. Diaz-Orea, G. Gevorkian, G. Fragoso, G. Acero, E. Gonzalez, A. De Aluja, N. Villalobos, E. Gomez-Conde, and E. Sciufto. 2004. Recombinant bacteriophage-based multiepitope vaccine against *Taenia solium* pig cysticercosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **99**:11–24.
9. Molinari, J. L., D. Rodriguez, P. Tato, R. Soto, F. Arechavaleta, and S. Solano. 1997. Field trial for reducing porcine *Taenia solium* cysticercosis in Mexico by systematic vaccination of pigs. *Vet. Parasitol.* **69**:55–63.
10. Rosas, G., G. Fragoso, T. Garate, B. Hernández, P. Ferrero, M. Foster-Cuevas, R. M. Parkhouse, L. J. Harrison, S. L. Briones, L. M. González, and E. Sciufto. 2002. Protective immunity against *Taenia crassiceps* murine cysticercosis induced by DNA vaccination with a *Taenia saginata* tegument antigen. *Microbes Infect.* **4**:1417–1426.
11. Sciufto, E., G. Fragoso, A. Fleury, J. P. Laclette, J. Sotelo, A. Aluja, L. Vargas, and C. Larralde. 2000. *Taenia solium* disease in humans and pigs: an ancient parasitosis disease rooted in developing countries and emerging as a major health problem of global dimensions. *Microbes Infect.* **2**:1875–1890.
12. Sciufto, E., G. Fragoso, L. Trueba, D. Lemus, R. M. Montoya, M. L. Diaz, T. Govezensky, C. Lomeli, G. Tapia, and C. Larralde. 1990. Cysticercosis vaccine: cross protecting immunity with *T. solium* antigens against experimental murine *T. crassiceps* cysticercosis. *Parasite Immunol.* **6**:687–696.
13. Terrazas, L. I., M. Cruz, M. Rodríguez-Sosa, R. Bojalil, F. Garcia-Tamayo, and C. Larralde. 1999. Th1-type cytokines improve resistance to murine cysticercosis caused by *Taenia crassiceps*. *Parasitol. Res.* **85**:135–141.
14. Timares, L., A. Takashima, and S. A. Johnston. 1998. Quantitative analysis of the immunopotency of genetically transfected dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:13147–13152.
15. Vázquez-Talavera, J., C. F. Solís, L. I. Terrazas, and J. P. Laclette. 2001. Characterization and protective potential of the immune response to *Taenia solium* paramyosin in a murine model of Cysticercosis. *Infect. Immun.* **69**:5412–5416.
16. Vázquez-Talavera, J., C. F. Solís, E. Medina-Escutia, Z. Morales-Lopez, J. Proaño, D. Correa, and J. P. Laclette. 2001. Human T and B cell epitope mapping of *Taenia solium* paramyosin. *Parasite Immunol.* **23**:575–579.
17. Verastegui, M., R. H. Gilman, A. Gonzales, H. H. Garcia, C. Gavidia, N. Falcon, T. Bernal, Y. Arana, V. C. Tsang, and the Cysticercosis Working Group In Peru. 2002. *Taenia solium* oncosphere antigens induce immunity in pigs against experimental cysticercosis. *Vet. Parasitol.* **108**:49–62.
18. Wang, Q. M., S. H. Sun, Z. L. Hu, D. Wu, and Z. C. Wang. 2003. Immune response and protection elicited by DNA immunisation against *Taenia* cysticercosis. *Vaccine* **21**:1672–1680.

Editor: W. A. Petri, Jr.

ANEXO 2

1 Control of scavenger receptor-mediated 2 endocytosis by novel ligands of different length

3 Margarita Guaderrama-Díaz,¹ Carlos F. Solís,²
 4 Gabriela Velasco-Loyden,¹ Juan P. Laclette² and Jaime Mas-Oliva¹

5 ¹*Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico;* ²*Instituto de Investigaciones*
 6 *Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico*

7

Received 9 July 2004; accepted 2 November 2004

8 Abstract

9 The scavenger receptor recognized as a multiligand family of receptors falls in the group that is internalised through endocytosis.
 10 In this report we used several recombinant fragments of the tapeworm protein paramyosin, known to form filamentous dimers that
 11 bind collagenous structures as ligands of different length for the class A type I scavenger receptor (SR-AI). While native CHO
 12 cells are unresponsive to any of the recombinant fragments, it is shown that CHO cells transfected with this receptor efficiently
 13 internalise recombinant fragments that correspond to two thirds of the full-length paramyosin. In contrast, recombinant products
 14 corresponding to one-third of the full-length paramyosin are not internalised. It is also shown that important molecules in the
 15 organization of the coated pit, are enriched when the two-thirds long paramyosin fragments were bound and internalised through
 16 the SR-AI. Moreover, internalisation of these fragments trigger a classical apoptotic pathway shown by the presence of TUNEL
 17 positive cells and the appearance of apoptotic bodies. We report paramyosin as a new ligand for the scavenger receptor and
 18 provide evidence supporting the notion that these receptors upon the formation of arrays with length-specific molecules, not
 19 only trigger endocytosis but also seem to regulate the synthesis of molecules involved in the organization of coated pits. (*Mol*
 20 *Cell Biochem xxx: 1–9, 2004*)

21 *Key words:* membrane receptors, lipoproteins, endocytosis, paramyosin, cytoskeleton, pattern-formation

22 Introduction

23 The family of proteins known as scavenger receptors was
 24 originally identified by Brown and Goldstein studying the
 25 endocytosis of lipoproteins [1]. These receptors trigger the
 26 endocytosis of chemically modified low-density lipoprotein
 27 (LDL), culminating in the transformation of macrophages
 28 into foam cells characteristic of atherosclerotic plaques [2,
 29 3]. Scavenger receptors are internalised through endocytosis
 30 when bound to a remarkable variety of ligands ranging from
 31 chemically modified lipoproteins [4, 5], platelet secretory
 32 proteoglycans [6–8] to molecules involved in cell adhesion
 33 and bacterial pathogenesis [9]. Moreover, scavenger receptor

knockout mice show increased susceptibility to infections 34
 with *Listeria monocytogenes* and herpes simplex virus type- 35
 1 [10]. Gram-positive bacteria are also endocytosed via these 36
 scavenger receptors [11]. 37

Five classes of scavenger receptors have been recognized 38
 on the basis of structural homologies and ligand-binding 39
 properties [4, 12]. Class A corresponds to transmembrane 40
 homotrimeric glycoproteins where SR-AI and SR-AII are 41
 alternative transcripts from the same gene with a cysteine 42
 rich domain in the carboxyl-terminal region of SR-AI. 43
 One striking feature of SR-A is the 72 aa collagenous 44
 domain resulting from GXY amino acid repeats including 45
 a conserved sequence (KGQKGEEKGS) that forms a triple 46

Address for offprints: Jaime Mas-Oliva, Instituto de Fisiología Celular, UNAM, Apdo, Postal 70-243, 04510 México, D.F., Mexico (E-mail: jmas@ifc.unam.mx)

47 helix, and the 22 amino acid region at the carboxyl end
 48 containing the site for binding of acetylated LDL [13].
 49 Strong electrostatic interactions between three K/E residues
 50 (intramolecular ion pairs) and K/Q residues mostly stabilize
 51 the triple-helical conformation (by hydrogen bonding).
 52 SR-AI and SR-AII also show a 26 aa transmembrane region
 53 and a 50 aa cytoplasmic domain that does not contain any
 54 of the internalisation signals present in similar cytoplasmic
 55 tails of different membrane proteins [14]. Different cytosolic
 56 domain sequences are known to trigger internalisation, like
 57 the highly degenerated tyrosine-based and leucine-based
 58 signals [15], through poorly studied lock and key recogni-
 59 tion events based on specific protein-protein interactions
 60 between receptor tails and cytoskeletal components [16].

61 The dynamics in the organization of receptors during endo-
 62 cytosis is still largely undefined. However, reports describing
 63 the formation of receptor complexes have been described [17,
 64 18]. It is believed that organized arrays of receptors might
 65 be assembled through interaction with intracellular-linking
 66 proteins [16, 19, 20]. Previous work on the binding and in-
 67 ternalization of β -very low-density lipoproteins (β -VLDL)
 68 through the apo-B/E-(LDL) receptor, led us to propose that
 69 molecules affecting the lateral motion of scavenger receptors,
 70 also affect the formation and consolidation of specific arrays
 71 that determine the internalisation of β -VLDL particles [21].
 72 In this report, we continue analysing whether SR-AI requires
 73 the formation of arrays on the plasma membrane in order to
 74 trigger internalization. We used novel ligands for the SR-AI
 75 that consisted of recombinant fragments of the filamentous,
 76 α -helical, protein of about 100 kDa known as paramyosin,
 77 present in the muscle of invertebrates including the para-
 78 sitic tapeworm *Taenia solium* [22, 23]. *T. solium* paramyosin
 79 (TPmy) binds polymeric collagen and can be isolated from
 80 crude extracts of invertebrates by a one-step affinity proce-
 81 dure. It inhibits the complement cascade at the level of C1,
 82 possibly through binding of C1q [22], and shows a complex
 83 quaternary structure including a domain with collagenous
 84 triple-helical structure and ligand-binding properties similar
 85 to SR-AI [24].

86 TPmy is reported here as a new ligand for the scavenger
 87 receptor. It is also shown that SR-AI mediated endocytosis
 88 induced by recombinant length specific TPmy also regulates
 89 the synthesis of molecules involved in the organization of the
 90 coated pit and triggers apoptosis.

91 **Materials and methods**

92 *Preparation of human lipoproteins*

93 LDL ($d = 1.019-1.063$ g/ml) and lipoprotein deficient serum
 94 ($d > 1.215$ g/ml) were obtained by sequential density gra-
 95 dient ultracentrifugation from normal human plasma, and

acetylated LDL (AcLDL) prepared as previously described 96
 [6]. 97

Recombinant fragments of TPmy

98
 99 A series of fragments derived from the full-length coding 99
 sequence of TPmy [23] were recombinantly expressed and 100
 purified by affinity chromatography as described elsewhere 101
 [25]. The DNA constructs were named as follows: TPmy 102
 VW2-1 (268 aa), for the amino end third of the molecule; 103
 TPmy VW3-3 (283 aa), for the central third; TPmy VW 4- 104
 1 (312 aa), for the carboxyl end third; TPmy VW5-3 (551 105
 aa), for the two thirds of the amino end and TPmy VW6- 106
 1 (595 aa) for the two-third carboxyl end (Fig. 1A). The 107
 recombinant proteins were dialyzed against 0.5 M NaCl, pH 108
 7.3, and the protein concentration was determined using the 109
 BCA protein assay (PIERCE Laboratories, Rockford, IL). 110
 The full-length TPmy was not used in this study because of 111
 aggregation problems encountered when using cell culture 112
 media. 113

Cell culture

114
 115 The CHO-SR cell line used in this study consists of CHO cells 115
 stably transfected with the bovine class A type I scavenger re- 116
 ceptor grown in 45% Dulbecco's modified Eagle's medium 117
 (DMEM), 45% F12 medium supplemented with 10% fetal 118
 bovine serum (FBS), and geneticin ($50 \mu\text{g/ml}$) at 37°C us- 119
 ing 5% CO_2 . Control CHO cells were cultivated in the same 120
 medium but containing penicillin (50 U/ml)/streptomycin 121
 ($50 \mu\text{g/ml}$). All cell culture reagents were purchased from 122
 Gibco BRL (Germany). 123

Internalization assays with FITC-labelled lipoproteins and paramyosin fragments

124
 125 AcLDL and recombinant paramyosin fragments were conju- 126
 gated to FITC. Two-hundred micrograms of protein were in- 127
 cubated with 5 mM FITC for 5 h at room temperature and ex- 128
 cess FITC removed by elution through G-25 columns. CHO 129
 and CHO-SR cells were incubated for 5 h at 37°C with dif- 130
 ferent FITC-paramyosin fragments or with FITC-AcLDL in 131
 45% DMEM/45% F12 medium without fetal bovine serum. 132
 Where indicated, AcLDL or fucoidin (Sigma Chemical Co) 133
 were added to the incubation medium as competitors. Af- 134
 ter incubation, the cells were washed five times with PBS 135
 containing 2 mg/ml BSA and once with PBS before dissolu- 136
 tion in 0.1 N NaOH. Fluorescence was evaluated on an ISS- 137
 PC1 fluorometer using an excitation wavelength of 480 nm 138
 and emission scans between 495-580 nm. Fluorescence 139

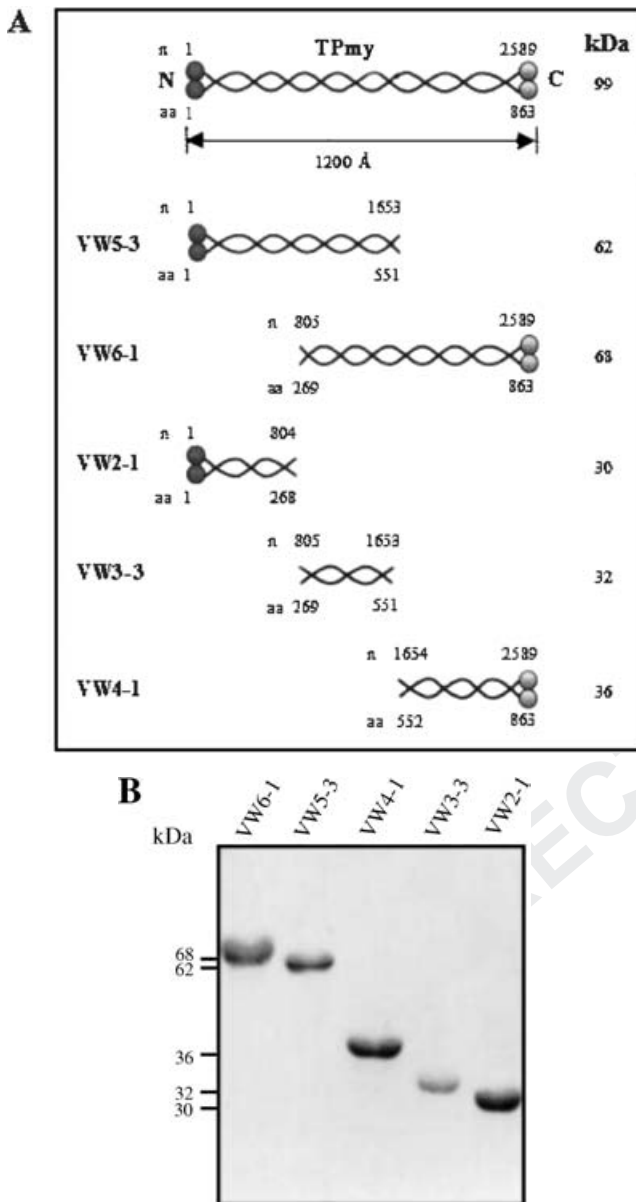


Fig. 1. TPmy recombinant fragments. (A) Schematic representation of the five recombinant fragments of TPmy employed in this study, indicating their nucleotide sequence (n), amino-acid sequence (aa), and molecular weight (kDa). (B) SDS-PAGE of the five TPmy recombinant fragments used. The kilo Dalton values for each one of the fragments is slightly higher since a tail of 46 aa ($\pm 5,000$ mw) needed for the affinity purification of the recombinant products is still present in these molecules.

140 measurements were calculated using standard fluorescence,
 141 dividing maximal fluorescence values by the percentage of
 142 protein labelling efficiency, taking into account the molar
 143 extinction values for both FITC and TPmy. When the non-
 144 labelled paramyosin fragments were used in order to stimu-
 145 late cells previous their lysis, the following procedure was
 146 used. CHO-SR cells were incubated for 1 h at 37°C in

medium without fetal bovine serum prepared as described 147
 before. TPmy VW5-3 or VW2-1 (15 $\mu\text{g/ml}$) was added and 148
 incubation was carried out for 4 h at 37°C. After incubation, 149
 the cells were washed with PBS and harvested. For competi- 150
 tion assays with fucoidin and TPmy VW5-3, CHO-SR 151
 cells were incubated as previously described. Proteins iso- 152
 lated from CHO-SR cells were washed in cold PBS and lyzed 153
 for 30 min at 4°C in lysis buffer containing 150 mM NaCl, 154
 1 mM EGTA, 1 mM EDTA, 0.5% NP40, 1% Triton X-100, 155
 10 mM Tris, pH 7.4, 0.2 mM sodium orthovanadate, 10 mM 156
 benzamidine, 10 $\mu\text{g/ml}$ leupeptin, 10 $\mu\text{g/ml}$ aprotinin, and 157
 250 μM PMSF. The lyzed cells were centrifuged and the 158
 supernatant recovered. The TPmy VW5-3 was localized as 159
 described further on using western blot analysis. Protein con- 160
 centration was determined using the BCA protein assay. 161

Subcellular fractionation

162

CHO-SR cells previously incubated with or without TPmy 163
 VW5-3 for 4 h at 37°C were rinsed with ice-cold PBS and 164
 harvested in lysis buffer as described before without NP40 165
 and Triton X-100. Cells were harvested by cell scraping and 166
 sonicated for 1 min and then centrifuged at 1500 g for 10 min 167
 at 4°C. The pellet was eliminated and the supernatant further 168
 centrifuged at 100 000 g for 45 min at 4°C. The cytosol 169
 supernatant fraction was retained and the pellet was solu- 170
 bilised in lysis buffer containing 1% Triton X-100 and 0.5% 171
 NP40 and further sonicated. The suspension was centrifuged 172
 at 15 000 g for 15 min at 4°C. The resulting supernatant was 173
 collected as the membrane fraction. Equal amounts of prote- 174
 in were boiled for 5 min in sodiumdodecylsulfate (SDS)- 175
 sample buffer and subjected to SDS-PAGE for subsequent 176
 immunoblot analysis. 177

Western blots analysis

178

Protein concentration was determined using the BCA pro- 179
 tein assay, and samples (10 $\mu\text{g/lane}$) from the total protein 180
 fraction and samples from the sub-cellular fractionation 181
 were separated by SDS-PAGE (10%) and electrotransferred 182
 overnight to nitrocellulose membranes (BioRad) at 4°C 183
 and 80 mA in a transfer buffer containing 150 mM glycine, 184
 25 mM Tris-HCl pH 8.8 and 20% methanol. The membranes 185
 were blocked at 4°C overnight with blocking buffer (5% 186
 nonfat milk in Tris-buffered saline (TBS) pH, 7.6 with 187
 1% Tween 20). The following antibodies each diluted 188
 500-fold were used: goat polyclonal anti-heavy chain of 189
 clathrin, CALM, $\beta 2$ and $\alpha 2$ -adaptins, and a rabbit polyclonal 190
 anti-Eps15, all purchased from Santa Cruz Biotechnology. A 191
 rat anti-mouse anti-CD204 (scavenger receptor) monoclonal 192
 antibody was obtained from Serotec, Raleigh, NC. A porcine 193

194 antibody against TPmy paramyosin was manufactured by
 195 our group. The secondary antibodies; donkey anti-goat IgG
 196 and goat anti-rabbit IgG were purchased from Santa Cruz
 197 Biotechnology (both conjugated to horseradish peroxidase),
 198 goat anti-rat horseradish peroxidase-mouse from Serotec,
 199 Raleigh, NC, and a rabbit anti-porcine horseradish peroxi-
 200 dase from Zymed laboratories, Inc. All secondary antibodies
 201 were used employing 5000-fold dilutions and incubated for
 202 1 h at 37 °C in blocking buffer. The membranes were washed
 203 with TBS-Tween 1%, and HRP activity was detected using a
 204 western-light chemiluminescence protocol (Amersham Phar-
 205 macia Biotech, UK). The percentage of band intensity was
 206 measured using the LaserPix software (multi-image BioRad
 207 Pic files) instrument where film background was employed
 208 as a zero or basal value, and 100% intensity the band with the
 209 highest signal. This resulted to be the band obtained when
 210 measuring protein eps15 in VW5-3 stimulated CHO-SR cells.

211 *Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick* 212 *end-labelling (TUNEL)*

213 CHO-SR cells (1×10^6) were treated with TPmy VW5-3
 214 (30 $\mu\text{g/ml}$) for 24 h and rinsed with ice-cold PBS. Briefly,
 215 cells were fixed with 1% (w/v) paraformaldehyde in PBS on
 216 ice for 15 min. The cells were washed with ice-cold PBS twice
 217 and stored at -20°C in 70% (v/v) ethanol prior to performing
 218 the TUNEL assays. Apoptotic cell death was assessed using
 219 the APO-BrdU TUNEL Assay Kit (Molecular Probes), and
 220 cells were treated according to the supplier's instructions.
 221 Cells with the DNA strands cleaved were labelled with Br-
 222 dUTP and terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) in the
 223 DNA-labelling solution at 22–24 °C overnight. At the end
 224 of incubation time, the cells were rinsed twice with rinse
 225 buffer provided by the Kit, and the BrdU was detected us-
 226 ing an Alexa Flour 488 dye-labelled anti-BrdU monoclonal
 227 antibody. Cells were viewed under fluorescence microscopy
 228 at $\times 100$ magnification, using an excitation wavelength of
 229 488 and an emission wavelength of 494. Viability was also
 230 analysed by flow cytometry.

231 **Results**

232 *Internalization of FITC-labelled lipoprotein and* 233 *paramyosin fragments carried out by the CHO-SR cell line*

234 In order to explore if TPmy recombinant fragments with abil-
 235 ity to bind collagen-like structures, triggered SR-AI mediated
 236 endocytosis, the five fragments described in our study were
 237 evaluated using internalization assays. Control experiments
 238 showed that CHO-SR cells expressing the class A type I scav-
 239 enger receptor, efficiently internalise FITC-labelled AcLDL

employed as an internalization control. Internalization was
 blocked by the presence of excess AcLDL or fucoidin in the
 incubation medium, but not by LDL (Fig. 2A). Similar inter-
 nalization assays of FITC-labelled recombinant fragments
 of TPmy showed that fragments VW5-3 and VW6-1 were
 efficiently endocytosed, whereas the shorter ones VW4-1,
 VW2-1 and VW3-3 were not (Fig. 2B). Scavenger receptor
 molecules mediate endocytosis of FITC-labelled VW5-3 and
 VW6-1 fragments, since CHO cells that do not express this
 receptor were unresponsive to any of the TPmy recombinant
 fragments tested. Furthermore, the highly negative molecule
 fucoidin efficiently competed with the two active fragments
 of TPmy (Figs. 2C, D and Fig. 3A), in agreement to previ-
 ous reports studying the binding and internalization of several
 molecules carried out by the scavenger receptor [2]. These re-
 sults demonstrated that endocytosis of the recombinant frag-
 ments of TPmy was length-dependent and mediated by the
 scavenger receptor most probably through binding to its col-
 lagenous stalk. This phenomenon presents the possibility that
 TPmy VW5-3 and VW6-1 induced the arrangement of recep-
 tors at optimal distances from each other that in turn might
 have stimulated the formation of coated pits and accelerated
 endocytosis, whereas the shorter TPmy fragments, VW4-1,
 VW2-1 and VW3-3, did not. Using the incubation conditions
 described, it was not possible to evaluate the internalization
 characteristics of the full-length TPmy, because of serious
 aggregation problems encountered during the assays.

267 *Localization of endocytic proteins in CHO-SR cells*

268 In order to determine if the extracellular events induced by the
 269 TPmy fragments employed as ligands for the scavenger re-
 270 ceptor were indeed reflected on any of the intracellular events
 271 associated to endocytosis, as a first approach, we investigated
 272 the levels of expression of several proteins involved in the or-
 273 ganization of coated pits. Using Western blot analysis carried
 274 out on total protein fractions obtained from CHO-SR cells,
 275 we found that clathrin, β -adaptin, α -adaptin, eps15, and the
 276 scavenger receptor itself, showed a modest increase in their
 277 level of expression during the internalization of the TPmy
 278 VW5-3 fragment with respect to basal conditions (Fig. 3B).
 279 As a semiquantitative way to express these changes, Fig. 3C
 280 shows the percentage increase of band intensity as shown
 281 in Fig. 3B, taking the basal value as background and the
 282 band with the highest value as 100% intensity. Although
 283 protein eps15 was taken as the 100% intensity band, it be-
 284 comes evident that β -adaptin, α -adaptin and the scavenger
 285 receptor itself show the best response to TPmy fragment
 286 VW5-3. When total protein fractions were separated into
 287 membrane/cytoskeleton and cytosol fractions, these differ-
 288 ences not only became clearer, but we had the opportunity
 289 to differentiate between protein mainly associated with the

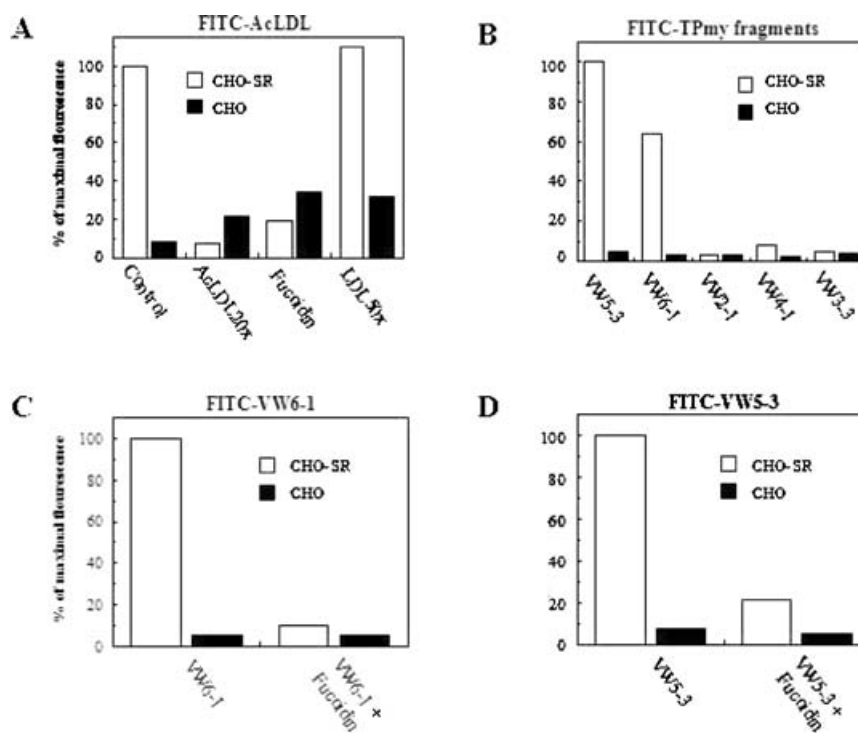


Fig. 2. Internalization of FITC-AcLDL and FITC-TPmy by CHO and CHO-SR cells. (A) Control experiments employing cells incubated for 5 h with FITC-labelled AcLDL (10 $\mu\text{g/ml}$), 200 $\mu\text{g/ml}$ of AcLDL and fucoidan, and 500 $\mu\text{g/ml}$ of LDL were used as competitors when added to the incubation medium. (B) Internalization of the FITC-labelled TPmy recombinant fragments (15 $\mu\text{g/ml}$) by cells incubated for 5 h at 37 $^{\circ}\text{C}$. Internalization of the FITC-labelled fragments: (C) VW5-3, and (D) VW6-1, showing the inhibition rendered by fucoidan. Data represent the mean of three independent experiments using triplicates.

290 membrane/cytoskeleton or protein located in the cytosolic
 291 fraction (Fig. 3D). Clathrin was found associated almost ex-
 292 clusively with the cytosolic fraction whereas β -adap-
 293 tain and eps15 with the membrane/cytoskeleton fraction.
 294 The scavenger receptor was found in both fractions.

295 *Cell death provoked by the TPmy fragment VW5-3*
 296 *in CHO-SR cells*

297 During the internalization process of TPmy VW5-3 by CHO-
 298 SR cells, using transmission electron microscopy important
 299 morphological changes were observed in the plasma mem-
 300 brane, nucleus and mitochondria, as well as the appearance
 301 of crystal like structures in the nucleus and in general an in-
 302 crease in cell size (data not shown). Looking further into the
 303 possibility that these changes might have been associated to
 304 apoptotic damage, confocal microscopy showed the presence
 305 of typical apoptotic bodies when internalization of TPmy
 306 VW5-3 was carried out for 24 h (Fig. 4). These experiments
 307 clearly showed a change in size between CHO-SR cells inter-
 308 nalising TPmy VW5-3 through the SR-AI, and CHO control
 309 cells most probably internalising a basal amount of TPmy
 310 VW5-3 through the SR-BI receptor known to the present in

this cell type. Basal internalization through the SR-BI seem
 311 to account for less than 10% of the total TPmy found inside
 312 CHO-SR cells shown suggested in the experiment presented
 313 in Fig. 2. 314

Furthermore, using flow cytometry searching for TUNEL
 315 positive cells, we substantiated the viability loss and the fact
 316 that cells internalising TPmy VW5-3 might be entering a
 317 classical apoptotic pathway (Fig. 5). As shown in Fig. 5A,
 318 although increasing concentrations of TPmy VW5-3 caused
 319 an elevated cell death rate, we observed that the highest con-
 320 centrations employed seemed to have promoted a tendency
 321 for the cells to recover. We believe this is not the case since
 322 a decrease in cell death might be associated to the fact that,
 323 as shown in Fig. 4, the use of high TPmy VW5-3 concentrations
 324 promotes cell/cell phagocytosis as shown by the presence of
 325 multiple apoptotic nuclei. Therefore, the flow cytometry ap-
 326 paratus might have taken multinucleated cells as single events
 327 with the concomitant loss of individual positive cells. Em-
 328 ploying the highest value of TUNEL positive cells, we carried
 329 out the viability analysis of CHO-SR cells. This analysis
 330 showed that a control experiment kept 95% of viable cells
 331 with only 5% of cells undergoing apoptosis. On the other
 332 hand, TPmy VW5-3 treated cells only showed 76% viability
 333 and 24% of cells undergoing apoptotic cell death (Fig. 5B). 334

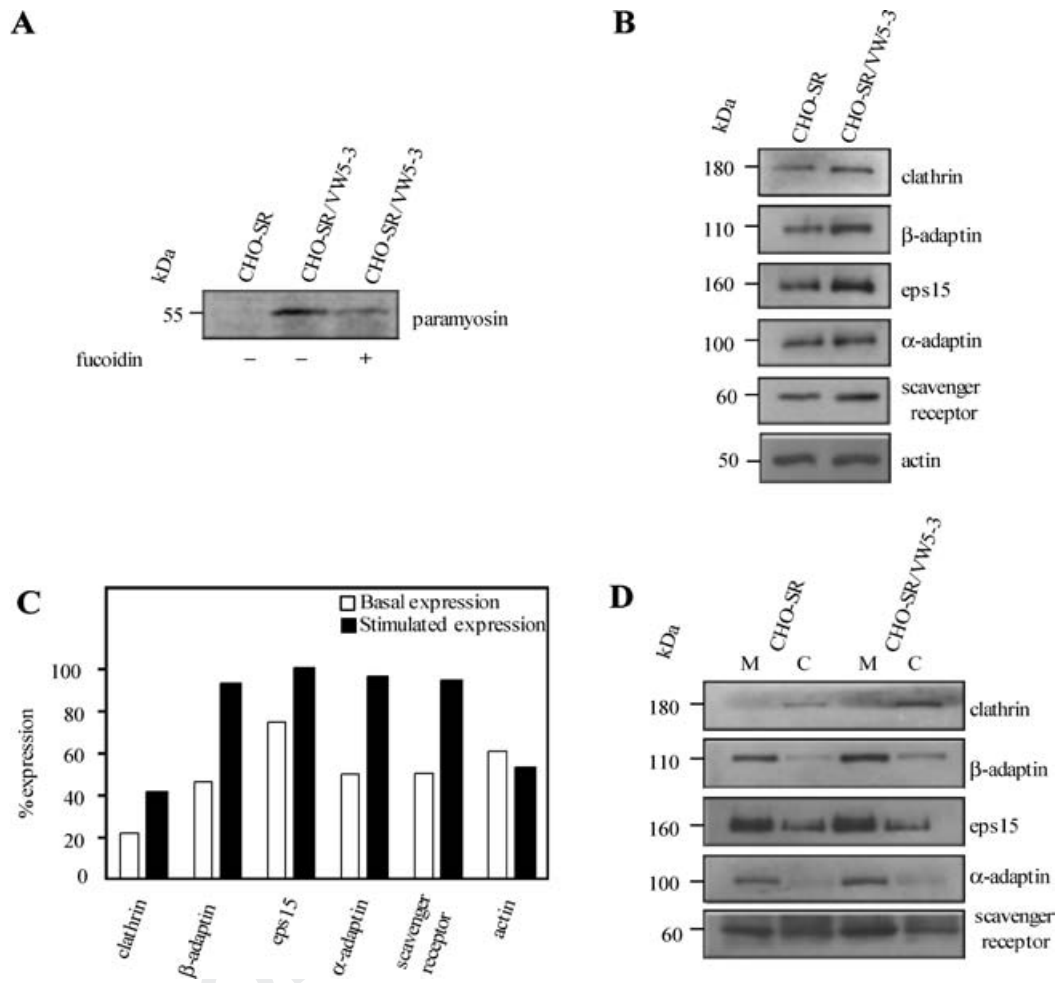


Fig. 3. Western blot analysis of endocytic proteins from CHO-SR cells incubated with TPmy VW5-3. (A) Total protein fractions (30 μ g) from CHO-SR cells previously incubated with or without TPmy VW5-3 in the presence or the absence of fucoidin were immunoblotted in order to detect the localization of TPmy VW5-3, using an anti-TPmy VW5-3 antibody. (B) Total protein fractions (10 μ g) from CHO-SR cells previously incubated in the absence or the presence of TPmy VW5-3. The specific endocytosis related proteins shown in the figure were visualized using specific antibodies against each one of them. (C) Protein quantitation as shown in B. Percentage increments in band intensity taking film background as the basal value and the band with highest intensity as 100% (eps15 in VW5-3 stimulated CHO-SR cells). (D) Subcellular protein fractions (10 μ g) (membrane/cytoskeleton, M; cytosolic, C) from CHO-SR cells previously incubated in the absence or the presence of TPmy VW5-3 were analysed as in B.

335 Discussion

336 Natural and recombinant *T. solium* paramyosin have been
 337 reported to bind type I collagen, a property that can be ex-
 338 ploited for its isolation from a crude extract of this para-
 339 site through a one-step affinity procedure [26]. TPmy also
 340 binds C1q and blocks function of the complement cascade
 341 [22]. The feature shared by collagen type I and C1q is the
 342 presence of triple helical collagenous structures. Although a
 343 number of aspects on the binding of paramyosin to collagen
 344 type I or C1q are not clear, we proposed that long-range pe-
 345 riodicities of charged surface residues along this coiled-coil
 346 filamentous protein, might be responsible. Thus, the initial
 347 idea underlying our assays with recombinant fragments of *T.*

348 *solium* paramyosin was to determine if it could also interact
 349 with the SR-AI, which also poses a triple helical collagenous
 350 domain. The way to evaluate endocytosis of TPmy was
 351 carried out by measuring the internalization of FITC-labelled
 352 recombinant TPmy fragments of different lengths, by CHO
 353 cells that were stably transfected with the SR-AI. Our results
 354 indicated that fragments corresponding to two thirds of the
 355 full-length protein (VW5-3 and VW6-1) induced endocytosis,
 356 whereas fragments that correspond to only one third of the
 357 full-length protein, coming from the amino end, the middle
 358 section and the carboxyl end (VW4-1, VW3-3, VW2-
 359 1) were all inactive. Interestingly, VW5-3 and VW6-1 only
 360 share one third corresponding to the middle portion of TPmy,
 361 suggesting that the relevant feature for activity is their length

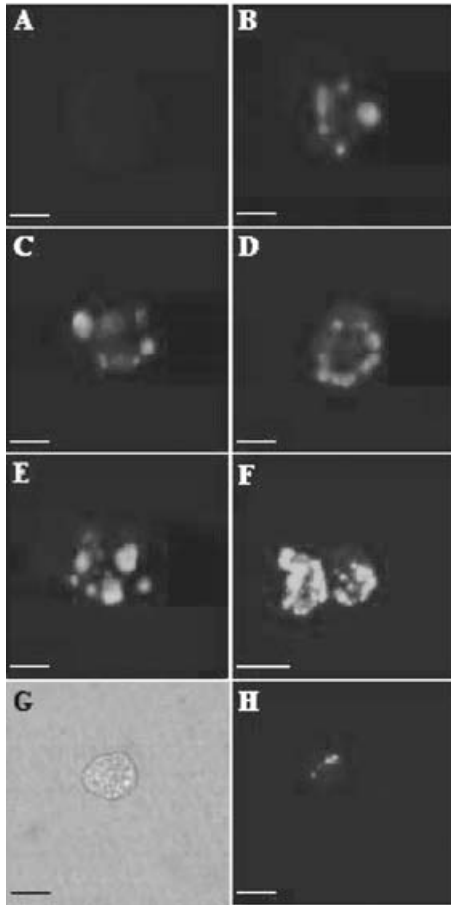


Fig. 4. Apoptotic cell death in CHO-SR cells treated with TPmy VW5-3. CHO-SR cells treated with increasing amount of TPmy VW5-3 (0, A; 10, B; 20, C; 30, D; 40, E and 50 $\mu\text{g/ml}$, F) were subjected to confocal fluorescence microscopy. Detection of BrdU associated to apoptotic bodies was achieved using an Alexa Fluor 488 dye-labelled anti-BrdU monoclonal antibody. Scale bars, 5 μm (B, C, D, E) and 10 μm (F). CHO control cells were treated with 30 $\mu\text{g/ml}$ TPmy (G, H). Phase contrast image (G) and confocal fluorescence image (H).

362 and not their location on the complete protein. The activity of
 363 these fragments is mostly specific for the SR-AI, since non-
 364 transfected CHO cells naturally containing the SR-BI, seem
 365 to present a basal internalization activity counting for less
 366 than 10% of the total TPmy internalization shown in CHO-
 367 SRAI transfected cells. Taken together, these results suggest
 368 that a physical arrangement between SRAI type receptors
 369 at the cell surface maintaining critical distances from each
 370 other, might be a factor that promotes internalization.

371 Clathrin and a group of heterotetrameric proteins known
 372 as adapters are the main components of coated pits; AP-1 re-
 373 stricted to the coated pit in the Golgi region and AP-2 associ-
 374 ated with the cell membrane [27]. AP-2 is a heterotetrameric
 375 complex that binds clathrin lattices and functions as an adap-
 376 tor by linking receptors [14, 28, 29]. The α -subunit apparently

interacts directly with dynamin, a GTPase that participates 377
 in the formation of the budding of clathrin-coated vesicles 378
 [30, 31]. This subunit has been also associated to several fac- 379
 tors including Eps15, a protein that binds to the epidermal 380
 growth factor receptor tyrosine kinase [32, 33], and Epsin 381
 that seems to assist clathrin-mediated endocytosis [32]. The 382
 β -2 chain of AP-2 has been also proposed to bind the heavy 383
 chain of clathrin, as well as to protein CALM involved in the 384
 regulation of clathrin recruitment in the membrane [34–36]. 385
 The μ 2-chain is suspected to interact equally well with the 386
 leucine and the YXX θ internalization signals present in sev- 387
 eral cytoplasmic tails of membrane receptors [27, 37, 38]. The 388
 internalization signal FXNPXY contained at the cytoplasmic 389
 tail of the LDL receptor, apparently interacts directly with 390
 clathrin [39], and it is not dependent on adapter proteins. 391
 Although this might be considered a regulatory mechanism 392
 for the association of AP-2 with clathrin, the binding sites 393
 of AP-2 with several membrane components, often taken for 394
 granted, are still unclear [29]. 395

Several authors have proposed that formation of protein 396
 microdomains on the cell surface regulate processes such 397
 as the sorting of receptors in polarized cells [14], signal 398
 transduction [40], and the propagation of conformational 399
 changes of receptors across the membrane [41]. For instan- 400
 ce, it has been suggested that clustering of glycosyl- 401
 phosphatidylinositol-anchored membrane proteins bearing 402
 the same ectodomains is explained through the establish- 403
 ment of protein arrays as “platforms” or “rafts” stabilized 404
 by cholesterol [42, 43]. However, the evidence related to the 405
 formation of organized structures on the cell membrane with 406
 concomitant physiological responses, still remains fragmen- 407
 tary. In the case of apoptosis, it has been suggested that this 408
 phenomenon can be triggered in response to changes in cell 409
 shape, where mechanical forces in the cytoskeleton play an 410
 apparent control [44]. It has been also reported that cells with 411
 extended shape divide actively, whereas cells competing for 412
 space in the same culture dish tend to adopt a round shape 413
 and die [45]. This evidence seems to support our previous 414
 proposal that special arrangements of “networking proteins” 415
 on the cell membrane, such as single-crossing receptors that 416
 extend from the extracellular space to the cytoskeleton, can be 417
 reflected on intracellular face responses [21]. It is conceivable 418
 that specific arrays of receptors on the cell membrane result 419
 in the transduction of mechanical signals into physiological 420
 responses through cytoplasmic protein–protein recognition. 421

Our results are consistent with the fact that during inter- 422
 nalization of TPmy fragment VW5-3 and only after the re- 423
 arrangement of receptors at the all surface, their cytoplasm 424
 tails optimally interact with cytoskeleton components, a trig- 425
 gering mechanism that optimises endocytosis and allows the 426
 optimal expression of specific coated pit components. More- 427
 over we present evidence that internalization of TPmy might 428
 be considered a stressful condition, as previously shown by 429

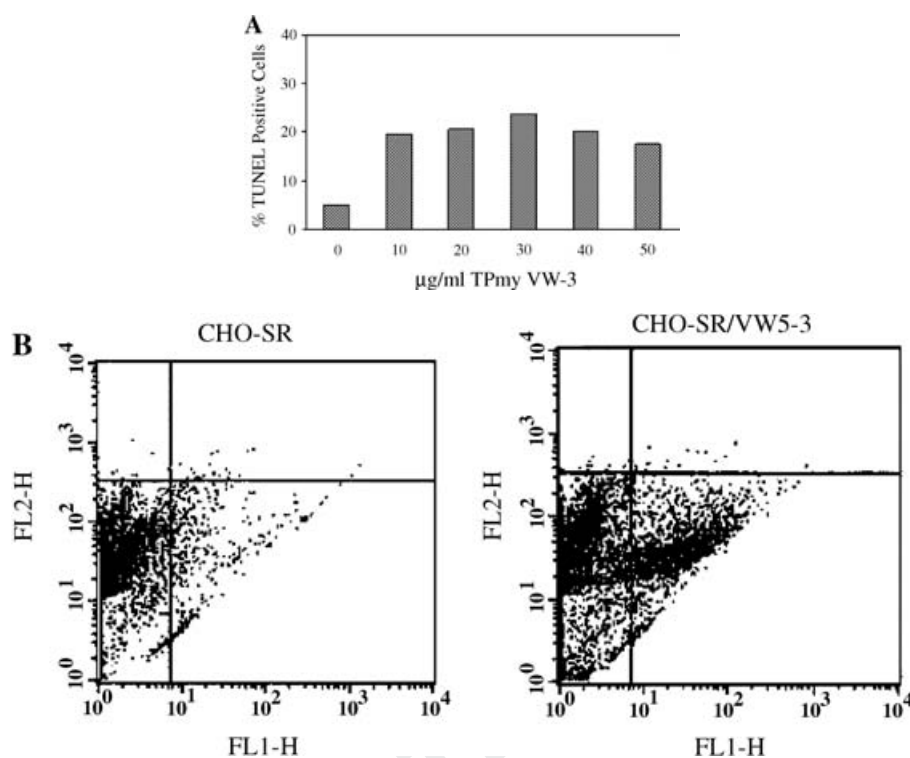


Fig. 5. Viability loss of CHO-SR cells caused by TPmy VW5-3. (A) Percentage of TUNEL-positive cells determined by flow cytometry 24 h after incubation with different amount of TPmy VW5-3 (average result of two independent experiments). (B) Flow cytometry of CHO-SR control cells (left panel) and CHO-SR cells treated with TPmy VW5-3 (30 µg/ml) for 24 h (right panel). Representative images of three independent experiments.

430 us with the internalization of several other ligands through the
 431 scavenger receptor type A [46], since CHO-SR cells treated
 432 with increasing concentrations of TPmy VW5-3 tend to lower
 433 viability through the process of apoptotic cell death. This
 434 possibility is substantiated by increased percentages of tunel
 435 positive cells directly related to the presence of cell apoptotic
 436 vesicula and multinucleated cells.

437 Since transduction of the signal employed by receptors
 438 such as the LDL receptor and the scavenger receptor is not
 439 easily explained by conventional mechanisms, we believe that
 440 specific arrangement of receptors might be relevant. There-
 441 fore, based on the present results we propose that ligand-
 442 controlled dynamic arrays of receptors at the cell surface not
 443 only stimulate internalization but also trigger the recruitment
 444 and regulation of specific cytosolic molecules associated to
 445 the formation of the coated pit promoting in this specific case
 446 an apoptotic event.

447 Our study also identifies the scavenger receptor as a po-
 448 tential binding site for TPmy and provides a route to further
 449 characterize the role of paramyosins in several host-parasite
 450 relationships. Since paramyosin binding and uptake by the
 451 scavenger receptor may participate in the processing and/or
 452 presentation to B or T cells [44], this phenomenon may be
 453 also of relevance in the study of the immune response shown
 454 by infected hosts.

Acknowledgments

455

We thank Dr. Robert E. Pitas for providing CHO and CHO- 456
 SR cells, and Dr. Alejandro Fernández for expert advice on 457
 FITC labeling. We also thank Blanca Delgado-Coello, and 458
 L. Fernando Oropeza-Hernández for technical support, and 459
 Mrs. M. Elena Gutiérrez for word processing. This work was 460
 partially supported by grants from DGAPA-UNAM (JM-O) 461
 and from CONACYT (JM-O and JPL). 462

References

463

1. Goldstein JL, Ho YK, Basu SK, Brown MS: Binding site on 464
 macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low 465
 density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. Proc Natl 466
 Acad Sci USA 76: 333–337, 1979 467
2. Krieger M, Herz J: Structures and functions of multiligand lipoprotein 468
 receptors: Macrophage scavenger receptors and LDL receptor-related 469
 protein (LRP). Annu Rev Biochem 63: 601–637, 1994 470
3. Lusis AJ: Atherosclerosis. Nature 407: 233–241, 2000 471
4. Krieger M: The other side of scavenger receptors: Pattern recognition 472
 for host defense. Curr Opin Lipidol 8: 275–280, 1997 473
5. Rohrer L, Freeman M, Kodama T, Penman M, Krieger M: Coiled-coil 474
 fibrous domains mediate ligand binding by macrophage scavenger re- 475
 ceptor type II. Nature 343: 570–572, 1990 476

- 477 6. Mas-Oliva J, Arnold KS, Wagner WD, Phillips DR, Pitas RE, Innerarity
478 TL: Isolation and characterization of a platelet-derived macrophage-
479 binding proteoglycan. *J Biol Chem* 269: 10177–10183, 1994
- 480 7. Santiago-García J, Mas-Oliva J, Innerarity TL, Pitas RH: The protease
481 inhibitor nexin II and basement membrane proteoglycans important in
482 atherosclerosis are ligands for class A scavenger receptor. *Abstr Circ*
483 98: I645, 1998
- 484 8. Santiago-García J, Mas-Oliva J, Innerarity TL, Pitas RE: Secreted forms
485 of the amyloid-beta precursor protein are ligands for the class A scav-
486 enger receptor. *J Biol Chem* 276: 30655–30661, 2001
- 487 9. El Khoury J, Hickman SE, Thomas CA, Cao L, Silverstein SC, Loike
488 JD: Scavenger receptor-mediated adhesion of microglia to beta-amyloid
489 fibrils. *Nature* 382: 716–719, 1996
- 490 10. Suzuki H, Kurihara Y, Takeya M, Kamada N, Kataoka M, Jishage K,
491 Ueda O, Sakaguchi H, Higashi T, Suzuki T, Takashima Y, Kawabe
492 Y, Cynshi O, Wada Y, Honda M, Kurihara H, Aburatani H, Doi T,
493 Matsumoto A, Azuma S, Noda T, Toyoda Y, Itakura H, Yazaki Y,
494 Kodama T, et. al.: A role for macrophage scavenger receptors in
495 atherosclerosis and susceptibility to infection. *Nature* 386: 292–296,
496 1997
- 497 11. Dunne DW, Resnick D, Greenberg J, Krieger M, Joiner KA: The type
498 I macrophage scavenger receptor binds to gram-positive bacteria and
499 recognizes lipoteichoic acid. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 1863–1867,
500 1994
- 501 12. Platt N, Gordon S: Scavenger receptors: Diverse activities and promiscu-
502 ous binding of polyanionic ligands. *Chem Biol* 5: 193–203, 1998
- 503 13. Yamamoto K, Nishimura N, Doi T, Imanishi T, Kodama T, Suzuki K,
504 Tanaka T: The lysine cluster in the collagen-like domain of the scavenger
505 receptor provides for its ligand binding and ligand specificity. *FEBS Lett*
506 414: 182–186, 1997
- 507 14. Kirchhausen T, Bonifacino JS, Riezman H: Linking cargo to vesicle
508 formation: Receptor tail interactions with coat proteins. *Curr Opin Cell*
509 *Biol* 9: 488–495, 1997
- 510 15. Marks MS, Woodruff L, Ohno H, Bonifacino JS: Protein targeting by
511 tyrosine- and di-leucine-based signals: Evidence for distinct saturable
512 components. *J Cell Biol* 135: 341–354, 1996
- 513 16. Pawson T, Scott JD: Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor
514 proteins. *Science* 278: 2075–2080, 1997
- 515 17. Weiss A, Littman DR: Signal transduction by lymphocyte antigen re-
516 ceptors. *Cell* 76: 263–274, 1994
- 517 18. Qian D, Weiss A: T cell antigen receptor signal transduction. *Curr Opin*
518 *Cell Biol* 9: 205–212, 1997
- 519 19. Schlessinger J: SH2/SH3 signaling proteins. *Curr Opin Genet Dev* 4:
520 25–30, 1996
- 521 20. Lemmon MA, Ferguson KM, Schlessinger J: PH domains: Diverse se-
522 quences with a common fold recruit signaling molecules to the cell
523 surface. *Cell* 85: 621–624, 1996
- 524 21. Mas-Oliva J, Velasco-Loyden G, Haines TH: Receptor pattern forma-
525 tion as a signal for the capture of lipoproteins. *Biochem Biophys Res*
526 *Commun* 224: 212–218, 1996
- 527 22. Laclette JP, Shoemaker CV, Richter D, Arcos L, Pante N, Cohen C,
528 Bing D, Nicholson-Weller A: Paramyosin inhibits complement C1. *J*
529 *Immunol* 148: 124–128, 1992
- 530 23. Landa A, Laclette JP, Nicholson-Weller A, Shoemaker CB: cDNA
531 cloning and recombinant expression of collagen-binding and comple-
532 ment inhibitor activity of *Taenia solium* paramyosin (AgB). *Mol*
533 *Biochem Parasitol* 60: 343–347, 1993
- 534 24. Acton S, Resnick D, Freeman M, Ekkel Y, Ashkenas J, Krieger M: The
535 collagenous domains of macrophage scavenger receptors and comple-
536 ment component C1q mediate their similar, but not identical, binding
537 specificities for polyanionic ligands. *J Biol Chem* 268: 3530–3537, 1993
- 538 25. Vazquez-Talavera J, Solis CF, Medina-Escutia E, Lopez ZM, Proano
539 J, Correa D, Laclette JP: Human T and B cell epitope map-
ping of *Taenia solium* paramyosin. *Parasite Immunol* 23: 575–579, 2001
26. Laclette JP, Alagon A, Willms K, Torre-Blanco A: Purification of antigen
B from *Taenia solium* cysticerci by affinity to mammalian collagen. *J*
Parasitol 76: 273–275, 1990
27. Cremona O, De Camilli P: Synaptic vesicle endocytosis. *Curr Opin Neu-*
robiol 7: 323–330, 1997
28. Robinson MS: The role of clathrin, adaptors and dynamin in endocyto-
sis. *Curr Opin Cell Biol* 6: 538–544, 1994
29. Schmid SL: Clathrin-coated vesicle formation and protein sorting: An
integrated process. *Annu Rev Biochem* 66: 511–548, 1997
30. Goodman OB Jr, Keen JH: The alpha chain of the AP-2 adap-
tor is a clathrin binding subunit. *J Biol Chem* 270: 23768–23773,
1995
31. Wang LH, Sudhof TC, Anderson RG: The appendage domain of alpha-
adaptin is a high affinity binding site for dynamin. *J Biol Chem* 270:
10079–10083, 1995
32. Cupers P, Jadhav AP, Kirchhausen T: Assembly of clathrin coats disrupts
the association between Eps15 and AP-2 adaptors. *J Biol Chem* 273:
1847–1850, 1998
33. Benmerah A, Begue B, Dautry-Varsat A, Cerf-Bensussan N: The ear of
alpha-adaptin interacts with the COOH-terminal domain of the Eps 15
protein. *J Biol Chem* 271: 12111–12116, 1996
34. Shih W, Gallusser A, Kirchhausen T: A clathrin-binding site in the hinge
of the beta 2 chain of mammalian AP-2 complexes. *J Biol Chem* 270:
31083–31090, 1995
35. Chen H, Fre S, Slepnev VI, Capua MR, Takei K, Butler MH, Di
Fiore PP, De Camilli P: Epsin is an EH-domain-binding protein
implicated in clathrin-mediated endocytosis. *Nature* 394: 793–797,
1998
36. Tebar F, Bohlander SK, Sorkin A: Clathrin assembly lymphoid
myeloid leukemia (CALM) protein: Localization in endocytic-coated
pits, interactions with clathrin, and the impact of overexpres-
sion on clathrin-mediated traffic. *Mol Biol Cell* 10: 2687–2702,
1999
37. Hirst J, Robinson MS: Clathrin and adaptors. *Biochim Biophys Acta*
1404: 173–193, 1998
38. Morimoto K, Wada Y, Hinagata J, Imanishi T, Kodama T, Doi T: VXF-
D in the cytoplasmic domain of macrophage scavenger receptors mediates
their efficient internalization and cell-surface expression. *Biol Pharm*
Bull 22: 1022–1026, 1999
39. Kibbey RG, Rizo J, Gierasch LM, Anderson RG: The LDL receptor
clustering motif interacts with the clathrin terminal domain in a reverse
turn conformation. *J Cell Biol* 142: 59–67, 1998
40. Brown DA, Rose JI: Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-
enriched membrane subdomains during transport to the apical cell
surface. *Cell* 68: 533–544, 1992
41. Ottemann KM, Xiao W, Shin YK, Koshland DE, Jr: A piston model
for transmembrane signaling of the aspartate receptor. *Science* 285:
1751–1754, 1999
42. Stulnig TM, Berger M, Sigmund T, Stockinger H, Horejsi V, Waldhausl
W: Signal transduction via glycosyl phosphatidylinositol-anchored
proteins in T cells is inhibited by lowering cellular cholesterol. *J Biol*
Chem 272: 19242–19247, 1997
43. Simons K, Ikonen E: How cells handle cholesterol. *Science* 290:
1721–1726, 2000
44. Chen CS, Mrksich M, Huang S, Whitesides GM, Ingber DE: Geometric
control of cell life and death. *Science* 276: 1425–1428, 1997
45. Pearson AM: Scavenger receptors in innate immunity. *Curr Opin*
Immunol 8: 20–22, 1996
46. Aguilar-Gaytan R, Mas-Oliva J: Oxidative stress impairs endocytosis
of receptor scavenger class A. *Biochem Biophys Res Commun* 305:
510–517, 2003

ANEXO 3

Cloning, Characterization, and Functional Expression of *Taenia Solium* Calreticulin

Fela Mendlovic*, Pedro Ostoa-Saloma†, Carlos F. Solís†, Joel Martínez-Ocaña‡, Ana Flisser*‡, and Juan P. Lalette†§, *Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM, México DF 04510, México; †Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, México DF 04510, México; ‡Dirección de Investigación, Hospital General "Dr. Manuel Gea González", SSA, México DF 14000, México; §To whom correspondence should be addressed. e-mail: lalette@servidor.unam.mx

ABSTRACT: Calreticulin is an endoplasmic reticulum protein involved in the homeostasis of intracellular Ca^{++} and other physiological processes. A complementary DNA clone containing the complete coding sequence of *Taenia solium* calreticulin (TsCRT) was isolated and characterized. Recombinant TsCRT was expressed in bacteria as a 50-kDa protein that specifically bound calcium when tested in a radioassay. The deduced amino acid sequence has 47–50% identity with other reported calreticulins. Poor recognition of TsCRT by human and pig sera with confirmed cysticercosis discourages its use for diagnosis of the disease. However, further characterization and localization studies could provide insights into the role of TsCRT in *T. solium* physiology and host–parasite interactions.

Calreticulin (CRT) is a highly conserved, multifunctional protein, found mainly in the lumen of the endoplasmic reticulum (ER) in almost all eukaryotic cells. Its main role is to control intracellular Ca^{++} homeostasis, but it also participates in cell motility, secretion, adhesion, protein synthesis, and gene expression. Moreover, CRT acts as a lectin-like molecular chaperone in the quality control of newly folded glycoproteins (Michalak et al., 1999). Homologues of CRT have been described in several parasites, including *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania donovani*, *Schistosoma mansoni*, *Onchocerca volvulus*, and *Necator americanus*, (Khalife et al., 1993; Rokeach et al., 1994; Joshi et al., 1996; Labriola et al., 1999; Kasper et al., 2001). Anti-CRT antibodies have been detected in the sera from patients with Chagas disease, schistosomiasis, and onchocercosis (Khalife et al., 1993; Rokeach et al., 1994; Marcelain et al., 2000). Recently, human and nematode CRT have been shown to bind C1q and interfere with complement activation, suggesting a role in host–parasite relationships (Kovacs et al., 1998; Kasper et al., 2001). *Taenia solium* cysticercosis is a public health problem in underdeveloped countries and is an emerging disease in the United States. (Flisser, 2002). Here, we report the cloning, characterization, and functional expression of CRT from *T. solium*.

A complementary DNA (cDNA) library from adult *T. solium* worms, constructed in λ ZAPII (García-Domínguez, 1993), was immunoscreened with pooled immune rabbit sera raised against 2 immunogenic glycoproteins, GP24 and GP42 (Plancarte et al., 1999), according to standard protocols (Sambrook et al., 1989). Clone 3.2 contained a cDNA fragment with a 1,325-bp coding sequence, flanked by 6 nucleotides upstream from the start codon, 138 downstream from the stop codon, and a putative polyadenylation signal (AGTAAA) located 18 bp upstream from the polyA tail. The coding sequence showed an open reading frame encoding 395 amino acids. The deduced amino acid sequence contained several features common to all calreticulins: (1) 2 CRT family sequences, GP24 and GP42 (Plancarte et al., 1999), according to standard protocols (Sambrook et al., 1989). Clone 3.2 contained a cDNA fragment with a 1,325-bp coding sequence, flanked by 6 nucleotides upstream from the start codon, 138 downstream from the stop codon, and a putative polyadenylation signal (AGTAAA) located 18 bp upstream from the polyA tail. The coding sequence showed an open reading frame encoding 395 amino acids. The deduced amino acid sequence contained several features common to all calreticulins: (1) 2 CRT family sequences located in conserved regions of the N-domain on residues 97–113 (KhEQnidCGGGYVKLL) and 130–138 (IMFGPDICG); (2) an hydrophobic signal peptide that targets CRT to the ER (Nielsen et al., 1997); (3) 2 sets of 3 repeats (A: PxxLxDPDaxKPEDWDE; B: Gx-WxPPxIxNPxYx), characteristic of the P-domain in all CRT; (4) an acidic C-domain containing the KDEL tetrapeptide corresponding to the ER retention signal; and (5) 3 conserved cysteine residues present in the N-domain of all calreticulins, as well as 3 histidine residues at conserved positions that are involved in the interaction of human CRT with Zn^{++} (Michalak et al., 1999). The presence of these features indicates that the isolated cDNA fragment encodes a *T. solium* calreticulin. Furthermore, amino acid sequence alignment (Thompson et al., 1994) of TsCRT with other calreticulins showed 47–50% identity with *N. americanus* (AJ006790), *S. mansoni* (Q06814), and human (P27797) calreticulins (Fig. 1). Nucleotide and amino acid sequences reported in this article have been deposited in the GenBank database under accession number AF340232.

For bacterial recombinant expression, 2 oligonucleotide primers containing restriction sites for Eco RI were designed to polymerase chain reaction (PCR) amplify the coding region of the mature protein, without the signal peptide, using the full-length clone (SKCRT3-2) as template. Primers were: forward 5'ATATGAATTGAAAGTTTACTTCGAG-GAC3' and reverse 5'ATATGAATTCCTACAATTCATCCTTCGAG3'. Cycling conditions were 2 min at 95 C, followed by 25 cycles of 1 min at 95 C, 1 min at 56 C, 1 min at 72 C, and a final extension period at 72 C for 10 min. The PCR product was digested overnight at 37 C with Eco RI (Gibco BRL, Rockville, Maryland). The coding region of the mature TsCRT was subcloned into the expression vector pET23-a (Novagen, Madison, Wisconsin) according to recommendations from the manufacturer. The insert included a stop codon for TsCRT to avoid fusion of the hexahistidine tag of the vector. The correct orientation of the insert as well as the completeness of the coding sequence and reading frame within the recombinant expression plasmid (pET23a-CRT) was checked by DNA sequencing. After transformation and induction of BL21 cells, a single new band of about 50 kDa, representing ap-

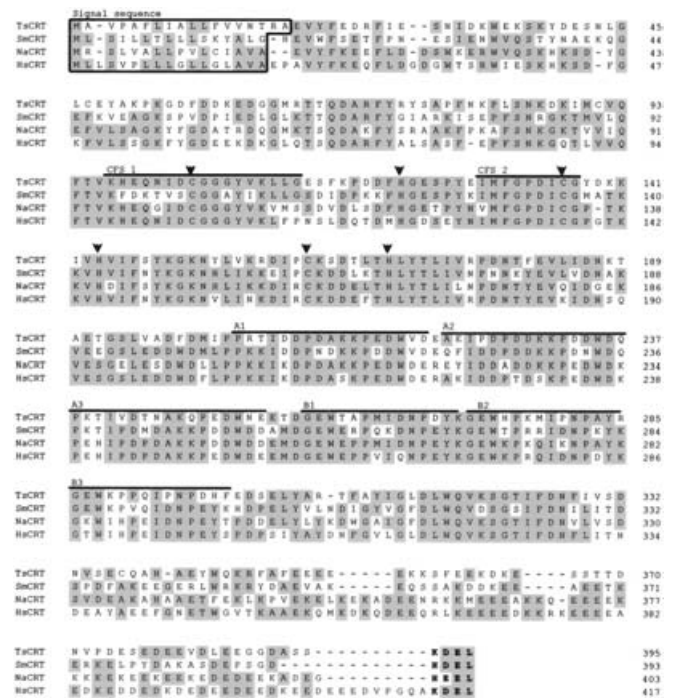


FIGURE 1. Sequence alignment of *Taenia solium* CRT with other members of the calreticulin family. Sequences were aligned using the ClustalW alignment program version 1.74. Overlining indicates the calreticulin family sequences (CFS) 1 and 2 and the 2 sets of 3 repeats A1, A2, A3 and B1, B2, B3. The putative signal peptides are indicated in the box and the ER retention signals are highlighted. Arrowheads indicate the position of the conserved cysteine and histidine residues. Positions of identity in at least 2 of the sequences are shown in gray shading. Genbank accession numbers: *T. solium* CRT (TsCRT, AF340232), *Schistosoma mansoni* CRT (SmCRT, Q06814), *Necator americanus* CRT (NaCRT, AJ006790), and human CRT (HsCRT, P27797).

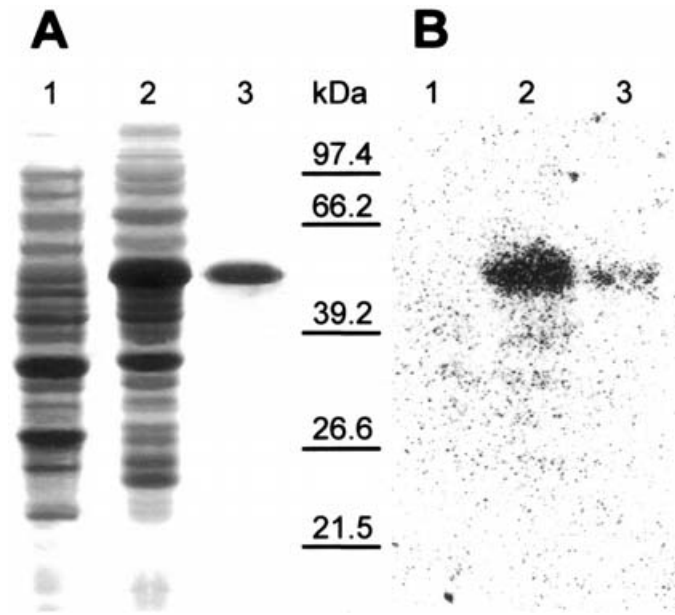


FIGURE 2. Purity and calcium binding of rTsCRT in 12% polyacrylamide gel stained with Coomassie Blue (panel A) and nitrocellulose membranes incubated with 1 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ of $^{45}\text{CaCl}_2$ (panel B). Nontransformed bacteria used as a negative control (lanes 1), transformed and induced bacteria (lanes 2) and, 5 μg of partially purified rTsCRT (lanes 3). Molecular weight markers are shown for both panels.

proximately 30% of the total bacterial proteins, as estimated by densitometry of stained gels, was seen. The predicted molecular mass for the recombinant product was 45.3 kDa, which is similar to other calreticulins (McCauliffe et al., 1990; Huggins et al., 1995), calnexin, an ER transmembrane homologue of CRT (Rajagopalan et al., 1994), and calmeglin, a calcium-binding protein expressed during embryogenesis (Watanabe et al., 1994). This anomalous migration has been explained by their high content of acidic amino acid residues that interferes with SDS-binding (Baksh and Michalak, 1991; Krause et al., 1990; Milner et al., 1991) and not by posttranslational modification, i.e., glycosylation in the bacterial cells, although TsCRT shows 2 potential glycosylation sites (Fig. 1).

After purification by isoelectric precipitation at pH 4.39 (pI of the predicted mature protein) in the presence of 0.6 M NaCl for 1 hr at 4 C, the precipitated protein was collected by centrifugation at 16,000 g for 30 min and the pellet resuspended in phosphate-buffered saline pH 7.4. Nontransformed bacteria, transformed and induced bacteria, and partially purified recombinant TsCRT (rTsCRT) were subjected to 12% polyacrylamide gel electrophoresis and stained with Coomassie blue. The purity of the recombinant product was estimated at 80% (Fig. 2A). A similar gel was used to determine if the TsCRT is expressed as a functional calcium-binding protein. Therefore, proteins were electrotransferred onto nitrocellulose membranes, incubated for 10 min in a buffer containing 10 mM imidazol, pH 6.8, 60 mM KCl₂, 5 mM MgCl₂, and 1 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ $^{45}\text{CaCl}_2$, washed with double-distilled H₂O for 5 min, and dried on filter paper as described by Maruyama et al. (1984). Bound $^{45}\text{Ca}^{++}$ was observed using an intensifying screen (Amersham, Piscataway, New Jersey) and a "Molecular Imager Fx" (BioRad, Hercules, California). Results show that radioactivity was associated mainly with the induced 50-kDa band (Fig. 2B). Kasper et al. (2001) found that recombinant CRT from the nematode *N. americanus*, that was cloned and expressed in a bacterial system with the polyhistidine tag, did not show ability to bind Ca⁺⁺, suggesting that the presence of this tag might interfere with functional expression of the protein.

The isolation of cDNA clones containing the coding sequence for TsCRT, through the use of pooled immune rabbit sera raised against 2 immunogenic glycoproteins (Plancarte et al., 1999), was an unexpected result. These glycoproteins (GP24 and GP42) are used commonly for immunodiagnosis of neurocysticercosis and were purified from a crude

extract of *T. solium* cysticerci by lentil-lectin affinity chromatography (Tsang et al., 1989). To determine why calreticulin was isolated from the *T. solium* cDNA expression library, rTsCRT was reacted by Western blot with each immune rabbit sera (anti-GP24 and anti-GP42) used in the pooled sera. The anti-GP42 sera bound to rTsCRT, suggesting that small amounts of calreticulin were present in the glycoprotein fraction used to immunize the rabbits. One possible explanation for this is that calreticulins are lectinlike proteins that recognize *N*-glycosylated proteins (Michalak et al., 1999) and that binding might have occurred.

When 2 pools of 10 human serum samples and sera from 2 pigs with confirmed cysticercosis were assayed against purified rTsCRT in Western blots, a faint band of 50 kDa was recognized (data not shown). However, a pool of sera from 10 healthy humans, and sera from 1 uninfected pig, also recognized the same band. The nonspecific binding of antibodies to rTsCRT in Western blots discourages its further evaluation as a diagnostic antigen for cysticercosis. The immunogenicity of the purified rTsCRT was confirmed because sera from mice immunized with rTsCRT recognized the 50-kDa band (data not shown).

The high degree of conservation and multifunctional character of CRT suggests that it is a fundamental protein in cellular physiology. The study of TsCRT, including its further characterization and localization within the different stages of the parasite, could provide insight into its role in *T. solium* physiology as well as in the host-parasite relationship.

This work was partially supported by research grants from CONACYT Mexico (28094B to A.F.; 41693-M to J.P.L.) and DGAPA-UNAM (IN225798 to J.P.L.; IN215702-3 to P.O.S.). The authors thank M. Lightowler for kindly providing the adult *T. solium* cDNA expression library and C. Kyngdon for reviewing the manuscript (University of Melbourne, Australia).

LITERATURE CITED

- BAKSH, S., AND M. MICHALAK. 1991. Expression of calreticulin in *Escherichia coli* and identification of its Ca⁺ binding domains. *Journal of Biological Chemistry* **266**: 21458–21465.
- FLISSER, A. 2002. Epidemiological studies of taeniosis and cysticercosis in Latin America. *In* Cestode zoonoses: Echinococcosis and cysticercosis. An emergent and global problem, P. Craig and Z. Pawlowski (eds.). IOS Press, Amsterdam, Netherlands, p. 3–11.
- GARCÍA-DOMÍNGUEZ, C. 1993. Isolation and characterization of recombinant antigens from *Taenia solium*. Ph.D. Thesis. University of Liverpool, Liverpool, U.K., p. 36–44.
- HUGGINS, M. C., J. GIBBS, AND N. A. MOLONEY. 1995. Cloning of a *Schistosoma japonicum* gene encoding an antigen with homology to calreticulin. *Molecular and Biochemical Parasitology* **71**: 81–87.
- JOSHI, M., G. P. POGUE, R. C. DUNCAN, N. S. LEE, N. K. SINGH, CH. D. ATREYA, D. M. DWYER, AND H. L. NAKHASI. 1996. Isolation and characterization of *Leishmania donnovani* calreticulin gene and its conservation of the RNA binding activity. *Molecular and Biochemical Parasitology* **81**: 53–64.
- KASPER, G., A. BROWN, M. EBERL, V. LAURENT, N. KIEFFER, C. BERRY, K. GIRDWOOD, P. EGGLETON, R. QUINELL, AND D. I. PRITCHARD. 2001. A calreticulin-like molecule from the human hookworm *Necator americanus* interacts with C1q and the cytoplasmic signaling domains of some integrins. *Parasite Immunology* **23**: 141–152.
- KHALIFE, J., R. PIERCE, E. POCHE, C. GODIN, AND A. CAPRON. 1993. Cloning and sequencing of the gene encoding *Schistosoma mansoni* calreticulin. *Molecular and Biochemical Parasitology* **62**: 313–316.
- KOVACS, H., I. D. CAMPBELL, P. STRONG, S. JOHNSON, F. J. WARD, K. B. REID, AND P. EGGLETON. 1998. Evidence that C1q binds specifically to CH2-like immunoglobulin gamma motifs present in the auto-antigen calreticulin and interferes with complement activation. *Biochemistry* **37**: 17865–17874.
- KRAUSE, K. H., H. K. B. SIMMERMAN, L. R. JONES, AND K. CAMPBELL. 1990. Sequence similarity of calreticulin with a Ca²⁺-binding protein that co-purifies with an Ins(1,4,5)P₃-sensitive Ca²⁺ store in HL-60 cells. *Biochemical Journal* **270**: 545–548.
- LABRIOLA, C., J. J. CAZZULO, AND A. J. PARODI. 1999. *Trypanosoma cruzi* calreticulin is a lectin that binds monoglycosylated oligosaccharides but not protein moieties of glycoproteins. *Molecular Biology of the Cell* **10**: 1381–1394.
- MARCELAIN, K., A. COLOMBO, M. C. MOLINA, L. FERREIRA, M. LORCA,

- J. C. AGUILLON, AND A. FERREIRA. 2000. Development of an immunoenzymatic assay for the detection of human antibodies against *Trypanosoma cruzi* calreticulin, an immunodominant antigen. *Acta Tropica* **75**: 291–300.
- MARUYAMA, K., T. MIKAWA, AND S. EBASHI. 1984. Detection of Ca⁺⁺ binding proteins by ⁴⁵Ca⁺⁺ autoradiography on nitrocellulose membranes after SDS gel electrophoresis. *Journal of Biochemistry* **95**: 511–519.
- MCCAULIFFE, D. P., F. A. LUX, T. S. LIEU, I. SANZ, J. HANKE, M. M. NEWKIRK, L. L. BACHINSKI, Y. ITOH, M. J. SICILIANO, M. REICHLIN, R. D. SONTHEIMER, AND J. D. CAPRA. 1990. Molecular cloning, expression, and chromosome 19 localization of a human Ro/SS-A autoantigen. *Journal of Clinical Investigation* **85**: 1379–1391.
- MICHALAK, M., E. F. CORBETT, N. MESAELI, K. NAKAMURA, AND M. OPAS. 1999. Calreticulin: One protein, one gene, many functions. *Biochemical Journal* **344**: 281–292.
- MILNER, R. E., S. BAKSH, C. SHEMANKO, M. R. CARPENTER, L. SMILLIE, J. E. VANCE, M. OPAS, AND M. MICHALAK. 1991. Calreticulin, and not calsequestrin, is the major calcium binding protein of smooth muscle sarcoplasmic reticulum and liver endoplasmic reticulum. *Journal of Biological Chemistry* **266**: 7155–7165.
- NIELSEN, H., J. ENGELBRECHT, S. BRUNAK, AND G. VON HEIJNE. 1997. Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Engineering* **10**: 1–6.
- PLANCARTE, A., C. HIROTA, G. MARTINEZ-OCANA, G. MENDOZA-HERNANDEZ, E. ZENTENO, AND A. FLISSER. 1999. Characterization of Gp39-42 and GP24 antigens from *Taenia solium* cysticerci and of their antigenic GP10 subunit. *Parasitology Research* **85**: 680–684.
- RAJAGOPALAN, S., Y. XU, M. B. BRENNER. 1994. Retention of unassembled components of integral membrane proteins by calnexin. *Science* **263**: 387–390.
- ROKEACH, L. A., P. A. ZIMMERMAN, AND T. R. UNNASCH. 1994. Epitopes of the *Onchocerca volvulus* RAL1 antigen, a member of the calreticulin family of proteins, recognized by sera from patients with onchocerciasis. *Infection and Immunity* **62**: 3696–3704.
- SAMBROOK, J., E. F. FRITSCH, AND T. MANIATIS. 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor, New York, New York.
- THOMPSON, J. D., D. G. HIGGINS, AND T. J. GIBSON. 1994. CLUSTALW: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence weighting, position-specific gap penalties, and weight matrix choice. *Nucleic Acid Research* **22**: 4673–4680.
- TSANG, V. C. W., J. A. BRAND, AND A. E. BOYER. 1989. An enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay and glycoprotein antigens for diagnosing human cysticercosis (*Taenia solium*). *Journal of Infectious Diseases* **159**: 50–59.
- WATANABE, D., K. YAMADA, Y. NISHINA, Y. TAJIMA, U. KOSHIMIZU, A. NAGATA, AND Y. NISHIMUNE. 1994. Molecular cloning of a novel Ca⁺⁺-binding protein (calmegin) specifically expressed during male meiotic germ cell development. *Journal of Biological Chemistry* **269**: 7744–7749.

J. Parasitol., 90(4), 2004, pp. 893–895
© American Society of Parasitologists 2004

Microarray Data Demonstrate That *Trypanosoma cruzi* Downregulates the Expression of Apoptotic Genes in BALB/c Fibroblasts

Deborah Moore-Lai and Ed Rowland, Ohio University, Department of Biomedical Sciences, 342 Irvine Hall, Athens, Ohio 45701. *e-mail*: deborahmoorelai@yahoo.com

ABSTRACT: Parasites have been shown to up- and downregulate host apoptosis, most likely facilitating their ability to successfully establish an infection in the host. It has been demonstrated that pathogens modulate well-established pathways, leading to cell death, including induction of the Fas–FasL system to promote apoptosis. In contrast, it has also been shown that in other instances a decrease in host cell apoptosis results after the upregulation of genes in the Bcl-2 family. The present study examined the ability of *Trypanosoma cruzi* to modulate expression of host cell genes of the TNFR1 apoptotic pathway. Using microarray technology, gene expression was compared between uninfected BALB/c fibroblasts and *T. cruzi*-infected BALB/c fibroblasts. After comparing expression patterns between uninfected and *T. cruzi*-infected BALB/c fibroblasts, it was concluded that genetic expression of genes in the TNFR1 apoptotic pathway is downregulated in *T. cruzi*-infected cells, indicating that in BALB/c fibroblasts the parasite decreases the expression of genes, leading to host cell apoptosis.

Trypanosoma cruzi is the etiologic agent of Chagas disease, or American trypanosomiasis. The disease is endemic in Central and South America and currently affects about 20 million people (World Health Organization, 1993). Chagas disease progresses through an acute phase and into the indeterminate phase. During the acute phase the parasitemia is quite high; however, after induction of the immune response the parasitemia is decreased significantly, and the host typically enters the indeterminate phase, remaining there for the rest of its life.

Intracellular pathogens are known to modulate their host's response to infection to facilitate their own survival. For example, during the acute phase, *T. cruzi* escapes the parasitophorous vacuole before lysosomal fusion (with the vacuole) occurs and replicates freely in the cytoplasm of host macrophages. After activation of the acquired immune response, however, the parasitophorous vacuole fuses with lysosomes

before parasite escape, and the parasite is killed after deposition of the lysosomal constituents into the vacuole.

Trypanosoma cruzi has also been shown to modulate induction of apoptotic pathways. Clark and Kuhn (1999) attempted to determine whether *T. cruzi* infection of murine fibroblasts induced apoptosis. After 5 days there was no indication of the induction of apoptotic pathways. Nakajima-Shimada et al. (2000) demonstrated that the risk of Fas-mediated cell death was decreased after infection in nonlymphocytic cells. Their work showed a decrease in apoptosis at the level of DNA fragmentation, changes in the host cell membrane, and activation of caspases 3 and 8. *Trypanosoma cruzi* has also been shown to promote lymphocyte apoptosis, potentially restricting the immune response during infection (Lopes, 1995; Luder et al., 2001). *Trans*-sialidase, a unique enzyme produced by *T. cruzi*, is known to induce apoptosis in immune cells found within the thymus, spleen, and lymph nodes (Leguizamon, 1999), enhancing the ability of the parasite to evade the immune response. In contrast, *trans*-sialidase has been shown to prevent apoptosis in neuronal cells (Chuenkova and Pereira, 2000; Luder et al., 2001), promoting their survival despite the ongoing infection.

Other pathogens have also been shown to modulate the apoptotic response. Hepatocytes infected with *Plasmodium* spp. do not undergo stress-mediated apoptosis (Heussler et al., 2001). *Theileria parva*, the agent responsible for East Coast fever in cattle from East and Central Africa, inhibits apoptotic pathways (Heussler, 1999; Luder et al., 2001) in T lymphocytes through the upregulation of Bcl-2 genes. Finally, *Toxoplasma gondii* has been shown to both induce and inhibit apoptotic pathways (Luder et al., 2001).

Microarray technology facilitates the molecular analysis of host and pathogen interactions and provides information regarding the host's genetic response to infection. DNA expression arrays have been used to examine the host response to various pathogens, including *Salmonella* spp., *Bordetella pertussis*, *Helicobacter pylori*, *Campylobacter jejuni*,

TABLE I. Microarray data. Values are from the original microarray. Comparison between uninfected (UNF) and infected (INF) cells included 1,176 total genes: 273 were downregulated, 68 were upregulated, and 835 genes were unchanged as a result of infection. The fold decrease or increase value is the fold difference in gene expression between the 2 conditions. For example, TNFR is downregulated 2.4; this indicates that it is downregulated in the infected cDNA population. A “?” indicates a weak signal from the original microarray data.

Accession number	Clontech gene ID	Fold decrease, UNF vs. INF	Fold increase, UNF vs. INF
X57796	TNFR1	2.4	
U25995	RIP	Down	
AJ224740	FADD	?	
U97076	Casper	?	

Vibrio cholerae, *Mycobacterium tuberculosis*, and *Escherichia coli* (Cummings and Relman, 2000). The technology allows the user to identify the up or downregulation of genes after infection and may provide insight into the genetic response to infection with a pathogen.

Using microarray technology we attempted to identify those genes involved in the tumor necrosis factor receptor (TNFR) apoptotic pathway whose levels may be manipulated after infection with *T. cruzi*. Because the work of Nakajima-Shimada et al. (2000) demonstrated a reduction in Fas-mediated apoptosis, and because Fas is a member of the TNFR family, we selected the pathway beginning with ligand binding to the TNFR1 for examination. Genes in the TNFR1 pathway include TNFR1, RIP, FADD, and Casper.

The TNFR1 apoptotic cascade is initiated after binding of TNF to TNFR1. The receptor recruits FADD, an adaptor molecule containing a death domain (Boldin et al., 1996). FADD then interacts with RIP during the intracellular cascade of events. Next, either FADD or RIP interacts with caspase 8 and initiates the proteolytic cascade of events that ultimately results in host cell apoptosis. The microarray used was prepared previously; we were unable to determine the messenger RNA (mRNA) level of caspase 8 because the gene was not contained in the library on the microarray. Therefore, Casper was chosen in lieu of caspase 8. Casper has been shown to interact with FADD in a similar manner as caspase 8. After its interaction with FADD, Casper interacts with caspase 8 (Shu et al., 1997) to continue the cascade of intracellular apoptotic signaling.

After completion of the microarray analysis genetic expression of the genes of interest was confirmed using real-time polymerase chain reaction (PCR). It is generally necessary to confirm the data obtained from microarray analysis using either Northern blotting or real-time PCR. Both these techniques are dependent on the starting concentration of RNA, the molecule on which the microarray analysis is based. To complete the real-time PCR analysis, uninfected and *T. cruzi*-infected murine BALB/c fibroblasts were cultured in vitro, and their mRNA was harvested. This mRNA was used in the real-time PCR analysis to confirm differences in gene expression patterns between the 2 samples. Finally, these results were compared with those obtained from the microarray analysis.

BALB/c fibroblasts were cultured in vitro and infected with *T. cruzi* at a concentration of 1.0×10^4 parasites/ml. These cells were cultured for 5 days, after which time whole-cell samples, including uninfected and *T. cruzi*-infected BALB/c fibroblasts, were sent to Clontech (Palo Alto, California) for completion of a Custom Atlas hybridization and analysis experiment using the 1.2 nylon mouse array. The array contained 1,176 PCR-generated complementary DNA (cDNA) fragments spotted in duplicate.

To confirm the results obtained from the microarray, the Quantitect SYBR Green one-step reverse transcriptase-PCR kit (Qiagen, Valencia, California) was used to prepare RNA samples for analysis with an i-Cycler IQ real-time PCR detection system (Bio-Rad, Hercules, California). Samples were prepared according to the manufacturer's instructions.

To calculate the fold differences listed in Table II among the samples for the genes of interest, the following formula was used:

TABLE II. Real-time PCR confirmation values. For example, the level of expression of TNFR1 was downregulated 1.41 in the infected host cells from the level of expression in the uninfected cell population.

Accession number	Clontech gene ID	Expression decrease, UNF vs. INF	Expression increase, UNF vs. INF
X57996	TNFR1	1.41	
U25995	RIP	1.96	
U97076	Casper		1.96

$$(\text{GOI } C_T) - (\text{HKG } C_T) = \Delta C_T$$

$$\Delta C_T \text{ U} - \Delta C_T \text{ I} = \text{difference between control and sample}$$

$$\text{relative_expression} = 2^{-(\text{difference between control and sample})}$$

$$1/\text{relative_expression} = \text{fold difference between the 2 samples,}$$

where GOI is the gene of interest, HKG is the housekeeping gene, and ΔC_T represents the change in threshold crossing of the sample.

A comparison of the results obtained from both the microarray and the real-time PCR analyses is presented in Tables I, II. Note that in general, the pattern of gene expression is similar between the 2 techniques; in other words, the downregulation of certain genes found on the microarray was supported by the real-time PCR confirmations. We were unable to successfully amplify FADD using real-time PCR analysis.

Table III lists the threshold crossings during the real-time PCR analysis of the genes found in Table II. These values were used in the calculations described above to obtain the fold differences in gene expression found in Table II. FADD was not included in Table III because of the inability to amplify it using real-time PCR.

It has been suggested that apoptosis may serve as a defense mechanism against viruses and other infectious agents, such as intracellular bacteria and parasites (Vaux et al., 1994). In the host, pathogens often find themselves under attack and must somehow survive the assault (Moss et al., 1999) to establish an infection. Parasitic pathogens have evolved diverse strategies to induce or inhibit host cell apoptosis to aid in their dissemination within the host or facilitate their own intracellular survival (Luder et al., 2001).

The present study was performed on uninfected or *T. cruzi*-infected BALB/c murine fibroblasts cultured in vitro. Whole cells from both populations were shipped to Clontech, where the microarray analysis was performed. After examination of the data from the microarray, an apoptotic pathway was chosen for analysis, based on evidence in the literature demonstrating lack of induction of apoptotic pathways after infection with *T. cruzi*.

TABLE III. Threshold crossings. The threshold crossing is the point at which the PCR product crosses the threshold line during the real-time PCR amplification process. This line is drawn horizontally by the user after completion of the real time PCR process. It is drawn so that it intersects during the exponential amplification phase of the PCR products. Once the amount of PCR product crosses the threshold line, that number becomes the product's threshold crossing value. This crossing allows for the comparison of the amount of cDNA originally present in the starting sample, i.e., lower amounts of starting cDNA will have higher threshold values. Samples that begin with higher amounts of cDNA will cross the threshold line earlier during the amplification process. The values for the threshold crossings are used in the calculation described in the Materials and Methods.

Gene	Uninfected cDNA	Infected cDNA
TNFR1	23	26
RIP	27	29
Casper	25	26

Trypanosoma cruzi has been shown to inhibit Fas-mediated apoptosis (Nakajima-Shimada et al., 2000) in HeLa cells through inhibition of the activation of caspase 8. The Fas molecule, a member of the TNFR1 family, is expressed on most cell types (Nagata, 1995), and its stimulation by Fas ligand initiates a cascade of cytoplasmic events progressing through FADD, RIP, and caspase 8 (Boldin et al., 1996). This cascade results in the formation of the Fas-associated death-inducing signaling complex, yielding the proteolytic activation of a series of other caspases, the cleavage of death substrates, and finally apoptotic cell death (Cohen, 1997). Barcinski et al. (1999) have demonstrated that *T. cruzi* does not induce apoptosis in murine fibroblasts; however, whether the parasite can inhibit apoptosis has not been shown.

Because *T. cruzi* has demonstrated the ability to modulate Fas expression on infected host cells (Nakajima-Shimada et al., 2000) and because Fas belongs to the TNF receptor superfamily, which includes 2 TNFRs (TNFR1 and TNFR2), an apoptotic pathway beginning with ligand binding to TNFR1 was chosen as the pathway to examine using the microarray data. Activation of apoptosis is initiated in this pathway after binding of members of the structurally related ligands belonging to the TNF ligand family (Strasser et al., 2000). After ligand binding, the TNFR1 receptor recruits FADD, a death domain-containing adaptor molecule (Boldin et al., 1996), which can interact with RIP, a protein that also contains a death domain. Finally, caspase 8 is recruited through the interaction of TNFR1 with FADD (Shu et al., 1997). This recruitment is the beginning of the initiation of the proteolytic cascade, which eventually results in cell death. Because caspase 8 was not found on microarray analysis, a similar molecule, Casper, was chosen for analysis. Casper has been shown to interact with FADD as well as downstream components of the pathway including caspase 8 (Shu et al., 1997).

The results of the microarray presented in Table I demonstrate the downregulation of the expression of TNFR1. The remaining genes were either downregulated without a value or produced too weak a signal to be analyzed. Confirmation of gene expression using real-time PCR, as presented in Table II, indicated that both TNFR1 and RIP were downregulated after infection with *T. cruzi*. The threshold crossings, values that indicate the relative amount of starting mRNA, support the data in Tables I, II; higher threshold values indicate the lower starting concentration of mRNA, which demonstrates the downregulation of those particular genes.

In conclusion, microarray analysis is useful to obtain rapid global transcription patterns after infection with a pathogen. Although the values of gene downregulation were not the same between the microarray and the real-time PCR analyses in the present study, the trend, namely downregulation, was the same for the 2 procedures. In the future, we would expect more dramatic changes in the level of gene expression if these experiments were completed in vivo, which would allow us to obtain more of the initial starting mRNA populations, because of higher numbers of infected host cells. The in vitro model of infection produces a prevalence of about 30% for the total cells in the culture flask, a level that may not allow the determination of larger, more striking differences in the extent of genetic expression in the 2 cell populations. However, we believe that microarray technology is useful to identify unique genes whose expression is modulated after infection with *T. cruzi* as well as other intracellular pathogens.

LITERATURE CITED

- BARCINSKI, M. A., AND G. A. DOSREIS. 1999. Apoptosis in parasites and parasite-induced apoptosis in the host immune system: A new approach to parasitic diseases. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **32**: 395–401.
- BOLDIN, M. P., T. M. GONCHAROV, Y. V. GOLTSEV, AND D. WALLACH. 1996. Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/Apo-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell* **85**: 803–815.
- CHUENKOVA, M. V., AND M. A. PEREIRA. 2000. A trypanosome protein synergizes with cytokines ciliary neurotrophic factor and leukemia inhibitory factor to prevent apoptosis in neuronal cells. *Molecular Biology of the Cell* **11**: 1487–1498.
- CLARK, R. K., AND R. E. KUHN. 1999. *Trypanosoma cruzi* does not induce apoptosis in murine fibroblasts. *Parasitology* **118**: 167–175.
- COHEN, G. M. 1997. Caspases: The executioners of apoptosis. *Journal of Biochemistry* **326**: 1–16.
- CUMMINGS, C. A., AND D. A. RELMAN. 2000. Using DNA microarrays to study host-microbe interactions. *Emerging Infectious Diseases* **6**: 513–525.
- HEUSSLER, V. T. 1999. The intracellular parasite *Theileria parva* protects infected T cells from apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* **96**: 7312–7317.
- , P. KUENZLI, AND S. ROTTENBERG. 2001. Inhibition of apoptosis by intracellular protozoan parasites. *International Journal for Parasitology* **31**: 1166–1176.
- LEGUIZAMON, M. S. 1999. Trans-sialidase from *Trypanosoma cruzi* induces apoptosis in cells from the immune system in vivo. *Journal of Infectious Diseases* **180**: 1398–1402.
- LOPES, M. F. 1995. Activation-induced CD4+ T cell death by apoptosis in experimental Chagas' disease. *Journal of Immunology* **154**: 744–752.
- LUDER, C. G. K., U. GROSS, AND M. F. LOPES. 2001. Intracellular protozoan parasites and apoptosis: Diverse strategies to modulate parasite-host interactions. *Trends in Parasitology* **17**: 480–486.
- MOSS, J. E., A. O. ALIPRANTIS, AND A. ZYCHLINSKY. 1999. The regulation of apoptosis by microbial pathogens. *International Review of Cytology* **187**: 203–259.
- NAGATA, S., AND P. GOLSTEIN. 1995. The Fas death factor. *Science* **267**: 1449–1456.
- NAKAJIMA-SHIMADA, J., C. ZOU, M. TAKAGI, M. UMEDA, T. NARA, AND T. AOKI. 2000. Inhibition of Fas-mediated apoptosis by *Trypanosoma cruzi* infection. *Biochemica et Biophysica Acta-General Subjects* **1475**: 175–183.
- SHU, H., D. HALPIN, AND D. GOEDDEL. 1997. Casper is a FADD- and caspase-related inducer of apoptosis. *Immunity* **6**: 751–763.
- STRASSER, A., L. O'CONNOR, AND V. M. DIXIT. 2000. Apoptosis signaling. *Annual Review of Biochemistry* **69**: 217–245.
- VAUX, D. L., G. HAECKER, AND A. STRASSER. 1994. An evolutionary perspective on apoptosis. *Cell* **76**: 777–779.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. 1993. Chagas' disease. *In Tropical diseases. Tropical disease research. Progress 1991–1992. Eleventh programme report of the UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases*, Geneva. World Health Organization, Geneva, Switzerland, p. 67–75.

ANEXO 4

Hacia el desarrollo de una vacuna en contra de la cisticercosis porcina basada en la paramiosina de *Taenia solium*

Carlos F. Solís,* José Vázquez-Talavera,* Juan Pedro Lacleste*

Recepción versión modificada: 6 de mayo de 2003 aceptación: 11 de noviembre de 2003

Resumen

La paramiosina de *Taenia solium* (TPmy) es un antígeno inmunodominante de la cisticercosis humana y porcina. Se trata de una proteína de 100 kDa con una estructura alfa-hélice superenrollada asociada al músculo y a estructuras tegumentarias del cisticerco. La TPmy tiene la propiedad de unirse al C1q e inhibir la cascada del complemento. La TPmy probablemente se une al C1q a través sus dominios tipo colágena y podría estar relacionada con una estrategia parasitaria para modular la respuesta inmune del huésped. En el hombre y en el ratón, la respuesta inmune humoral en contra de la TPmy está preferentemente dirigida hacia el extremo carboxilo terminal mientras que el extremo amino terminal de la TPmy induce una respuesta protectora celular de tipo Th1. Ensayos de protección en el modelo murino de cisticercosis en ratones inmunizados con fragmentos recombinantes de TPmy revelaron que el extremo amino terminal induce alrededor de 60% de protección en contra de un reto intraperitoneal con cisticercos de *Taenia crassiceps*. Ensayos preliminares de protección por inmunización génica revelaron que el extremo amino terminal de la TPmy clonado en un vector plasmídico con un promotor de citomegalovirus induce alrededor de 79% de protección, junto con plásmidos para la expresión de IL-12, sugiriendo que este tipo de inmunización con TPmy puede resultar en el desarrollo de una vacuna eficaz y económica en contra de la cisticercosis.

Palabras clave: Paramiosina, *Taenia solium*, *Taenia crassiceps*, complemento, protección, inmunización génica

Summary

Taenia solium paramyosin (TPmy) is a prominent 100 kDa antigen in human and porcine cysticercosis. TPmy is an α -helical coiled coil protein present in muscle and tegumentary structures of *T. solium* cysticerci. TPmy has the property of binding C1q resulting in inhibition of the complement cascade. TPmy probably binds C1q through its collagen-like domains and could be involved in a parasite strategy to modulate host immune response. Humoral immune response against TPmy is preferentially directed against carboxyl terminal end in humans and mice, whereas amino terminal end of TPmy preferentially induces a Th1-related cellular immune response. Protection studies in murine model of cysticercosis showed that the amino terminal end fragment of TPmy induces approximately 60% protection against an i.p. challenge with *Taenia crassiceps* cysts when mice are immunized with recombinant fragments of TPmy. Initial protection studies using genetic immunization showed that amino terminal end fragment of TPmy cloned into a plasmid expression vector with a cytomegalovirus promoter, together with IL-12-expressing plasmids induced 79% protection, suggesting that this kind of TPmy-immunization might result in development of a cost-effective vaccine against cysticercosis.

Key words: Paramyosin, *Taenia solium*, *Taenia crassiceps*, complement, protection, genetic immunization

* Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F. Correspondencia y solicitud de sobretiros: Dr. Juan Pedro Lacleste, Dirección, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, A.P. 70228, Ciudad Universitaria, C.P. 04510, México D.F., México. Teléfono: (5255) 5622-3862. Fax: (5255) 5550-6447. E-mail: lacleste@servidor.unam.mx

Introducción

La proteína mejor caracterizada del cisticerco de la *T. solium* es sin duda el antígeno B (AgB) que fue posteriormente identificado molecularmente como una paramiosina. A continuación se resume la información al respecto de su reconocimiento por el sistema inmune del huésped cisticercoso, humano, porcino y murino; de su localización en los tejidos del cisticerco; de su caracterización bioquímica y genética; y de su papel en la relación huésped-cisticerco. Cabe advertir que se trata de una proteína con la propiedad de unirse al C1q, lo que resulta en una inhibición de la cascada del complemento. Puesto que el complemento juega un papel modulador de la respuesta inflamatoria, hemos propuesto que el AgB o paramiosina es responsable del reducido infiltrado inflamatorio que se observa alrededor de los cisticercos que mantienen una relación en equilibrio con su huésped. Además, este hallazgo lo convirtió en un antígeno candidato para desarrollar una vacuna en contra de la cisticercosis. Actualmente se prueba su potencial protector en el modelo de cisticercosis murina por ensayos de inmunización génica. En la sección final se describen los resultados originales más recientes de estos ensayos de protección.

La Paramiosina de la *Taenia solium*

Este antígeno fue inicialmente identificado como un arco de precipitación, al que se denominó *antígeno B*, sin carga neta aparente, caracterizado por inmunoelectroforesis al confrontar un extracto crudo de cisticercos contra sueros de pacientes con neurocisticercosis. En esta prueba, fue el antígeno reconocido con mayor frecuencia por anticuerpos en sueros de pacientes con neurocisticercosis, por lo que se definió como un antígeno inmunodominante.^{1,2}

En 1982, se publicó el primer método de purificación del AgB. Este método era un procedimiento bioquímico complejo y laborioso y permitía la purificación de pequeñas cantidades de proteína. El AgB purificado por el método original mostraba dos bandas de 85 y 95 kDa en SDS-PAGE.³ Accidentalmente, se encontró que el AgB se une a la colágena,⁴ lo que marcó la pauta para desarrollar un procedimiento de purificación por afinidad. El uso de este nuevo método de purificación permitió mostrar que el péptido de 85 kDa era en realidad un producto proteolítico del mayor.⁵

La localización del AgB en los tejidos del cisticerco se llevó a cabo por métodos de inmunofluorescencia e inmunoperoxidasa indirecta, así como por métodos de yodación radioactiva de la superficie. El antígeno se encontró ampliamente distribuido en el tejido del cisticerco, con una fluorescencia más intensa en los citones tegumentales.⁶ Dado que estas células participan activamente en la producción de proteínas y glicoproteínas que se envían al citoplasma

distal del cisticerco,^{7,8} se propuso que el AgB podría ser sintetizado en los citones tegumentales y enviado al tegumento para su liberación hacia los tejidos del huésped.^{6,9} Los resultados de experimentos con inmunoperoxidasa indirecta y yodación radioactiva de superficie, indicaron que el AgB no era una proteína de superficie por lo que se propuso que se trataba de un producto de excreción-secreción parasitario.⁹ Además, es posible colectar AgB en el sobrenadante de los cultivos in vitro de cisticercos⁹ y se puede detectar en el líquido céfalo-raquídeo de pacientes con neurocisticercosis.² La posibilidad de que se tratara de un producto de excreción-secreción parecía estar de acuerdo con su inmunodominancia y correlacionaba bien con la intensa producción de anticuerpos en las células plasmáticas que rodean al cisticerco en el músculo de cerdo. Cabe señalar que recientemente se ha cuestionado el significado de la localización del AgB en el tegumento de helmintos.¹⁰

La relación entre el AgB y la reacción inflamatoria surgió a partir de su propiedad de unión a colágena.⁵ Esto llevó a cuestionar si otras moléculas con estructura colagénica podrían unirse al AgB. Entre las proteínas con estructura colagénica cuya función se relaciona al sistema inmune, se encuentra el C1q. Esta proteína es un subcomponente del C1, el primer componente de la cascada del complemento. Ensayos iniciales indicaron que una preincubación de suero humano con AgB purificado, disminuye los niveles de complemento funcional en el suero.⁹

Una secuencia parcial del AgB mostró homología con la secuencia también parcial de la paramiosina de *Schistosoma mansoni*.¹¹ A partir de este hallazgo fue posible obtener clonas de cDNA que contienen la secuencia codificadora completa del AgB de *T. solium*.¹² La secuencia de aminoácidos deducida a partir de la secuencia nucleotídica codifica una proteína de 863 residuos de aminoácidos con un peso molecular de 98, 859. El análisis de la secuencia de aminoácidos mostró 72% de identidad con la del *S. mansoni* y alrededor de 34% con la paramiosina de *Caenorhabditis elegans* y *Dirophilaria immitis*.¹² También, se demostró similitud inmunológica de la proteína recombinante, expresada en *Escherichia coli*, con el antígeno B, además de similitud inmunológica entre la paramiosina de *S. mansoni* y el AgB.¹² Estos resultados demuestran que el AgB es la paramiosina de la *T. solium* (TPmy), por lo que a partir de aquí se utilizará exclusivamente este último término. Nuestro grupo también ha descrito la estructura del gen de la TPmy que incluye 13 intrones delimitados por sitios de splicing convencionales lo que elimina la posibilidad de que *T. solium* exprese mini-paramiosinas como es el caso de *Drosophila melanogaster*.¹³ Las paramiosinas son proteínas filamentosas presentes en el músculo de los invertebrados, con una estructura secundaria de α -hélice superenrollada que forma homodímeros.¹⁴

A partir de la clonación de la secuencia codificadora de la TPmy fue posible realizar experimentos utilizando la

proteína recombinante expresada en bacterias. Para llevar a cabo una purificación expedita, se le fusionó un segmento con secuencia de polihistidina que permite la purificación por afinidad a metales divalentes. Utilizando la proteína recombinante purificada prácticamente a homogeneidad, confirmamos que la inhibición de la cascada del complemento se debe a un bloqueo a nivel de C1. Además, experimentos de unión con C1q demuestran que la TPmy tiene una alta afinidad por este componente de la cascada del complemento. Por lo tanto, la inhibición del C1 es posiblemente debida a la unión de la TPmy con el C1q.¹⁵ Se ha informado de un receptor para Fc asociado a la superficie tegumental de la *T. crassiceps*, que muestra similitud de 87.5% con la TPmy.¹⁶ Este hallazgo que nuevamente apoya la extraña asociación de la TPmy con la superficie tegumental, puede ser explicado por la unión de la TPmy con el C1q. Es decir, que la función receptora de Fc podría estar mediada por un complejo TPmy-C1q.

Hemos propuesto que las paramiosinas inhiben la producción de mediadores complementarios de inflamación en la interfase huésped-cisticercos, es decir, que desempeñan un papel inmunomodulador de la respuesta del huésped.^{12,15} El cisticercos puede evitar el reclutamiento de células hacia la interfase para disminuir la confrontación con su huésped humano o porcino. Por lo anterior, la TPmy se ha convertido en un candidato para el desarrollo de una vacuna en contra de la cisticercosis. Cabe mencionar que la paramiosina es también candidato para el desarrollo de una vacuna en otras infecciones helmínticas tales como la esquistosomiasis^{17,22} y varias filariasis.^{23,24} Además, se puede inducir protección contra *Schistosoma japonicum* con un anticuerpo monoclonal IgE anti-paramiosina²⁵ y se ha sugerido que la respuesta inmune a la paramiosina se relaciona con la resistencia natural a la esquistosomiasis en humanos.²⁶ Incluso se ha logrado producir anticuerpos anti-paramiosina en ratones vacunados con vectores de expresión que contienen fragmentos de DNA que codifican la paramiosina de *Schistosoma japonicum*.²¹ Finalmente, se ha encontrado que un anticuerpo monoclonal dirigido contra un antígeno de superficie de 14 kDa de *Onchocerca microfilariae* reconoce una molécula que parece ser la paramiosina en un extracto de gusano adulto.²⁷ Resultados recientes de nuestro grupo muestran que la inmunización con TPmy recombinante induce protección en contra de la cisticercosis murina.²⁸

Materiales y métodos

Ratones: se utilizaron hembras de ratones BALB/c, susceptibles a la infección intraperitoneal por *Taenia crassiceps*,²⁹ mantenidos desde hace más de veinte generaciones en el Bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas.

Cisticercos: se usaron cisticercos de *Taenia crassiceps* de la cepa ORF conservados a través de pases sucesivos de ratón a ratón. Se extrajeron los cisticercos de la cavidad peritoneal de ratones con dos a cuatro meses de infección y se lavaron en solución salina amortiguadora de fosfatos, pH 7.2 (PBS).

Purificación de la TPmy: la paramiosina nativa se purificó a través de un método de afinidad por colágena como se describió anteriormente.⁵ En breve, se incubó un extracto crudo de cisticercos de *Taenia crassiceps* con una malla de colágena en una solución amortiguadora de fosfatos 15 mM, pH 7.2 (PBS) durante una hora; se lavó la colágena tres veces con el mismo amortiguador, y después se eluyó la TPmy unida a la colágena sumergiendo la malla en PBS más NaCl 0.65 M. La muestra obtenida se concentró por Amicon (Amicon Corp., Danvers MA), se dializó y se determinó la concentración de proteína por el método de Bradford.

Proteínas recombinantes: se diseñaron vectores de expresión plasmídicos a partir de la secuencia codificadora de la TPmy para expresar en cultivos bacterianos tanto la proteína completa como fragmentos que corresponden aproximadamente a tercios de la TPmy: la paramiosina completa (VW7-3) que es una proteína de 863 aminoácidos; el fragmento amino terminal que contiene los aminoácidos que van del 1 al 268 (VW2-1); el fragmento central, del 269 al 551 (VW3-3) y el fragmento carboxilo terminal del 552 al 863 (VW4-1). Todos las proteínas fueron expresadas recombinantemente y purificadas por cromatografía de afinidad tal y como se describió anteriormente.³⁰ Los productos recombinantes fueron dializados en contra de una solución amortiguadora de NaCl 0.5 M, pH 7.3 y se determinó la cantidad de proteína por el método de Bradford (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).

Electroforesis en gel: la electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) se realizó de acuerdo al método descrito por Laemmli.³¹

Preparación de antígenos: los fragmentos recombinantes (VW2-1, VW3-3 y VW4-1) o la paramiosina completa (VW7-3), fueron mezclados con alúmina al 1.6% ($Al_2(OH)_3$) en una proporción de 1:50 (w/w) e incubados a temperatura ambiente por 20 minutos. La alúmina se sedimentó por centrifugación a 8000 g/10 min y se resuspendió en una solución salina estéril. La cantidad de proteína unida a la alúmina fue determinada indirectamente por cuantificación de proteína en el sobrenadante después de centrifugar. En todos los ensayos, la unión de la proteína fue superior a 95%. Para las inmunizaciones con las proteínas recombinantes se utilizaron dosis de 20 µg adsorbida a 1 mg de alúmina.

Construcciones plasmídicas para inmunización génica: se utilizó el vector plasmídico de expresión eucariote pTC-Ova desarrollado y donado por S. Levy de la Universidad de Stanford. Este vector contiene un promotor

de citomegalovirus que induce la expresión del gen de la ovoalbúmina en marco de lectura con la secuencia líder κ de la inmunoglobulina humana que permite la secreción del producto traducido. A partir de la secuencia codificadora de la TPmy se diseñaron oligonucleótidos con los sitios de restricción adecuados para amplificar por técnicas de PCR las secuencias codificadoras de la paramiosina (VW7-3) así como del fragmento amino terminal (VW2-1), para clonarlos y reemplazarlos en lugar de la secuencia codificadora de la ovoalbúmina. Para inducir la expresión de interleucina (IL)-12 en el ratón se utilizaron los plásmidos pEDP35 y pEDP40 donados por S. Wolf de Genetics Institute, Cambridge, que expresan las subunidades P35 y P40 de la IL-12 respectivamente. Se transformaron bacterias *Escherichia coli* de la cepa XL1-blue con los plásmidos arriba descritos y se purificaron a gran escala por lisis alcalina utilizando un kit especial para la obtención de DNA plasmídico libre de endotoxinas (Qiagen).

Ensayos de protección: los ratones se inmunizaron dos veces por vía intraperitoneal a intervalos de una semana con cada uno de los productos recombinantes de paramiosina (VW2-1, VW3-3, VW4-1 o VW7-3), preparados como se describe arriba. Los ratones control fueron inyectados con 1 mg de alúmina en PBS, siguiendo el mismo procedimiento descrito para los antígenos. Una semana después de la última inmunización los ratones fueron retados por vía intraperitoneal con 10 cisticercos de *Taenia crassiceps* en PBS. Se tomaron muestras de sangre de los ratones cada semana después de la última inmunización y se sacrificaron por inhalación de CO_2 , a los 45 días infección. Se extrajeron los cisticercos de la cavidad peritoneal y se contaron. Para los ensayos de inmunización génica los ratones fueron inyectados tres veces por vía intramuscular a intervalos de 15 días con 100 μg de DNA plasmídico resuspendido en un volumen de 100-150 μl de PBS. Un día después de la última inmunización se retaron los ratones de la misma forma que se describe arriba y se sacrificaron a los 25 días de infección. En todos los ensayos, el porcentaje de protección se calculó de la siguiente manera: protección = número promedio de cisticercos en el grupo control/número promedio de cisticercos en el grupo inmunizado \times 100.

Detección de anticuerpos: las placas de ELISA de 96 pozos se sensibilizaron con 100 ng/pozo del antígeno en una solución amortiguadora de carbonatos (0.29 g de NaHCO_3 y 0.59 g de Na_2CO_3 en 100 ml, pH 9.6) 1 h a 37° C. Posteriormente, se lavaron los pozos cinco veces con 0.3% de Tween 20 en PBS (PBS-Tween) y se bloquearon con albúmina sérica bovina (BSA) al 1% en PBS-Tween por 1 h a 37° C. Después de lavarse nuevamente con PBS-Tween, se incubaron con sueros de ratones normales o inmunizados (100 μl /pozo), diluidos 1:500 en PBS-Tween con BSA (ver arriba), por 30 min a 37° C. Posteriormente,

se lavaron nuevamente con PBS-Tween (ver arriba) y se incubaron 30 min a 37° C con anticuerpo de cabra anti-IgG1 o IgG2a de ratón unidos covalentemente a peroxidasa (α -ratón-HPRT, Zymed laboratories), diluidos 1:1000 en PBS-Tween y BSA al 1%. Las placas fueron nuevamente lavadas con PBS-Tween y se les agregaron 100 μl /pozo de dihidrocloruro de o-fenilendiamina (OPD, 0.4 mg/ml) y H_2O_2 al 0.04% en amortiguador de citratos (ácido cítrico 24.3 mM, Na_2HPO_4 51.4 mM, pH 5) por 10 min. La reacción de revelado se detuvo adicionando 50 μl /pozo de 2.5 N de H_2SO_4 y se evaluó la absorción de luz a una 490 nm en un lector de ELISA.

Ensayos de proliferación celular: se realizaron ensayos de proliferación celular de células mononucleares de bazo. En estos ensayos las células se obtuvieron del bazo de ratones controles e inmunizados por disgregación del tejido con una malla metálica en RPMI-1640 suplementado al 10% con suero fetal bovino (RPMI suplementado). Se suspendió el disgregado en un tubo cónico y se incubó 20 min a 4° C para permitir que sedimenten los restos del tejido. El sedimento se descartó y la suspensión celular fue centrifugada a 200 g/10 min a 4° C. El sedimento se resuspendió y se incubó 10 min a 4° C en 3 ml de una solución hemolisante (KHCO_3 0.01 M, NH_4Cl 0.15 M, EDTA tetrasódico 0.01 mM) para eliminar a los eritrocitos. Se le agregaron 15 ml de RPMI-1640 suplementado y se centrifugó a 200 g por 10 min a 4° C. El sobrenadante fue descartado y las células mononucleares resuspendidas en 5 ml de RPMI suplementado tomando una alícuota para contar las células viables en una cámara de Neubauer por exclusión del azul tripano. Posteriormente, las células mononucleares fueron sembradas en una placa de 96 pozos depositando, en 100 μl , 500 células/pozo. Se agregaron 100 μl de VW2-1, VW4-1 o de un mitógeno. La caja se dejó incubando a 37° C, con humedad a saturación y 5% de CO_2 . Entre 18 y 24 h antes de cosechar los cultivos, se agregó 1 μCi /pozo de ^3H -timidina. Las células fueron cosechadas sobre papel de fibra de vidrio mediante un cosechador automático.

Producción de citocinas y determinación del fenotipo celular: los esplenocitos de ratones normales y de ratones inmunizados con el fragmento amino terminal (VW 2-1) se mantuvieron en cultivo en RPMI suplementado en cajas de 16 pozos (Costar) a una concentración de 5×10^6 células/pozo. Los cultivos se estimularon con 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ del fragmento amino terminal (VW 2-1) durante 48 h y se colectaron los sobrenadantes; se hicieron alícuotas y almacenaron a -70° C hasta su uso. La producción de interleucina 2 (IL-2), interferón- γ (IFN- γ) e interleucina-4 (IL-4) fue evaluada en los sobrenadantes por ELISA de sandwich con kits específicos de citocinas (Pharmingen, San Diego, CA), siguiendo las instrucciones de fabricante. Para analizar el fenotipo de los esplenocitos se mantuvieron los cultivos por 120 h.

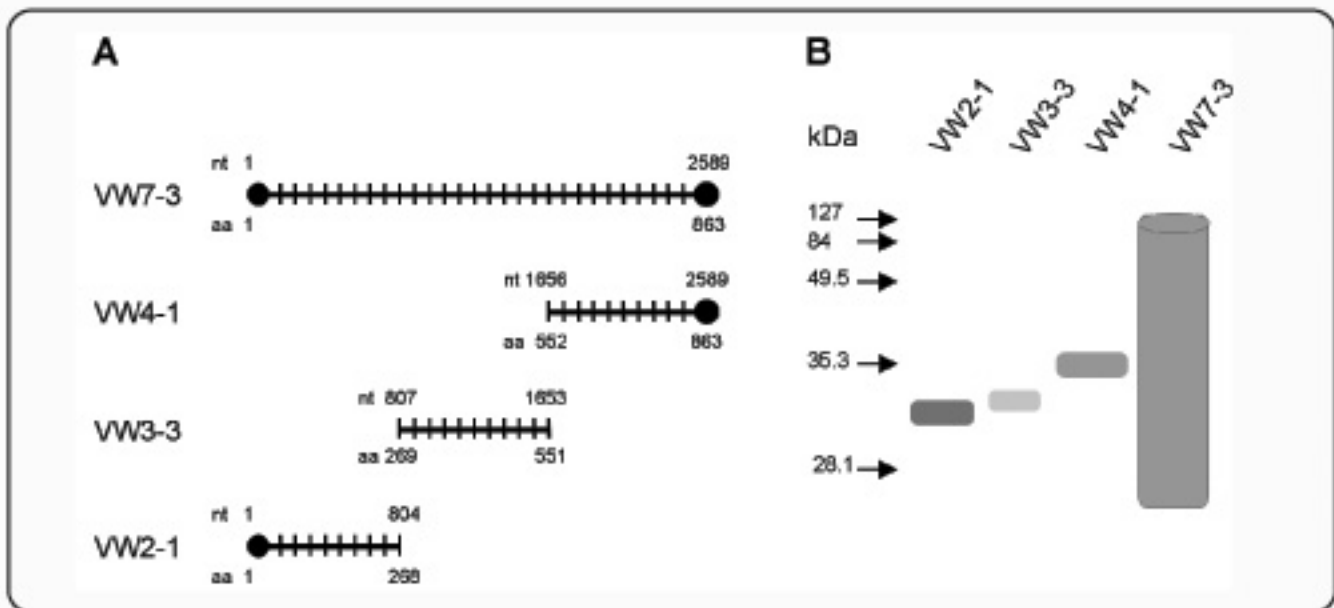


Figura 1. Productos Recombinantes de la Paramiosina de *Taenia solium* usados en este Estudio. A. representación esquemática; las posiciones de los nucleótidos (nt) y aminoácidos (aa) se indican con números basados en la secuencia de la proteína completa. B. Análisis de electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS mostrando la pureza de los productos recombinantes de TPmy purificados: 1. VW2-1, 2. VW3-3, 3. VW4-1, 4. VW7-3. Reproducida con permiso.³⁰

El análisis de fenotipo celular de los esplenocitos de ratones controles e inmunizados sin infectar e infectados; se realizó en un citofluorómetro de flujo (Becton Dickinson, San José, CA) de acuerdo a lo descrito anteriormente.³⁰

Análisis estadístico: el análisis estadístico de todos los ensayos se realizó aplicando la prueba *t* de Student.

Resultados

Propiedades inmunoprotectoras de la paramiosina

La expresión de TPmy recombinante permite estudiar hacia qué regiones de la proteína se dirige la respuesta inmune humoral y celular del huésped. Estudios realizados en el humano y en el ratón revelaron que la respuesta inmune humoral y celular resultante de una inmunización con la TPmy, es variable en contra de cada una de las regiones, a pesar de que la molécula es conformacionalmente muy similar.³⁰ Para llevar a cabo estos estudios se diseñaron cuatro construcciones plasmídicas (Figura 1), que expresan portécnicas del DNA recombinante, la TPmy completa (VW 7-3), el tercio amino terminal (VW 2-1), el tercio central (VW3-3) y el tercio carboxilo terminal (VW4-1).

Inicialmente se analizó la respuesta inmune de pacientes con neurocisticercosis, encontrándose que sus anticuerpos

Cuadro I. Estimulación de células periféricas de pacientes y de individuos sanos con los fragmentos recombinantes de paramiosina de la *Taenia solium*

Muestras humanas	Estimulación con los productos recombinantes de TPmy*			Número de casos
	VW2-1	VW3-3	VW4-1	
Pacientes	+	+	+	3
neurocisticercosis	-	-	-	2
con anticuerpos a TPmy: 9/24†	+	+	+	1
	-	-	+	1
	-	+	+	1
% positivo	55	55	66	Total 9
Individuos sanos	+	+	-	6
con anticuerpos a TPmy: 9/24†	+	+	+	1
	-	-	-	1
% positivo	88	77	22	Total 9

*Muestras de células de 24 pacientes neurocisticercosis o individuos sanos de la misma área endémica para cisticercosis fueron estimuladas *in vitro*, como se describe en los Materiales y Métodos, con TPmy purificada de cisticercos de *T. solium*.

†Índice de estimulación ≥ 2 , fue considerado positivo (+), los demás como negativos (-).

Reproducida con permiso.³⁰

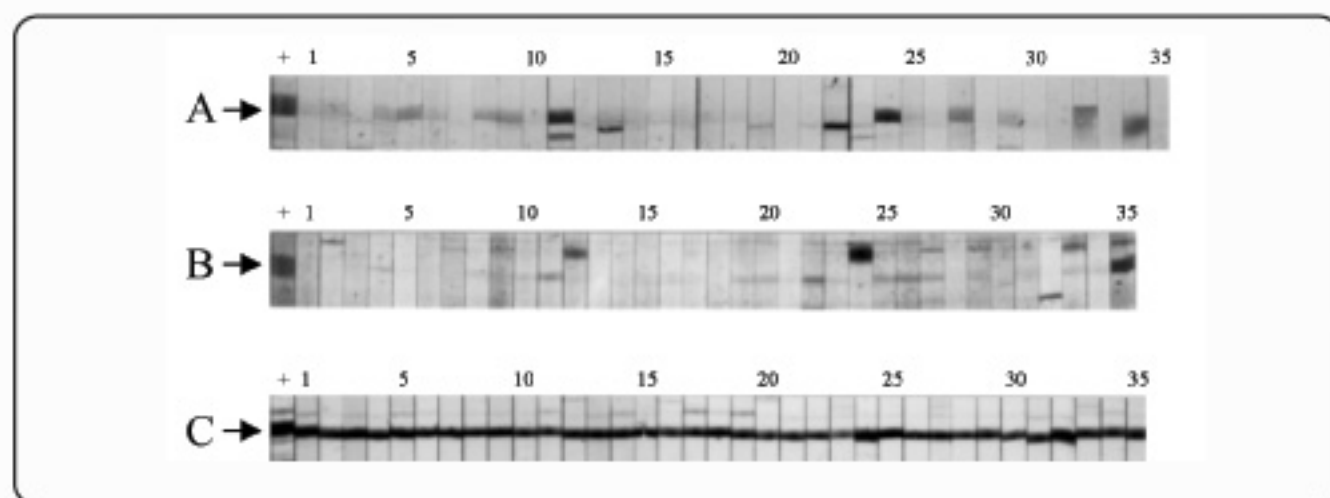


Figura 2. Reconocimiento por anticuerpos humanos de los fragmentos recombinantes de la Paramiosina de *Taenia solium*. Los sueros de paciente neurocisticercosis (1-35) fueron probados por Western blot contra: A. VW2-1, B. VW3-3, C. VW4-1. Los carriles en los extremos izquierdos (+) muestran el reconocimiento de cada región por un suero hiperinmune de conejo anti-TPmy. Reproducida con permiso.²⁰

Cuadro II. Ensayos de protección en el modelo murino de cisticercosis por *T. crassiceps*^a

Vacunación	Número de ratones	Carga parasitaria	$\bar{x} \pm D.E^b$ (%)	Protección ^c (%)
Exp.1				
Alúmina	4	48,38,22,36	36 \pm 11	-
VW7-3	4	4,24,24,12	16 \pm 10	55 ^d
Exp.2				
Alúmina	6	7,36,54,76,141,76	65 \pm 45	-
VW7-3	6	19,24,52,37,43,9	31 \pm 16	52 ^d
Exp.3				
Alúmina	5	20,31,73,92,134	70 \pm 46	-
VW2-1	5	0,0,1,2,41	9 \pm 18	97 ^d
VW4-1	6	40,73,78,82,110,147	88 \pm 36	-25
Exp.4				
Alúmina	5	38,44,54,76,110	64 \pm 29	-
VW 2-1	6	7,9,18,38,43,86	34 \pm 30	47 ^d
VW 4-1	6	0,0,10,20,66,150	41 \pm 59	36
Exp.5				
Alúmina	5	81, 82, 86, 31, 158	88 \pm 45	-
VW3-3	5	79, 8, 70, 79, 54	58 \pm 30	34
Exp.6				
Alúmina	6	107, 300, 134, 55, 170, 64	138 \pm 90	-
VW3-3	6	99, 39, 29, 90, 120, 22	67 \pm 42	52 ^d

^aLos ratones fueron retados por inoculación intraperitoneal con 10 cisticercos, una semana después de la última inmunización.

^bLos valores son promedios \pm desviación estándar (D.E) de la carga parasitaria 45 días después de la infección.

^cLa protección fue calculada como una reducción de la carga parasitaria expresada en porcentajes, en donde la carga parasitaria del grupo control de ratones inyectados con alúmina representa el 100%.

^dDiferencias estadísticamente significativas entre el grupo control de ratones inyectados con alúmina y el grupo de ratones inmunizados ($p \leq 0.05$).

Reproducida con permiso.²⁸

Cuadro III. Proliferación y perfil de citocinas de células esplénicas de ratones inmunizados con VW2-1.

Tratamiento ^a	S.I. ^b	IL-2	IFN- γ (pg/ml \pm S.D)	IL-4
No-inmunizado	1	713 \pm 62	2683 \pm 1765	\geq 30
No-inmunizado + VW2-1	3.25 ^c	954 \pm 45 \S	4635 \pm 1260	107 \pm 118
Inmunizado	1	813 \pm 76	2032 \pm 436	\geq 30
Inmunizado + VW2-1	7.33 ^c	1841 \pm 274 ^c	7619 \pm 1019 \S	33 \pm 39

^aLas células esplénicas de ratones inmunizados y no inmunizados con VW2-1, se cultivaron *in vitro* con y sin VW2-1 como se describe en los Métodos, y se evaluó la proliferación y se cuantificaron las citocinas en los sobrenadantes de cultivo.

^bLos valores corresponden a los índices de estimulación calculados a partir de las medias de radioactividad incorporada por células de 3 ratones individuales por grupo, después de un pulso de 18 hr con [³H] timidina.

^cDiferencias estadísticamente significativas entre las células de ratones estimulados (inmunizados) y control (no inmunizados) ($p < 0.01$). Reproducida con permiso.²⁸

reconocen preferentemente el extremo carboxilo terminal de la TPmy, mientras que el extremo central y el amino terminal son pobremente reconocidos (Figura 2). En contraste, la respuesta inmune-celular muestra una ligera preferencia por el extremo amino terminal (Cuadro I).

Ensayos de ELISA revelaron que los anticuerpos de los ratones inmunizados con TPmy recombinante completa, también reconocen preferentemente al extremo carboxilo terminal de la TPmy, mientras que el extremo amino terminal es pobremente reconocido (no mostrado), en concordancia a lo encontrado en humanos. En contraste, ensayos de proliferación *in vitro* revelaron que los linfocitos T extraídos de ratones inmunizados con TPmy recombinante, proliferan principalmente contra el extremo amino terminal (no mostrado). Estos resultados sugieren un ocultamiento de la región que une C1q al reconocimiento por anticuerpos.

También se usaron las anteriores proteínas recombinantes (la TPmy completa, y los fragmentos correspondientes a las regiones amino, central y carboxilo terminal) para inducir una inmunidad protectora en ratones altamente susceptibles a la infección intraperitoneal con cisticercos de *T. crassiceps*. Los resultados de protección indicaron que la mayoría de los componentes protectores de la TPmy radican en el fragmento correspondiente al tercio amino terminal (Cuadro II) y que este fragmento genera en el ratón una respuesta inmune tipo Th1 (Cuadro III).

Ensayos de protección por inmunización génica

La inmunización génica tiene varias ventajas sobre la inmunización con proteínas naturales o recombinantes.³² Se trata de una inmunización totalmente específica hacia el antígeno codificado, además de que la introducción de una

secuencia secretora, garantiza la liberación del antígeno hacia los tejidos del huésped, facilitando su reconocimiento inmunológico en un contexto de las moléculas clase II del complejo mayor de histocompatibilidad, favoreciendo respuestas dirigidas por linfocitos T de ayuda.³³ También, el DNA es más estable y fácil de producir en gran escala que las proteínas. Finalmente, la inmunización génica permite el uso de secuencias codificadoras de interleucinas para dirigir la respuesta hacia el perfil Th deseado.³⁴

Para explorar el uso de la inmunización génica, se desarrollaron construcciones plasmídicas de expresión eucarionte que contienen la secuencia codificadora de la paramiosina completa (pTC-7-3) así como la secuencia codificadora del fragmento amino terminal (pTC-2-1), que había resultado ser el fragmento más protector en contra de la cisticercosis murina por *T. crassiceps* (Cuadro II). La funcionalidad de ambas construcciones se verificó por inmunoprecipitación de la paramiosina en el sobrenadante de cultivo de células COS-7 transfectadas con pTC-7-3 y pTC-2-1 (no mostrado). Posteriormente se realizaron pruebas de Western blot poniendo a reaccionar los sueros de ratones inmunizados con la construcción pTC-2-1, encontrándose que reconocen a la paramiosina en forma similar a los sueros de los ratones inmunizados con la propia proteína recombinante (no mostrado). Para dirigir la respuesta hacia el perfil protector Th1 se co-inmunizaron los ratones con plásmidos de expresión de las subunidades P35 y P40 de la IL-12 (pEDP35 y pEDP40). Se detectaron altos niveles de anticuerpos IgG2a en los sueros de los ratones inmunizados genicamente, incluso superiores a los encontrados en ratones inmunizados con la proteína recombinante (Cuadro IV). Sin embargo, la co-inyección de los ratones con los plásmidos de expresión para IL-12 no indujo un incremento significativo en los niveles de IgG2a, por el contrario, el grupo de

Cuadro IV. Perfil de la respuesta humoral en ratones inmunizados con vectores plasmídicos*

Inmunización	Isotipos de anticuerpos		Proporción IgG1: IgG2a
	IgG1	IgG2a	
Solución salina	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1	1:1
VW2-1	0.2 ± 0.02 [§]	0.4 ± 0.05 [§]	1:2
Vectores plasmídicos			
pTC-2-1	0.8 ± 0.4 [§]	1.7 ± 0.4 [§]	1:2
pTC-2-1 + IL-12	1.0 ± 0.4 [§]	1.4 ± 0.3 [§]	1:1

*Los sueros de ratones inmunizados con VW2-1 (diluidos 1:200) fueron analizados por ELISA (ver Materiales y Métodos). Los valores son promedios ± desviación (D.E.) de cuadruplicados expresados en densidades ópticas a 490 nm.

§Valores estadísticamente significativos con relación al suero de ratones no-inmunes ($p < 0.01$).

ratones que presentó niveles más elevados de este isotipo de anticuerpo tipo Th1 fue el inyectado con el vector pTC-2-1 que únicamente expresa el fragmento amino terminal de la TPmy.

Ensayos de proliferación con células de bazo de los ratones inyectados con pTC2-1 mostraron altos índices de estimulación cuando las células fueron estimuladas *in vitro* con paramiosina recombinante (Cuadro V), similares a los reportados en la cuadro III con células de ratones inmunizados con el fragmento recombinante VW2-1. Las células de bazo obtenidas del grupo de ratones co-inyectados con pTC-2-1 y pEDP35 + pEDP40 fueron menos sensibles a la estimulación *in vitro* con paramiosina recombinante.

Ensayos iniciales de protección por inmunización génica con los plásmidos pTC-2-1, pEDP35 y pEDP40 han mostrado niveles altos de protección. Los resultados en la figura 3 muestran que los ratones inmunizados con el pTC-2-1 presentan una reducción en la carga parasitaria de 66%, con relación al grupo control de ratones inyectados con PBS. Este resultado es similar al obtenido con la proteína recombinante. Sin embargo, el grupo de ratones co-inyectados con pTC-2-1 más los plásmidos que inducen la expresión de IL-12, resultaron en una reducción de la carga parasitaria de 79%, lo cual sugiere que la IL-12 mejora la protección aunque no modifica el perfil de isotipos de anticuerpos tipo Th1 (Cuadro IV).

Discusión

Se ha sugerido que la paramiosina induce protección contra helmintiasis del ser humano, la respuesta inmune humana contra la paramiosina ha sido relacionada con la

resistencia a la esquistosomiasis¹⁷⁻²² o a filariasis.^{23,24} La resistencia hacia la cisticercosis pudiera también estar relacionada con la respuesta celular en contra del extremo amino terminal de la TPmy, porque un mayor porcentaje de individuos sanos, que viven en zonas endémicas, reaccionaron contra ese tercio, en comparación con los infectados. Por su relevancia, el hallazgo merece un seguimiento especial para confirmar o descartar esta posibilidad.

La respuesta humoral del paciente cisticercoso se dirige preferentemente contra el tercio carboxilo terminal, siendo

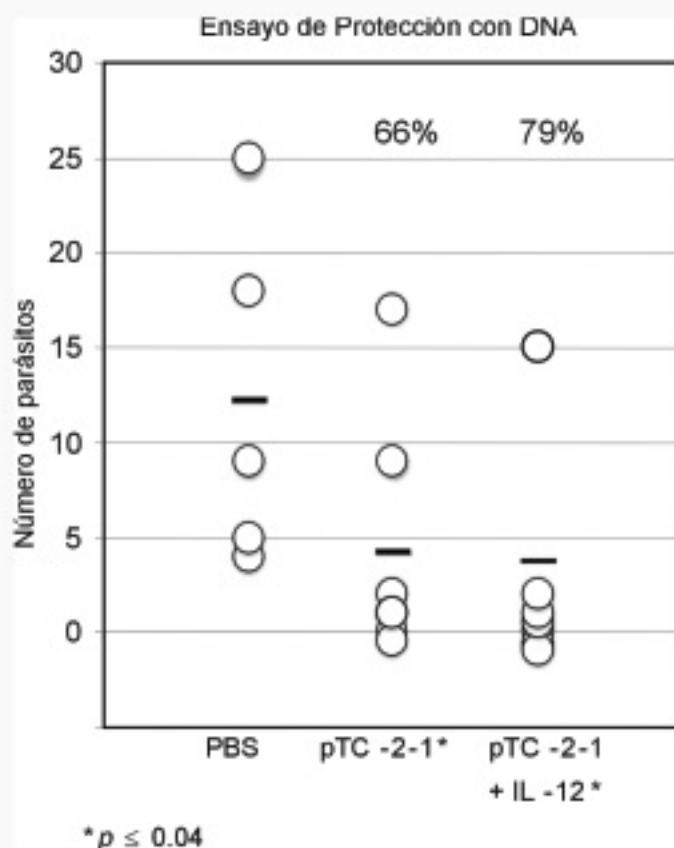


Figura 3. Ensayo de protección por inmunización génica de ratones. Grupos de siete ratones Balb/c hembras de ocho a 10 semanas de edad fueron inmunizados por vía intramuscular, tres veces a intervalos de 15 días con 100 µg de los plásmidos pTC2-1, pEDP35 y pEDP40 (ver Materiales y Métodos). El grupo control fue inyectado bajo el mismo régimen con solución amortiguadora de fosfatos (PBS). Los ratones fueron retados un día después de la última inmunización y sacrificados a los 25 días de infección. Los círculos indican la carga parasitaria de cada ratón y las barras horizontales indican el promedio del grupo. En la parte superior de la gráfica se muestran los porcentajes de protección correspondientes.

Cuadro V. Proliferación de células de bazo de ratones inmunizados génicamente

Inmunización	Índices de Estimulación ¹			
	Paramiosina recombinante 0.1mg/ml	1.0mg/ml	10mg/ml	ConA 5.0mg/ml
Solución salina	1.2	1.2	1.4	27.1
VW2-1	-	-	7.3 ²	-
Vectores plasmídicos				
pTC-2-1	7.0 ²	10.6 ²	9.3 ²	23.4
pTC-2-1 + IL-12	4.2 ²	13.1 ²	9.2 ²	29.2

¹Los valores reportados son índices de estimulación calculados a partir de los promedios de incorporación de radioactividad (cuadruplicados) para cada grupo experimental después de un pulso de 18 hrs. con ³H]timidina.

²Los valores absolutos para cada grupo experimental fueron estadísticamente significativos con relación a los valores absolutos del grupo control de células no-estimuladas ($p < 0.02$).

el tercio aminoterminal pobremente reconocido. En los ratones inmunizados ocurrió el mismo fenómeno que en la infección humana. Cabe hacer notar que los anticuerpos de individuos infectados con *Schistosoma japonicum*, también reconocen preferentemente el tercio carboxilo terminal.²⁵

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

Llama la atención la diferencia entre el reconocimiento humoral del tercio amino terminal y del tercio carboxilo terminal, tanto en el humano como en el ratón. Ambos extremos poseen pequeñas regiones con estructura al azar (random-coil) y una gran porción de α -hélice super-enrollada.¹⁴ No hay diferencias conformacionales obvias que expliquen el contraste tan marcado en el reconocimiento de los anticuerpos. Es posible que la respuesta inmune celular en contra del extremo aminoterminal sea consecuencia de que éste puede unirse a la colágena. Existe un receptor con una región de estructura colagénica que se encuentra en macrófagos, el llamado receptor scavenger. De hecho, evidencia reciente de nuestro grupo indica que la TPmy interacciona con el receptor scavenger, siendo capaz de inducir la internalización de partículas de lipoproteínas de baja densidad (no mostrado). Se ha

sugerido que los antígenos al unirse a este receptor son mejor presentados a los linfocitos T.²⁶ Por lo tanto, el tercio amino terminal puede tener una mayor capacidad de unirse a una célula presentadora como el macrófago que el tercio carboxilo terminal, explicando la mayor proliferación linfocitaria en unos y otros sistemas (humano y ratón). Esta posibilidad también explica la relación entre la respuesta inmune celular y la protección.

Los resultados obtenidos en los ensayos de protección en ratones son altamente prometedores, no solo porque se obtiene un nivel considerable de protección, cercano a 60% por inmunización con el fragmento amino terminal, y de casi 79% en el grupo de ratones coinyectados con pTC-2-1 más los plásmidos que inducen la expresión de IL-12. La protección parece relacionada con la respuesta Th1. Esto es consistente con estudios previos en el mismo modelo murino de cisticercosis por *T. Crassiceps*.³⁷⁻³⁹ Sin embargo, los resultados de los ratones coinyectados con pTC-2-1 más los plásmidos que inducen la expresión de IL-12, que resultaron en la mayor reducción de la carga parasitaria (79%), sugiere que la IL-12 mejora la protección aunque no modifica el perfil de isotipos de anticuerpos tipo Th1. En otras palabras, es posible que un perfil Th2 también contribuya a incrementar la protección.

La evidencia respecto al mecanismo protector que induce la inmunización con paramiosina es interesante, especialmente por la polarización que fue descubierta en ratón entre la respuesta Th1 y Th2. Se sabe que la paramiosina induce protección contra *S. mansoni* o *B. malayi* asociada con hipersensibilidad de tipo tardío o DTH,^{23,40} y que provoca la liberación de linfocinas activadoras de macrófagos contra *S. mansoni*;^{17,40} esto sugiere un mecanismo tipo Th1. En otro sentido, algunos reportes muestran la inducción de protección contra *S. japonicum* con un anticuerpo monoclonal IgE y la inducción de citotoxicidad contra esquistosomas cuando se incubaba el monoclonal con eosinófilos;⁴¹ esto sugiere un mecanismo tipo Th2. Aunque parecen opuestas las dos tipos de evidencia, ambas indican que la resistencia contra este tipo de parásitos tiene un componente celular.

Finalmente, vale la pena notar que también se ha logrado inducir protección en cerdos contra la infección por *S. japonicum*.⁴² La paramiosina puede incluso conferir protección heteróloga. Por ejemplo, la paramiosina de *Caenorhabditis elegans* induce protección contra *Brugia malayi*⁴³ y lo mismo se ha sugerido de *Lumbricus terrestris* contra *Schistosoma japonicum*.⁴⁴ Algo similar encontramos nosotros, porque la paramiosina de *T. solium* induce protección parcial contra *T. crassiceps*. Esta protección heteróloga hace posible continuar utilizando el modelo murino de cisticercosis por *T. crassiceps* para el desarrollo de una vacuna en contra de la cisticercosis porcina basada en TPmy.

Referencias

- Flisser A, Woodhouse E, Larraide C. Human cysticercosis: antigens, antibodies and non-responders. *Clin Exp Immunol* 1980;39:27-37.
- Espinoza B, Ruiz-Palacios G, Tovar A, et al. Characterization by enzyme-linked immunosorbent assay of the humoral immune response in patients with neurocysticercosis and its application in immunodiagnosis. *J Clin Microbiol* 1995;24:536-541.
- Guerra G, Flisser A, Cañedo L, Lacleite JP. Biochemical and immunological characterization of antigen B purified from cysticerci of *Taenia solium*. Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives (edited by Flisser et al.). New York: Academic Press; 1992. p. 437-452.
- Piaccante A, Flisser A, Larraide C. Fibronectin-like properties of antigen B from cysticerci of *Taenia solium*. 1992. In: Flisser A, et al. editors. Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives. New York: Academic Press; 1992. p. 453-464.
- Lacleite JP, Alagón A, Wilms K, Torre-Blanco A. Purification of antigen B from *Taenia solium* cysticerci by affinity to mammalian collagen. *J Parasitol* 1990;76:273-276.
- Lacleite JP, Merchant MT, Wilms K. Histological and ultrastructural localization of antigen B in the metacercaria of *Taenia solium*. *J Parasitology* 1987;73:121-129.
- Lumsden RD. Histological studies on the absorptive surface of cestode. II. The synthesis and intracellular transport of protein in the strobilar integument. *Zeitschr Parasitenk* 1968;28:1-13.
- Trímble J, Lumsden RD. Cytochemical characterization of tegument membrane associated carbohydrates in *Taenia crassiceps* larvae. *J Parasitol* 1975;61:665-667.
- Lacleite JP, Rodríguez M, Landa A, Arcos L, de Aiba P, Mancilla R, Wilms K. The coexistence of *Taenia solium* cysticerci and the pig: role of antigen B. *Acta Leidensia* 1989;57:115-122.
- Lacleite JP, Skelly P, Merchant M, Shoemaker CB. Aldehyde fixation dramatically alters the immunolocalization pattern of paramyosin in helminth parasites. *Exp Parasitol* 1995;81:140-144.
- Lacleite JP, Landa A, Arcos L, Wilms K, Davis, AE, Shoemaker CB. Paramyosin is the *Schistosoma mansoni* (Trematoda) homologue of antigen B from *Taenia solium* (Cestoda). *Mol Biochem Parasitol* 1991;44:287-295.
- Landa A, Lacleite JP, Nicholson-Weller A, Shoemaker CB. *Taenia solium* paramyosin (AgB): cDNA cloning and recombinant expression of collagen binding and complement inhibitor activity. *Mol Biochem Parasitol* 1993;60:343-347.
- Vargas-Parada L, Lacleite JP. Gene structure of *Taenia solium* paramyosin. *Parasitol Res* 2003;89:375-378.
- Cohen C, Parry DA. α -Helical coiled coils and bundles: how to design an α -helical protein. *Prot Struct Funct Genet* 1990;7:1-16.
- Lacleite JP, Shoemaker CB, Richter D, Arcos L, Pante N, Cohen C, Bing D, Nicholson-Weller A. Paramyosin inhibits complement C1. *J Immunol* 1992;148:124-128.
- Kalina B, McManus DP. An IgG (Fc gamma)-binding protein of *Taenia crassiceps* (Cestoda) exhibits sequence homology and antigenic similarity with schistosome paramyosin. *Parasitology* 1993;106:289-296.
- Pearce EJ, James SL, Hieny S, Lanar DE, Sher A. Induction of protective immunity against *Schistosoma mansoni* by vaccination with schistosome paramyosin (Sm97), a non-surface parasite antigen. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:5678-5682.
- Flanigan TP, King CH, Lett RR, Nanduri J, Mahmoud AA. Induction of resistance to *Schistosoma mansoni* infection in mice by purified parasite paramyosin. *J Clin Invest* 1989;83:1010-1014.
- Richter D, Incami RN, Harn DA. Isotype responses to candidate vaccine antigens in protective sera obtained from mice vaccinated with irradiated cercariae of *Schistosoma mansoni*. *Infect Immun* 1993;61:3003-3011.
- Richter D, Reynolds SR, Harn DA. Candidate vaccine antigens that stimulate the cellular immune response of mice vaccinated with irradiated cercariae of *Schistosoma mansoni*. *J Immunol* 1993;151:255-265.
- Yang W, Waine GJ, McManus DP. Antibodies to *Schistosoma japonicum* (Asian bloodfluke) paramyosin induced by nucleic acid vaccination. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 212:1029-1039.
- McManus DP, Wong JY, Zhou J, Cai C, Zeng Q, Smyth D, Li Y, Kalina BH, Duke MJ, Yi X. Recombinant paramyosin (reo-S)-97 tested for immunogenicity and vaccine efficacy against *Schistosoma japonicum* in mice and water buffaloes. *Vaccine* 2001;20:870-878.
- Nanduri J, Kazura JW. Paramyosin-enhanced clearance of *Brugia malayi* microfilaraemia in mice. *J Immunol* 1988;143:3359-3363.
- Li BW, Chandrasekar R, Weil GJ. Vaccination with recombinant filarial paramyosin induces partial immunity to *Brugia malayi* infection in birds. *J Immunol* 1993;150:1881-1885.
- Nara T, Matsumoto N, Janochanur T, Matsuda H, Yamamoto K, Iimura T, Nakamura K, Akawa M, Oswald I, Sher A, Kita K, Kojima S. Demonstration of the target molecule of a protective IgE antibody in secretory glands of *Schistosoma japonicum* larvae. *Int Immunol* 1994;6:963-971.
- Correa-Oliveira R, Pearce EJ, Oliveira GC, et al. The human immune response to defined immunogens of *Schistosoma mansoni*: elevated antibody levels to paramyosin in stool-negative individuals from two endemic areas in Brazil. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 1989;83:798-804.
- Conraths FJ, Harnett MJ, Worms, MJ, Parkhouse RM. Immunological cross-reaction between an *Onchocerca* paramyosin-like molecule and a microfilaria surface antigen. *Trop Med Parasitol* 1992;43:135-138.
- Vázquez-Talavera J, Solís CF, Terrazas LI, Lacleite JP. Characterization and protective potential of the immune response to *Taenia solium* paramyosin in a murine model of cysticercosis. *Infect Immun* 2001;69(9):5412-5416.
- Sciutto E, Fragoso G, Trueba L, Lemus D, Montoya RM, Díaz ML, Govezensky T, Lomeli C, Tapia G, Larraide C. Cysticercosis vaccine: cross protecting immunity with *Taenia solium* antigens against experimental murine *Taenia crassiceps* cysticercosis. *Parasite Immunol* 1990;12:667-666.
- Vázquez-Talavera J, Solís CF, Medina-Escutia E, López ZM, Proaño J, Correa D, Lacleite JP. Human T and B cell epitope mapping of *Taenia solium* paramyosin. *Parasite Immunol* 2001;23:575-579.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680-685.
- Tang DC, DeVit M, Johnston SA. Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature* 1992;356:152-154.
- Whitton JL, Rodríguez F, Zhang J, Hassett DE. DNA immunization: mechanistic studies. *Vaccine* 1998;17:1612-1618.
- Flo J, Pérez AB, Tsiminetsky S, Baralle F. Superiority of intramuscular route and full length glycoprotein D for DNA vaccination against herpes simplex 2. Enhancement of protection by the co-delivery of the GM-CSF gene. *Vaccine* 2000;2242-3253.
- Nara T, Tanabe K, Mahakunijcharoen Y, Osada Y, Matsumoto N, Kita K, Kojima S. The B cell epitope of paramyosin recognized by a protective monoclonal IgE antibody to *Schistosoma japonicum*. *Vaccine* 1997;15:79-84.
- Abraham R, Singh A, Mukhopadhyay SK, Basu V, Bal V, S. Rath. Modulation of immunogenicity and antigenicity of proteins by myelination to target scavenger receptors on macrophages. *J Immunol* 1995;154:1-8.
- Sciutto E, Fragoso G, Baco M, De la Cruz V, Lemus L, Lamoyi E. Depressed T-cell proliferation associated with susceptibility to experimental *Taenia crassiceps* infection. *Infect Immun* 1995;63:2277-2281.
- Villa OF, Kuhn RE. Mice infected with the larvae of *Taenia crassiceps* exhibit a Th2-like immune response with concomitant anergy and down regulation of Th1-associated phenomena. *Parasitology* 1996;112:581-570.
- Terrazas LI, Cruz M, Rodríguez-Sosa M, Bojalil R, García-Tamayo FY, Larraide C. Th1-type cytokines improve resistance to murine cysticercosis caused by *Taenia crassiceps*. *Parasitol Res* 1999;85:130-141.
- Sher A, Pearce E, Hieny S, James S. Induction of protective immunity against *Schistosoma mansoni* by a non-living vaccine. IV. Fractionation and antigenic properties of a soluble adult worm immunoprophylactic activity. *J Immunol* 1988;136:3878-3883.
- Kojima S, Janochanur H, Hata H, Nimura Y. Role of a mouse monoclonal IgE antibody in passive transfer of immunity to *Schistosoma mansoni* infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz Rio J* 1987;82:237-241.
- Chen H, Nara T, Zeng X, Satoh M, Wu G, Jiang W, Yi F, Kojima S, Zhang S, Hirayama K. Vaccination of domestic pig with recombinant paramyosin, against *Schistosoma japonicum* in China. *Vaccine* 2000;18:2142-2146.
- Nanduri J, Kazura JW. Paramyosin-enhanced clearance of *Brugia malayi* microfilaraemia in mice. *J Immunol* 1988;143:3359-3363.
- Wisniewski AV, Kresina TF. Induction of protective immunity to schistosomiasis with immunologically cross-reactive Lumbriks molecules. *Int J Parasitol* 1995;25:503-510.

ANEXO 5

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

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

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

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

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

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

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

MATERIALS AND METHODS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

RESULTS

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

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

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

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

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

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

Antibody reactivity against TPmy recombinant fragments.

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

T-cell response against TPmy recombinant fragments.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

DISCUSSION

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ACKNOWLEDGMENTS

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

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

REFERENCES

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

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

ANEXO 6

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

JOSÉ VÁZQUEZ-TALAVERA¹, CARLOS F.SOLÍS¹, EDITH MEDINA-ESCUZIA², ZOILA MORALES LÓPEZ², JEFFERSON PROAÑO³, DOLORES CORREA² & JUAN PEDRO LACLETTE¹

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

SUMMARY

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

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

INTRODUCTION

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

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

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

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

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

Received: 5 October 2000

Accepted for publication: 12 July 2001

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

MATERIALS AND METHODS

Patients sera

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

Mononuclear cells

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

of 24 individuals within the same age range and gender ratio was chosen from healthy volunteers from the same endemic areas. Twenty milliliters of blood samples were collected from patients and healthy individuals by venopuncture in sterile Vacutainer tubes containing heparin as anticoagulant. Peripheral blood mononuclear cells were isolated by centrifugation over Histopaque density gradients (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA). After separation, cells were washed with Hank's balanced solution (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA) and resuspended in RPMI-1640 medium (Gibco BRL), supplemented with 15% heat inactivated bovine fetal serum (HyClone Laboratories, Inc., Logan, UT, USA), 50 mM 2-mercaptoethanol, 200 mM L-glutamine, 100 µ/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 0.1 mM nonessential amino acids and 1% antimycotic (PPL0; Gibco BRL). Cell viability was assessed by the trypan blue exclusion test.

T. solium paramyosin

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

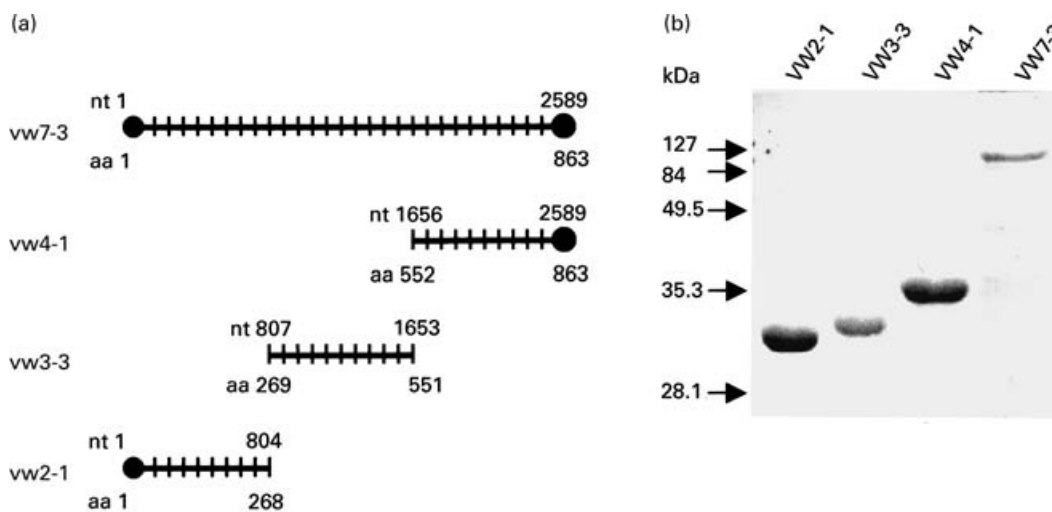


Figure 1 Recombinant products of *Taenia solium* paramyosin used in this study. (a) Schematic representation; nucleotide (nt) and amino acid (aa) positions are indicated by numbers based on the full-length sequence. (b) SDS-PAGE analysis showing purified recombinant products of TPmy: 1, VW2-1; 2, VW3-3;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

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

Antibody recognition of the recombinant fragments of Tpm_y

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

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

Proliferation assays

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

RESULTS AND DISCUSSION

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

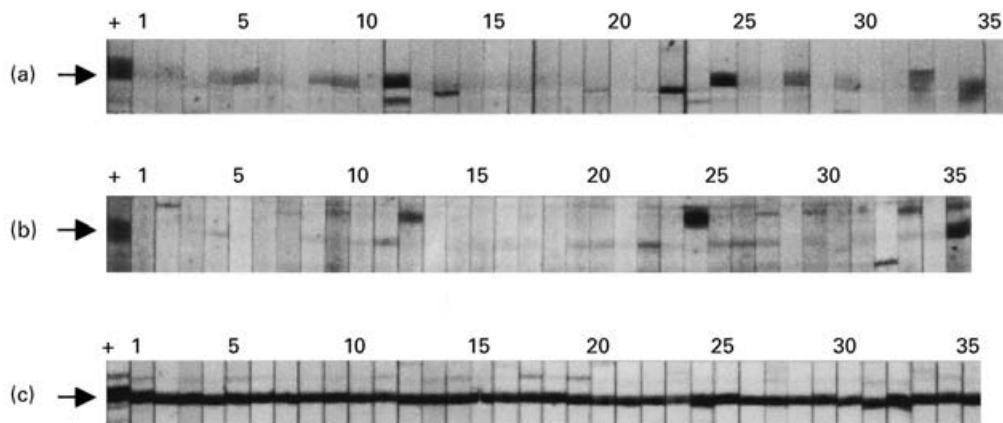


Figure 2 Human antibody recognition of the recombinant fragments of *Taenia solium* paramyosin. Sera from neurocysticercotic patients (1–35) were tested by Western blot against: (a) VW2-1, (b) VW3-3 and (c) VW4-1. Lanes on the left (+) show the recognition of each fragment by a rabbit anti-TPmy sera.

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

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

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

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

carried out by determining the antibody recognition of the recombinant fragments corresponding to approximate thirds of the TPmy molecule. Thirty-5 sera that were positive against native TPmy by Western blot were selected from a group of 50 human sera from neurocysticercotic patients (data not shown). As shown in Figure 2, a remarkable dominance in the recognition towards the carboxyl end (VW4-1) was found when sera from human cysticercotic patients were tested, indicating that B cell epitopes are predominantly located in that region of TPmy. This result is interesting because TPmy is a particularly homogenous molecule: with approximately 95% of the amino acid sequence maintaining the 7/28 repeat pattern, characteristic of α -helical coiled-coil proteins (17). Only the two ends of this filamentous molecule, contain small sequences (15 residues at the amino terminus and 31 residues at the carboxyl terminus) that break the helical secondary structure. Recognition of the central (VW3-3) and of the amino end (VW2-1) fragments was considerably lower. The sera from patients with tuberculosis and amebiasis were nonreactive to any recombinant fragment (not shown), eliminating the possibility that recognition of VW4-1 might be due to binding of immunoglobulins through the Fc region, caused by the ability of TPmy to bind C1q (3). The results with the sera from human patients are consistent with the concept that differences in these nonhelical regions have a strong influence on the outcome of the antibody recognition.

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

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

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

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

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

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

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

ACKNOWLEDGEMENTS

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

REFERENCES

- Grossman Z, Ram D, Markovics A *et al.* *Schistosoma mansoni*: stage-specific expression of muscle-specific genes. *Exp Parasitol* 1990; **70**: 62–71.
- Kalina BH, McManus DP A vaccine against the Asian schistosome, *Schistosoma japonicum*: an update on paramyosin as a target of protective immunity. *Int J Parasitol* 1997; **27**: 1213–1219.
- Laclette JP, Shoemaker CB, Richter D *et al.* Paramyosin inhibits complement C1. *J Immunol* 1992; **148**: 124–128.
- Muhlschlegel F, Sygulla L, Frosch P *et al.* Paramyosin of *Echinococcus granulosus*: cDNA sequence and characterization of a tegumental antigen. *Parasitol Res* 1993; **79**: 660–666.
- Flisser A, González D, Rodríguez-Carbajal J *et al.* Swine cysticercosis treated with praziquantel, a short report. *Acta Leidensia* 1989; **57**: 255–258.
- Hirsch C, Carvalho-Queiroz C, Franco GR *et al.* Evidentiation of paramyosin (Sm-97) as a modulating antigen on granulomatous hypersensitivity to *Schistosoma mansoni* eggs. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1997; **92**: 663–667.
- Steel C, Limberger RJ, McReynolds LA *et al.* B cell responses to paramyosin. Isotypic analysis and epitope mapping of filarial paramyosin in patients with onchocerciasis. *J Immunol* 1990; **145**: 3917–3923.
- Langy S, Plichart C, Luquiaud P *et al.* The immunodominant *Brugia malayi* paramyosin as a marker of current infection with *Wuchereria bancrofti* adult worms. *Infect Immun* 1998; **66**: 2854–2858.
- Waive GJ, Yang W, Ross AG *et al.* Differential antigen-stimulated proliferation of human mononuclear cells by recombinant *Schistosoma japonicum* antigens in a Chinese population. *Clin Exp Immunol* 1998; **112**: 69–73.
- Flanigan TP, King CH, Lett RR *et al.* Induction of resistance to *Schistosoma mansoni* infection in mice by purified parasite paramyosin. *J Clin Invest* 1989; **83**: 1010–1014.
- Ramírez BL, Kurtis JD, Wiest PM *et al.* Paramyosin: a candidate vaccine antigen against *Schistosoma japonicum*. *Parasite Immunol* 1996; **18**: 49–52.
- Yang W, Geoffrey N, Gobert GN, McManus DP. Oral vaccination of mice with recombinant *Schistosoma japonicum* proteins induces specific anti-parasites antibodies and damage to adult worms after a challenge infection. *Int J Parasitol* 1997; **27**: 843–853.
- Li BW, Chandrashekar R, Weil GJ. Vaccination with recombinant filarial paramyosin induces partial immunity to *Brugia malayi* infection in jirds. *J Immunol* 1993; **150**: 1881–1885.
- Nara T, Tanabe K, Mahakunkijcharoen Y *et al.* The B cell epitope of Paramyosin recognized by a protective monoclonal IgE antibody to *Schistosoma japonicum*. *Vaccine* 1997; **15**: 79–84.
- Espinoza B, Ruiz-Palacios G, Tovar A *et al.* Characterization by enzyme-linked immunosorbent assay of the humoral immune response in patients with neurocysticercosis and its application in immunodiagnosis. *J Clin Microbiol* 1986; **24**: 536–541.
- Wilson MRT, Bryan JA, Fried DA *et al.* Clinical evaluation of the cysticercosis enzyme-linked immunoelectrotransfer blot in patients with neurocysticercosis. *J Infect Dis* 1991; **164**: 1007–1009.
- Landa A, Laclette JP, Nicholson-Weller A, Shoemaker CB. *Taenia solium* Paramyosin (AgB): cDNA cloning and recombinant expression of collagen binding and complement inhibitor activity. *Mol Biochem Parasitol* 1993; **60**: 343–347.
- Mitchell GF. In *Cysticercosis: Present State of Knowledge and Perspectives*, eds Laclette JP, Larralde C, Ridaura C, Beltrán F. New York: Academic Press; 1982; 575–584.
- Sciutto E, Frago G, Diaz ML *et al.* Murine *Taenia crassiceps* cysticercosis: H-2 complex and sex influence on susceptibility. *Parasitol Res* 1991; **77**: 243–246.
- Correa-Oliveira R, Pearce EJ, Oliveira GC *et al.* The human immune response to defined immunogens of *Schistosoma mansoni*: elevated antibody levels to paramyosin in stool-negative individuals from two endemic areas in Brazil. *Trans Royal Soc Trop Med Hygiene* 1989; **83**: 798–804.
- Hernandez MG, Hafalla JC, Acosta LP *et al.* Paramyosin is a major target of the human IgA response against *Schistosoma japonicum*. *Parasite Immunol* 1999; **21**: 641–647.

ANEXO 7

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

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

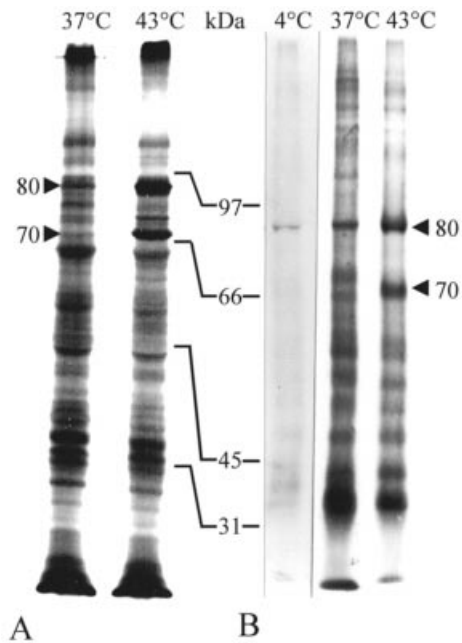


Fig. 1. Autoradiogram showing SDS-PAGE profile of protein synthesis of *Taenia solium* (A) and *T. crassiceps* (B) cysticerci. Parasites were metabolically labelled *in vitro* with [³⁵S]methionine for 4 h at the indicated temperatures, with the exception of the 4 °C lane, which was labelled for 24 h.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

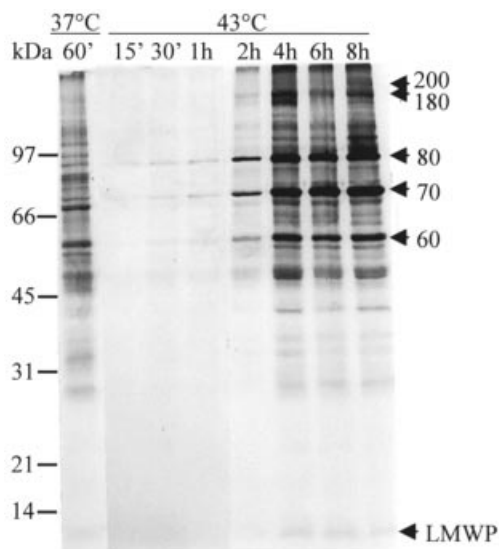


Fig. 2. Kinetics of protein synthesis in *Taenia crassiceps* cysticerci in response to heat shock. After treatment at 43 °C during the indicated time, the cysts were transferred to 37 °C and metabolically labelled *in vitro* with [³⁵S]methionine for 2 h. Control parasites were maintained at 37 °C which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

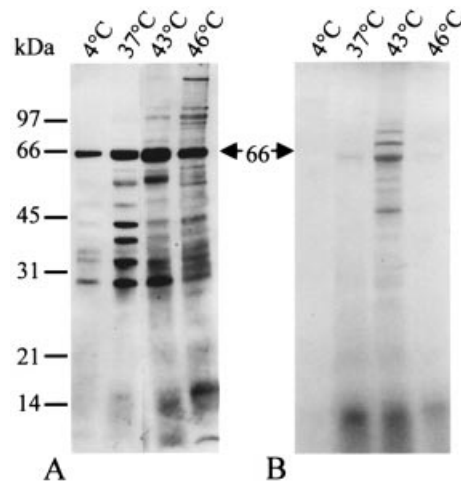


Fig. 3. Excretory-secretory products of *Taenia solium* cysticerci exposed to temperature stress. The cysts were incubated at the indicated temperatures and metabolically labelled with [³⁵S]methionine, overnight. (A) SDS-PAGE profile of the culture medium containing the excretory-secretory products using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

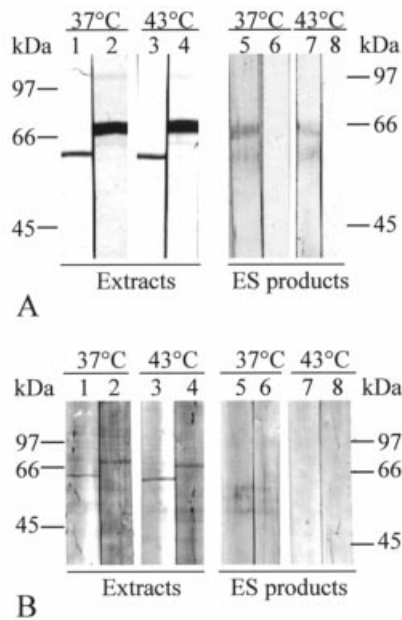


Fig. 4. Antibody recognition of HSP60 and HSP70 in crude extracts and excreted–secreted (ES) products of *Taenia solium* (A) or *T. crassiceps* (B) cysticerci. Lanes 1, 3, 5 and 7 were probed with rabbit polyclonal anti-HSP60. Lanes 2, 4, 6 and 8 were probed with anti-HSP70 mAb.

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

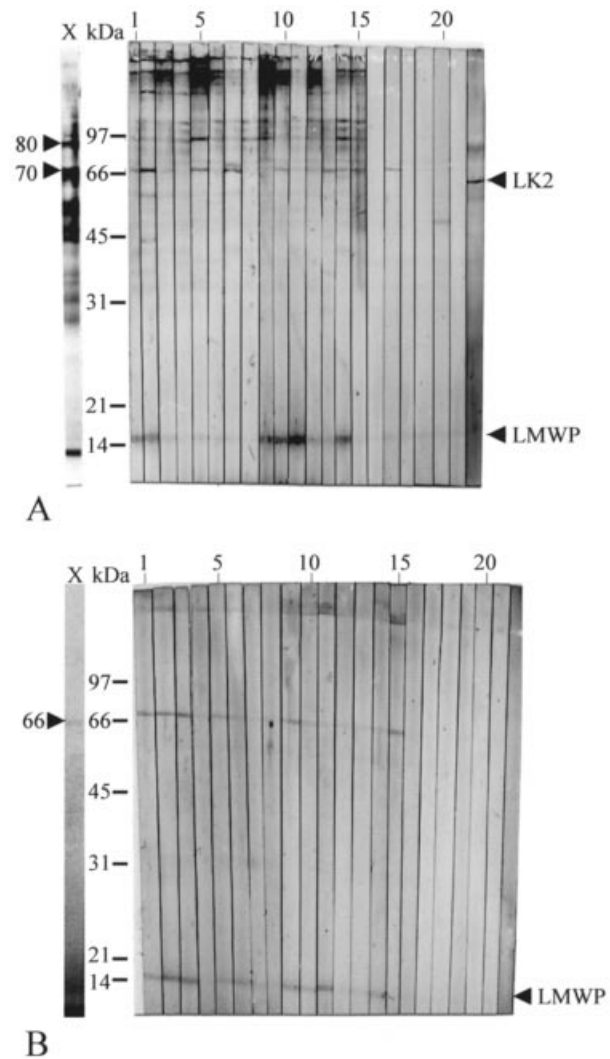


Fig. 5. Western blots of crude extracts and excreted–secreted products of *Taenia solium* cysticerci probed with sera from neurocysticercotic patients. Cysticerci were metabolically labelled with [³⁵S]methionine, at 43 °C, overnight. Crude extracts (A) and excreted–secreted products (B), were reacted 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.

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 *Mesocostoides 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 DGEP-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 *Mesocostoides 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., GEORGIOPOULOS, 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., FRISCH, P., CASTRO, A., APFEL, H., MULLER, A. & FROSCHE, 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., LEMUS, 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. & GEORGIOPOULOS, C. (1991). The universally conserved GroE (Hsp60) chaperonins. *Annual Review of Microbiology* **45**, 301–325.

ANEXO 8

Epitope mapping on N-terminal region of *Taenia solium* paramyosin

Karlen G. Gazarian^{a,*}, Tatiana G. Gazarian^{a,c}, Carlos F. Solís^b,
Ricardo Hernández^a, Charles B. Shoemaker^d, Juan Pedro Laclette^b

^a Department of Biotechnology, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Aportado Postal 70228, Ciudad Universitaria 04510 Mexico D.F., Mexico

^b Department of Immunology, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Aportado Postal 70228, Ciudad Universitaria 04510 Mexico D.F., Mexico

^c Department of Public Health, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico D.F., Mexico

^d Department of Immunology, and Infectious Diseases, Harvard School of Public Health, Boston, MA, USA

Accepted 10 March 2000

Abstract

Epitope mapping of the amino-terminal 20aa sequence from *Taenia solium* paramyosin (TPmy), an immunodominant protein involved in the complex host–parasite relationship in human and porcine cysticercosis is reported. A 12-mer random peptide phage display library was screened with antibodies raised against a synthetic peptide corresponding to the amino-terminal 20aa sequence of TPmy, its highly immunodominant region. In total, 57 clones isolated in two panning conditions were analyzed, of which a single group of 14 sequences found in 25 clones shared a consensus motif showing structural similarity with the antigen Arg10-Thr16 region. © 2000 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: *Taenia solium*; Paramyosin; Epitope; Phage display

1. Introduction

Paramyosins of *Schistosoma* species, *S. mansoni* [1,2], *S. japonicum* [3], and their homologue in *Taenia solium* [4], also known as Antigen B (AgB) [5,6], are immunodominant proteins involved in these complex host–parasite relationships. In challenge experiments on laboratory models, paramyosins proved to be promising vaccination candidates [1–6]. They also exhibit properties indicating their immunomodulatory role [7], in particular, impaired augmentation of the host inflammatory response through the inhibition of the classical pathway of the complement cascade [8]. Thus, proteins or their fragments used as antigens may contain both immunodominant and immunosuppres-

sive factors. Optimized vaccines against these persisting parasites should be based on individually characterized immunodominant epitopes or epitope combinations derived from immunodominant antigens like paramyosins.

Although several epitopes have been mapped in schistosoma paramyosins, some of them having homologues in *T. solium* paramyosin (TPmy) [9], none of these epitopes have been mapped directly. In this study a phage display approach was used [10] for mapping TPmy epitopes at the N-terminal region, that is highly immunodominant in this molecule. TPmy is a 100 kDa (863aa) α -helical coiled coil protein with short linear structures at both ends. In order to introduce a limited number of antibody specificities into the reaction with phage library, a described strategy is followed [11] and antiserum raised against a relatively short (20aa) synthetic peptide corresponding to the highly immunogenic amino-terminal region of TPmy was used.

* Corresponding author. Tel.: +52-5-6223821; fax: +52-5-6223855.

E-mail address: karlen@servidor.unam.mx (K.G. Gazarian)

2. Materials and methods

2.1. Rabbit antiserum and IgG fraction

Rabbit hyperimmune serum (AS-TPmy-pep) against a synthetic peptide (TPmy-pep) corresponding to the aa1–20 of *T. solium* paramyosin (MSESHVKISRTHIR-GTSPST) was produced following the procedure described by Zhong et al. [12] and kept in aliquots stored at -20°C . The anti-TPmy reactivity was determined in ELISA using serial dilutions of the antiserum and recombinant N-terminal 208aa fragment of the TPmy (designated VW2-1), as an antigen. Bound Ab was detected by incubation (30 min, 37°C) with alkaline phosphatase-goat anti-rabbit IgG (H + L) conjugate (Zymed Labs, San Francisco, CA) diluted 1:10 000, and the chromogen (paranitrophenol/diethylamine).

The computer antigenicity analysis was performed by Alpha Diagnostic International (San Antonio, TX)

The recombinant TPmy amino-terminal 208aa fragment VW2-1 the internal fragment VW3-3 lacking N-terminal 200aa were produced in an *Escherichia coli* expression system using the pRSET vector (Invitrogen, San Diego, CA). A cDNA PCR amplification product corresponding to the N-terminal 804 bp sequence of TPmy gene was cloned in the appropriate reading frame into the pRSET vector. The recombinant protein was expressed as a fusion product containing a 6 His tag used for high affinity chromatography purification.

IgG fraction containing induced anti-peptide antibodies was purified from the antiserum (AS-TPmy-pep) by affinity chromatography using Protein G. A 3 ml column (Poly Prep, Bio Rad) was packed with 1 ml of Protein G Agarose (Life Technologies, USA) and used for the IgG purification following the manufacturer's instructions. Briefly, the column was equilibrated with 10 volumes of binding buffer (0.01 M sodium phosphate, pH 7.0, 0.15 M sodium chloride), loaded with 2 ml of clarified (by centrifugation at $3000 \times g$) AS-TPmy-pep antiserum, washed with 10 bed volumes of binding buffer (controlling the absorbance at A_{280}), IgG fraction was eluted with 6 bed volumes of 0.1 M glycine HCl, pH 2.6, followed by immediate neutralization of the eluate with 1.0 M Tris base. The eluted fraction (1 ml) containing highest anti-TPmy titer was used in panning experiments.

2.2. Phage display library

A 12mer peptide library (Ph.D.-12TM, New England BioLabs, Beverly, MA) was used in which random peptides are fused to a minor coat protein (pIII) of M13 phage and expressed at the N-terminus of pIII followed by Gly-Gly-Gly-Ser spacer. The library consisted of approximately 1.9×10^9 electroporated se-

quences, amplified once to yield about 20 copies of each sequence in aliquot used for the panning.

2.3. Biopanning procedure

For the selection of phage recognized by the rabbit anti-peptide antibodies the biopanning technique [13,14] was used under two conditions: one with the antibody immobilized on plastic surfaces and the other in solution. In the first of them, the AS-TPmy-pep antiserum, diluted 1:50 in PBS to give a final volume 300 μl , was distributed in 6 wells (50 μl /well) of 96-well flat bottom polystyrene microtitration plates (Immulon 4, Dynatech Lab, Chantilly, VI) and incubated overnight at 4°C with gentle rocking. After extensive washing with PBS-T (PBS-0.5% Tween 20) and blocking (PBS-1% BSA, 1 h, 37°C), the wells were washed with PBS-T and filled with Ph.D.-12 peptide library. A library aliquot containing 2×10^{10} p.f.u. was diluted to 600 μl with PBS-0.1% BSA to 600 μl and distributed in 6 wells (100 μl /well) of the antibody coated plate. After incubation for 2 h at 4°C with gentle shaking, the wells were washed 5 times with PBS-T at $0-4^{\circ}\text{C}$, filled with blocking buffer 2 (PBS-0.1% BSA), incubated for 30 min at 4°C rocking gently and washed 5 times with PBS-T at $0-4^{\circ}\text{C}$. Bound phage were eluted from each well by stirring with 100 μl of elution buffer (0.1 M glycine-HCl, pH 2.2). Eluted phage from six wells were combined and immediately neutralized with 2 M Tris solution (pH not adjusted). The phage particles were quantified by titring on log-phase *E. coli* ER2537 (New England BioLabs, USA) and amplified by standard procedure. The selected and amplified phage (about 10^{13} p.f.u. ml^{-1}) of the first round were used for second, third and fourth rounds of selection with lower amounts of the antiserum, namely, 1:50, 1:200 and 1:200 dilutions, respectively.

For the solution panning a protocol recommended by BioLabs (New England, USA) based on the affinity capture of the antibody-phage complexes onto protein G-agarose beads, with slight modifications was used. A total of 300 ng of purified IgG fraction were mixed with the library (2×10^{10} phage virions) and incubated 20 min at room temperature. Then 50 μl of protein G-Agarose suspension (Gibco BRL) were added and the incubation was continued 15 min at the same temperature. The incubation mixture was centrifuged (30 s, $3000 \times g$), supernatant discarded and the pellet washed 10 times with PBS-T. The final pellet was resuspended in 1 ml of glycine-HCl, pH 2.2 and after 10 min incubation at room temperature the eluate was collected after centrifugation (30 s, $3000 \times g$). The phage were titered, amplified and the selection was repeated two more times, first with 100 ng and then with 30 ng of IgG except for the third round where phage were eluted in two steps, first at pH 4.0 and then at pH 2.2.

2.4. Isolation and analysis of clones

One- μ l samples of the final eluted phage were plated and individual clones were picked randomly, amplified and used for immunoassay and extraction of single-stranded DNA. The N-terminal region of the gp3 gene with the inserted peptide-coding oligonucleotide was sequenced by di-deoxynucleotide method [15]. S^{35} -labelled dNTP (Amersham), 28-bp primer and the T7 sequenase (Amersham) were used. The amino acid sequence of peptides was deduced from the nucleotide sequence. The reactivity of isolated clones was determined in ELISA. For immunoassay, phage was precipitated with 0.1 M acetic acid [13]. Microtitration wells (Nunc-Immuno Plate, MaxiSorp F96, NUNC Brand Products, Roskilde, Denmark) were coated by overnight incubation (4°C) of phage suspension (100 μ l, 10^9 – 10^{10} p.f.u. in PBS–BSA, 50 ng/well), washed with PBS–0.3% Tween 20, and immobilized phage were incubated with antiserum or IgG fraction in PBS–0.2% Tween–0.2% BSA at 37°C for 1 h. The wells were washed and bound Ab was detected as described above. A phage amplified from unselected library, or TBS, were included as negative controls, and recombinant N-terminal TPmy (VW2-1) fragment, as positive.

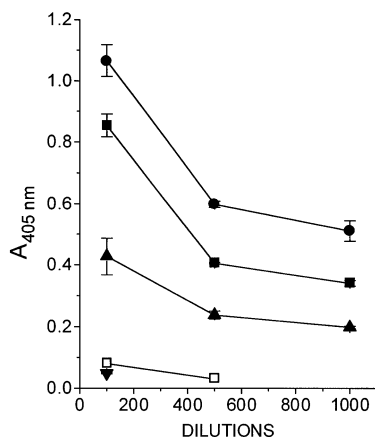


Fig. 1. ELISA-titration of the rabbit anti-*Taenia solium* paramyosin (TPmy)-pep serum and its purified IgG fraction. Recombinant amino-terminal 208aa fragment of *T. solium* paramyosin (VW2-1) or the recombinant internal 200aa fragment of paramyosin (VW3-3) were immobilized on microtitration plates by overnight incubation (50 ng/well in sodium carbonate buffer, pH 9.8), washed with PBS containing 0.3% Tween 20, blocked with PBS supplemented with 1% BSA, washed and allowed to react with indicated dilutions (abscissa) of either the antiserum against TPmy-pep (■) or of 1 ml elution fraction of IgG containing highest anti-TPmy titer (▲). Controls: (1) wells were coated with VW2-1 fragment and incubated either with mouse serum against the same TPmy fragment VW2-1 (●) or with serum from a non-immunized rabbit (▼); (2) wells coated with recombinant internal fragment of TPmy (VW3-3) were incubated with anti-TPmy-pep antiserum (□). Bound Ab was detected by incubation (30 min, 37°C) with alkaline phosphatase-goat anti-rabbit IgG (H + L) conjugate and the chromogen as described in Section 2.

Peptides carrying sequence homology with

aa10-aa16 region of TPmy

Group	No.	Sequence			Exper. Round	
		1	10	20		
1	1	<u>SLS</u>	<u>RMPII GT</u>	SA (4)	2	3
	2	DI	<u>RQPII GT</u>	LHP	-	"
	3	HIA	<u>RTPIA GT</u>	NL	-	"
	4	<u>FPN</u>	<u>RTFIS GT</u>	TW	-	"
	5	H	<u>RVPIS GT</u>	SA	-	"
	6	SY	<u>RTFIT GT</u>	LIT (2)	1	4
	7	F	<u>RTAIS GT</u>	PQFY (6)	-	"
2	8	HSHTHKALA	<u>GT</u>	<u>P</u>	-	"
	9	LVAKPHM	<u>RT</u>	<u>PNL</u>	-	"
	10	WHWQYTPWW	<u>R</u>	<u>GS</u>	-	"
3	11	LEP	<u>TLI R</u>	LPQTL	2	3
	12	AWTH	<u>TLI R</u>	LPD (2)	-	"
	13	NEM	<u>TLI R</u>	MNMAA (2)	-	"
	14	MKETHS	<u>TL</u>	HQP	-	"

Fig. 2. Peptide sequences found in samples of phage selected on panning of the 12-mer library in solid-phase (Exp.1) and in solution (Exp.2). Twenty five phage clones bearing 14 different peptide sequences homologous to aa10–16 region of *Taenia solium* paramyosin (TPmy) are numerated in accordance with their homology with the antigen (No. = peptide sequence number). The remaining 33 analyzed clones carried 24 different peptides with no sequence homology (not included). Figures in parentheses indicate the occurrence of given sequence among analyzed peptides more than once. Common motifs are underlined.

3. Results and discussion

3.1. Sequence characteristics of selected peptides and mapping the epitope that they mimic

Both the anti-serum obtained with synthetic 20aa peptide and its purified IgG fraction used for selecting peptides from the 12mer phage library contained sufficiently high Ab titers recognizing the TPmy (Fig. 1). At first, two series of panning experiments with immobilized antiserum were performed. The sequencing of peptides from the fourth round eluate (24 phage clones displaying 18 different 12aa sequences) revealed that some of them carry common amino acids at similar positions (Fig. 2, Exp. 1). Eight clones presented two sequences with internal **RT-I-GT** motif and three peptides contained only a part of this motif: **RT** or **GT/S**, or **T-RGS**. Comparison with the amino-terminal 20aa sequence of the TPmy highlighted the **Arg10-Thr16** region of apparent homology to the motif shared by two of these peptides and partially by three of them (Fig. 2). To strengthen further this finding, the selection was repeated with three introduced modifications:

purified IgG, solution-panning and two-step elution (see Section 2). This resulted in a better yield of peptides homologous to the revealed N-terminal TPmy region. This was in part due to an enrichment of the final (pH 2.2) phage population in reactive clones achieved by the pre-elution with glycine buffer, pH 4.0 (Fig. 3). In total, about 45% of all clones analyzed in two experiments, solid-phase and solution-phase, were found to express peptide inserts containing the **RT-I-GT** motif with some variations. Based on their similarity, the obtained sequences could be categorized into three groups (Fig. 2), those containing the motif with minimal differences (group 1) and those containing variations where the peptides albeit homologous to the motif, lacked some of its significant parts (groups 2 and 3).

In group 1 peptides, six sequences displayed by 16 phage clones exhibited highest degree of structural mimicry of the antigen by reproducing its **Arg10-Thr11-Ile12-Ile13-Gly15-Thr16** structure in which **Thr11** could be substituted in peptides by **Met**, **Gln** or **Val** and the **Ile13** by **Ala**, **Ser** or **Thr** (i.e. mostly conservative replacements).

The group 2 peptides presented substantially reduced and modified variants of the group 1 peptide motif. They lacked proline between **Thr** and **Ile** but some of them contained **Pro** residue C-terminal to the **GT** dinucleotide. The most essential difference between group 1 and group 3 was that the latter lacked glycine that seemed to be non-replaceable, and carry arginine at its

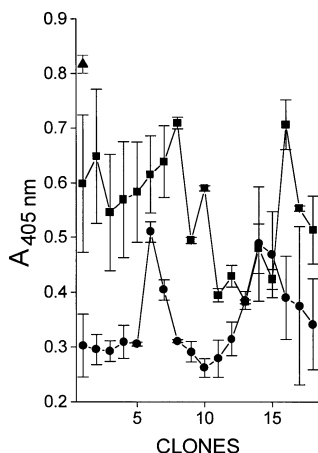


Fig. 3. Immune reactivity determined in ELISA of clones eluted with glycine-HCl, pH 4.0 and pH 2.2. Individual plaques grown after plating of final eluates were picked randomly and amplified, the wells of microtitration plates were coated with 100 μ l of phage suspension containing 10^9 – 10^{10} p.f.u. in PBS-BSA, 50 ng/well, then washed with PBS containing 0.3% Tween 20. Immobilized phage were incubated at 37°C for 1 h with rabbit anti-*Taenia solium* paramyosin (TPmy)-pep serum diluted 1:500 with PBS-0.2% Tween 20-0.2% BSA. Bound antibody was detected as described in Fig. 1. The data from duplicate wells are given. ■, phage pre-eluted with glycine-HCl, pH 4.0; ●, phage finally eluted with glycine-HCl, pH 2.2; ▲, control antigen: recombinant TPmy N-terminal fragment (VW2-1).

C-terminal, not at N-terminal end, as other peptides. Despite these differences, the consensus motif of the group 3, **TLIR**, reflects well the internal part of the putative epitope, **TIIR**, with the first **Ile** substituted by **Leu** in all peptides.

Thus, as a result of the selection in two independent panning conditions, the aa10–16 region of TPmy was found to be perfectly mimicked by the consensus sequence **R(T/M/G/V)I(I/A/S/T)GT** of the peptides included into group 1. Peptides of the groups 2 and 3 present confirmative evidence for this conclusion. Two notable differences were found between this consensus sequence and its mimetized TPmy region. Firstly, only one of the two arginines of TPmy (**Arg10** and **Arg14**) was found in all peptides. This fact seems to indicate that only one hydrophilic residue of this TPmy region, i.e. **Arg10**, is the epitope participant. In this context, the C-terminal location of the arginine in **TIIR** motif of the group 3 peptides may be explained by suggesting that it is an inverted version of the epitope core region (the direct sequence being **RIIT**).

Secondly, seven out of eight peptides of the group 1 contained proline in the third position of their consensus motif (i.e. before the isoleucine corresponding to **Ile12** of TPmy), while no proline is contained in the aa10–16 region of TPmy. Although proline is not a residue in this antigen region, there is a proline at position 18, which could be a reason for its frequent occurrence in peptide mimetics. Indeed, besides the above mentioned proline found within the group 1 common motif (3rd position), most of the peptides of the groups 2 and 3, lacking this proline, carried a proline in their C-terminal regions (positions 10–12, see Fig. 2), confirming its importance for the selected peptides. It was suggested that proline 18 is an element of the putative epitope but its location in selected peptides does not correlate with its position in the antigen, a property characteristic of all other residues in peptides mimicking those in the TPmy aa10–16 region.

The above analysis seems to provide sufficient structural information for mapping in the TPmy **Arg10** to **Thr16** (or to **Pro18**) region the epitope specific to Ab(s) that selected the described peptides. The mapped epitope is a linear structure containing a hydrophilic N-terminus (arginine 10) followed by a hydrophobic stretch.

Linear epitopes are thought to be rare or even non-existent in proteins [16,17]. However, antibodies are capable of selecting peptide mimetics containing only linear parts of discontinuous epitopes [18,19]. The revealed region of TPmy homologous to selected peptides may also represent linear part of a discontinuous epitope. It seems unlikely that one omitted some of its elements in the aa1–9 part of TPmy, but such unrevealed components may be C-terminal to the mapped region.

By using 20aa synthetic peptide as an immunogen, among 57 analyzed phage clones only one selected consensus motif resembling an antigenic region was found. The result is qualitatively consistent with that reported by Dybwad et al. [11] who immunized rabbits with 17aa peptide embodying an Ig epitope and also found in selected peptides only one sequence motif homologous to the antigen. The sufficiently high efficacy of consensus motif recovery demonstrated by this approach encourages its further utilization for epitope mapping directed to the immunologically important antigen regions.

Further characterization of the identified epitope requires more complete molecular description and elucidation of its involvement in antibody production. Computer antigenicity analysis of the TPmy N-terminal 150aa sequence shows on hydrophilicity and accessibility protein profiles, among others, distinct peaks upward the aa10–20 sequence, indicating that this region may have structural properties characteristic of immunodominant determinants (in preparation).

For the functional analysis sera of infected pigs, cerebrospinal fluid (CSF) from neurocysticercosis patients (CSF is enriched in parasite specific antibodies [20]), and mouse antiserum against amino terminal 208 fragment of TPmy (VW2-1) were tested. ELISA failed to detect a reactivity of pig sera and CSF with phage clones. Two of them, No.1 (from group 1) and No.3 (group 2) showed a reactivity with antiserum against the N-terminal TPmy fragment (result not shown). The negative result with host fluids may have several explanations including the absence of the antibody at investigated infection phases or insufficient sensitivity of the assay.

Acknowledgements

Authors thank Edda Scitutto for sera of experimentally infected pigs and Esperanza García-Mendoza for CSF of patients with neurocysticercosis. The technical assistance of Karla Tellez and of Oscar Ramirez is acknowledged. This work was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México (25166IN) and in part by Dirección General de Asuntos de Per-

sonal Académica–Universidad Nacional Autónoma de México (IN24797).

References

- [1] E.J. Pearce, S.L. James, S. Hieny, D.E. Lanar, A. Sher, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 85 (1988) 5678–5682.
- [2] T.P. Flanigan, C.H. King, R.R. Lett, J. Nanduri, A.A.F. Mahmoud, *J. Clin. Invest.* 83 (1989) 1010–1014.
- [3] T. Nara, N. Matsumoto, T. Janecharut, H. Matsuda, K. Yamamoto, T. Irimura, K. Nakamura, M. Aikawa, I. Oswald, A. Sher, K. Kita, S. Kojima, *Intern. Immunol.* 6 (1994) 963–971.
- [4] J.P. Lacleste, A. Landa, L. Arcos, K. Willms, A.E. Davies, C.B. Shoemaker, *Mol. Biochem. Parasitol.* 44 (1991) 287–296.
- [5] A. Flisser, E. Woodhouse, C. Larralde, *Clin. Exp. Immunol.* 39 (1980) 27–37.
- [6] G. Guerra, A. Flisser, L. Cañedo, J.P. Lacleste, in: A. Flisser, K. Willms, J.P. Lacleste, C. Larralde, C. Ridauro, F. Beltrán (Eds.), *Cysticercosis: Present State of Knowledge and Perspectives*, Academic Press, New York, 1982, pp. 437–451.
- [7] J.P. Lacleste, M. Rodriguez, A. Landa, L. Arcos, P. De Alba, R. Mansilla, K. Willms, *Acta Leidensia* 57 (1989) 115–122.
- [8] J.P. Lacleste, C.B. Shoemaker, D. Richter, L. Arcos, N. Pante, C. Cohen, D. Bing, A. Nicholson-Weller, *J. Immunol.* 148 (1992) 124–128.
- [9] T. Nara, K. Tanabe, Y. Mahakunkijcharoen, Y. Osada, N. Matsumoto, K. Kita, S. Kojima, *Vaccine* 15 (1) (1997) 79–84.
- [10] S.F. Parmley, G.P. Smith, *Gene* 73 (1988) 305–318.
- [11] A. Dybwad, B. Bogen, J.B. Natvig, Ø. Forre, M. Sioud, *Clin. Exp. Immunol.* 102 (1995) 438–442.
- [12] C. Zhong, P.J. Skelly, D. Leaffer, R.G. Cohn, J.P. Caulfield, C.B. Shoemaker, *Parasitology* 110 (1995) 383–394.
- [13] G.P. Smith, J.K. Scott, *Methods Enzymol.* 217 (1993) 228–257.
- [14] W.J. Dower, S.E. Cwirla, in: G.B. Wisdom (Ed.), *Peptide Antigens. A Practical Approach*, IRL Press, Oxford University Press, New York, 1994, pp. 219–243.
- [15] J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989.
- [16] H.M. Geysen, S.J. Rodda, T.J. Mason, *Mol. Immunol.* 23 (7) (1986) 709–715.
- [17] J. Novotny, J. Bajorath, in: E. Haber (Ed.), *Advances in Protein Chemistry. Antigen Binding Molecules. Antibodies and T-cell Receptors*, vol. 49, Academic Press, New York, 1996, pp. 150–260.
- [18] J. Beattie, J.H. Shand, D.J. Flint, *Eur. J. Biochem.* 239 (1996) 479–486.
- [19] R. Orlandi, C. Formantici, S. Menard, C.M. Boyer, J.R. Wiener, M. Colnaghi, *Biol. Chem.* 378 (11) (1997) 1387–1392.
- [20] G. Ordoñez, M.T. Medina, J. Sotelo, *Neurol. Infect. Epidemiol.* 1 (1996) 57–61.