

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

RESPUESTA INMUNE MURINA HACIA LA INMUNIZACIÓN GENICA CON EL
ANTIGENO TSOL18 DE *Taenia solium*

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

ADRIAN RODRÍGUEZ DIAZ

MÉXICO, D. F.

2006



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.

Jurado asignado:

Presidente Prof. MARIA DOLORES LASTRA AZPILICUETA

Vocal Prof. ABEL GUTIÉRREZ RAMOS

Secretario Prof. PEDRO ULISES GPE OSTOA SALOMA

1er. Suplente Prof. MARTHA PATRICIA COELLO COUTIÑO

2°. Suplente Prof. BERTHA ESPINOZA GUTIERREZ

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

Dr. Pedro Ulises Gpe Ostoa Saloma

Adrián Rodríguez Díaz

DEDICATORIA

A mi mamá:

Gracias por regalarme la vida, por guiarme a la felicidad con los consejos, las palabras y las actitudes que son únicas de tí, Dios te bendiga...te quiero mucho.

A mi papá:

Por brindarme ese respaldo y esa confianza, por ayudarme a crecer como ser humano y como profesionista, te agradezco infinitamente por formar una familia.

A Mariana:

Por la alegría de verte crecer, por el profundo cariño que te tengo y por la suerte de tener un apoyo familiar.

A Daniel:

Gracias hermano por recordarme que siempre hay un niño dentro de nosotros, por dejarme ser tu amigo y sobretodo por la alegría de vivir contigo.

A Andrés:

La vida toma otro matíz con tu presencia, nos da la fuerza para vivir y saber que lo divino existe entre nosotros.

AGRADECIMIENTOS

A mis abuelos que dieron la pauta de nuestras vidas y a cada uno de mis tíos, tías, primos y primas que me han enseñado como vivir como un ser humano.

A mis amigos César, Jose Luis, Ricardo y Sharon que me han abierto las puertas de sus hogares, por compartir una amistad pura y agradecer a sus familias por permitirme entrar a sus hogares.

A mis primos Lalo, Ruben y Joaquin por compartir tantas vivencias que nos llevaron a ser los mejores primos y, por supuesto, por ayudarme a imprimir este trabajo.

A mis amigos Armando, Job, Tolo, Jaqueline, Raquel, Paola, Jennifer, Luis Fernando, Christian, Ivan, Luz, Fernando, Oscar, Edwin, Cynthia, Nallely, Adriana, Fabián, Angel, Saúl, Daniela, Lolita, Lulú, Moles, Yunatzi, Maria Luisa, Maria de la Paz, Urzua, Gerardo y muchos más que me faltaron por compartir todos esos momentos únicos.

Al Dr. Pedro Ostoa por ayudarme a concluir con este trabajo, además de haber encontrado en él a un excelente amigo y una excelente persona.

A los integrantes del laboratorio, Abril, Carlos, César, Claudia, Hugo, Juan Pedro, Julio, María, Martín, Miriam, Paty y la señora Prima por ser parte de mi tesis y por brindarme su amistad.

A cada uno de mis profesores, sus enseñanzas y conocimientos lograron que ame lo que hago.

A mi querida casa de estudios, mi gloriosa Universidad Nacional Autónoma de México que mas allá de la formación académica me ha enseñado una forma de vida.

A la Facultad de Química por ser mi casa mucho tiempo, por formarme y por enseñarme a luchar hasta el último por nuestros objetivos.

Al Instituto de Investigaciones Biomédicas por permitirme desarrollar un trabajo de tesis tan importante para la investigación.

INDICE

LISTA DE ABREVIATURAS.....	1
I. INTRODUCCIÓN.....	2
1.1 La teniosis y la cisticercosis	2
1.2 Epidemiología.....	4
1.3 Ciclo biológico de la Taenia solium.....	6
1.4 Prevención contra la cisticercosis y la teniosis.....	9
1.5 Mecanismos inmunológicos de la protección en contra de la cisticercosis..	10
1.6 Desarrollo de una vacuna.....	12
1.7 Inmunización génica.....	15
II. HIPOTESIS.....	18
III. OBJETIVOS.....	19
IV. MATERIALES Y METODOS.....	20
4.1 Construcción de genes sintéticos.....	20
4.2 Construcción del plásmido para inmunización génica.....	21
4.3 Transformación de bacterias.....	23
4.4 Purificación del vector pCMV-TSOL18.....	24
4.5 Preparación de balas para inmunización con la técnica del gene gun.....	25
4.6 Esquema de inmunización murina.....	26

4.7 Sangrado de ratones.....	26
4.8 ELISA.....	27
4.9 Producción de las proteínas recTSOL18 y recTsol18s.....	27
4.10 Cuantificación de la proteína.....	30
4.11 Electroforesis de proteínas en gel de acrilamida.....	30
4.12 Wertern Blot.....	30
V. RESULTADOS.....	32
VI. DISCUSION.....	41
VII. CONCLUSIONES.....	44
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	45

I. INTRODUCCIÓN

1.1 La teniosis y la cisticercosis

Ambas enfermedades son un serio problema de salud pública en países de África, Asia y Latinoamérica[1,2]. La cisticercosis representa una causa importante de pérdidas económicas en la industria de alimentos elaborados con carne de cerdo, y, en otra de sus variantes que es la neurocisticercosis, es la enfermedad neurológica más importante causada por un parásito[3]. Genera una morbilidad considerable y, en las zonas donde *Taenia solium* es endémica, se sabe que es una de las principales causas de epilepsia, que tiene graves consecuencias sociales, físicas y psicológicas. Un estudio realizado en la India meridional asoció la presencia de cisticercosis del sistema nervioso central a epilepsia sintomática relacionada con localizaciones en el 51% de los pacientes.

La cisticercosis es una enfermedad que resulta de la ingestión de huevos provenientes del gusano adulto de *Taenia solium*. Tanto el humano como el cerdo pueden desarrollar esta enfermedad, caracterizándose por el establecimiento de la forma larvaria en diferentes órganos y tejidos del huésped.

El huésped puede reaccionar de manera diferente al entrar en contacto con el parásito debido a las diversas zonas en las cuales se aloja el parásito, lo cual deriva en una tarea difícil para encontrar una sintomatología definida.

La prueba concreta para hacer un diagnóstico sobre la presencia del parásito es mediante una biopsia, siempre y cuando se localice en músculo o en la región subcutánea. Mientras que en

la región cerebral se pueden realizar radiografías para identificar cisticercos calcificados, así como tomografías o resonancia magnética nuclear que identifican parásitos vivos y calcificados. Otra forma de detección es la serología, buscando anticuerpos en contra de los diversos antígenos parasitarios o identificando anticuerpos específicos en suero o líquido cefalorraquídeo, por medio de hemaglutinación o ELISA[4,5].

Los síntomas de la cisticercosis varían considerablemente, aunque se agudizan en casos de neurocisticercosis provocando hipertensión endocraneal, cefalalgia y desórdenes mentales. También existen la cisticercosis ocular y subcutánea que llegan a ocasionar fiebre y mialgia. Es importante considerar que la respuesta inmunológica se torna aguda a pesar de que en un principio existía un cuadro asintomático, pero también sucede lo contrario, en donde la respuesta inmune se revierte y los síntomas desaparecen por largos periodos de tiempo. Los cisticercos localizados en zonas musculares llegan a pasar desapercibidos pero los que se alojan en la región cerebral pueden llegar a provocar la muerte del huésped[6].

Por otra parte, la cisticercosis porcina presenta infestación principalmente en lengua, cerebro y tejido muscular. La cual se diagnostica por la revisión directa de la lengua o por inspección *post-mortem* de la carne del cerdo. La carga parasitaria en muchos casos llega a ser de un peso significativo con respecto al peso total del cerdo, lo cual deriva en ser una fuente potencial de infección y en pérdidas económicas para esta industria, a pesar de ello existe gran movimiento clandestino de estos animales infectados. También suele ocurrir que durante las inspecciones se eliminen o deshagan a los cerdos infectados pero cuando algún animal presenta una carga parasitaria mínima no son detectados y logran pasar desapercibidos[7].

Estas diferencias se deben a la fuente de la cual provienen ya que los primeros datos provienen del sector salud y los epidemiológicos son tomados en cuenta tanto el sexo como las edades. Además los informes registran entre el 0.2 y 2.4 % de la población con teniosis mientras que el 3.7 y 12.2% presentan anticuerpos contra el cisticerco[10]. Se han registrado importantes cifras de seroprevalencia relacionadas con la enfermedad causada por este parásito, por ejemplo; en Bolivia el porcentaje ha alcanzado un 22% en zonas rurales[11], mientras que Perú registra valores entre el 7.1 y 26.9 %[12]. En cuanto a países africanos encontramos a Mozambique con 20.8 % en niños y para la zona asiática situamos a China, Corea y Vietnam con índices altos de seropositividad que fluctúan entre el 0.02 y 12.6%[13]. Con todo esto nos damos una idea de las dimensiones que puede abarcar la enfermedad causada por este tipo de parásito y que en los últimos años se ha incrementado de manera importante.

La teniosis es la enfermedad provocada por el alojamiento de los gusanos adultos de la familia *Taeniidae* en el intestino del hombre. En el caso del humano la infección se debe a *Taenia solium*. La invasión del gusano adulto generalmente no produce síntomas, aunque en ocasiones se llega a presentar anorexia, dolores abdominales, insomnio y pérdida de peso[14]. Generalmente, el diagnóstico se realiza por la observación de huevos en exámenes coproparasitoscópicos y/o con la detección de proglótidos en tamizados de heces. El gusano puede ser desalojado del intestino de forma espontánea o por acción de medicamentos como la niclosamida o el praziquantel, aunque sigue siendo un foco de infección debido a los huevos contenidos en los segmentos del estróbilo[15].

1.3 Ciclo biológico de la *Taenia solium*

En el grupo de los cestodos de la familia Taeniidae se encuentran un grupo de helmintos que son capaces de parasitar al hombre y a sus animales domésticos para cumplir con su ciclo de vida, estos parásitos requieren tanto del hospedero definitivo como de uno o varios huéspedes intermediarios (FIG 2) .

En el caso de la *Taenia solium* el hombre es el huésped definitivo y el cerdo desempeña el papel de huésped intermediario[8] .

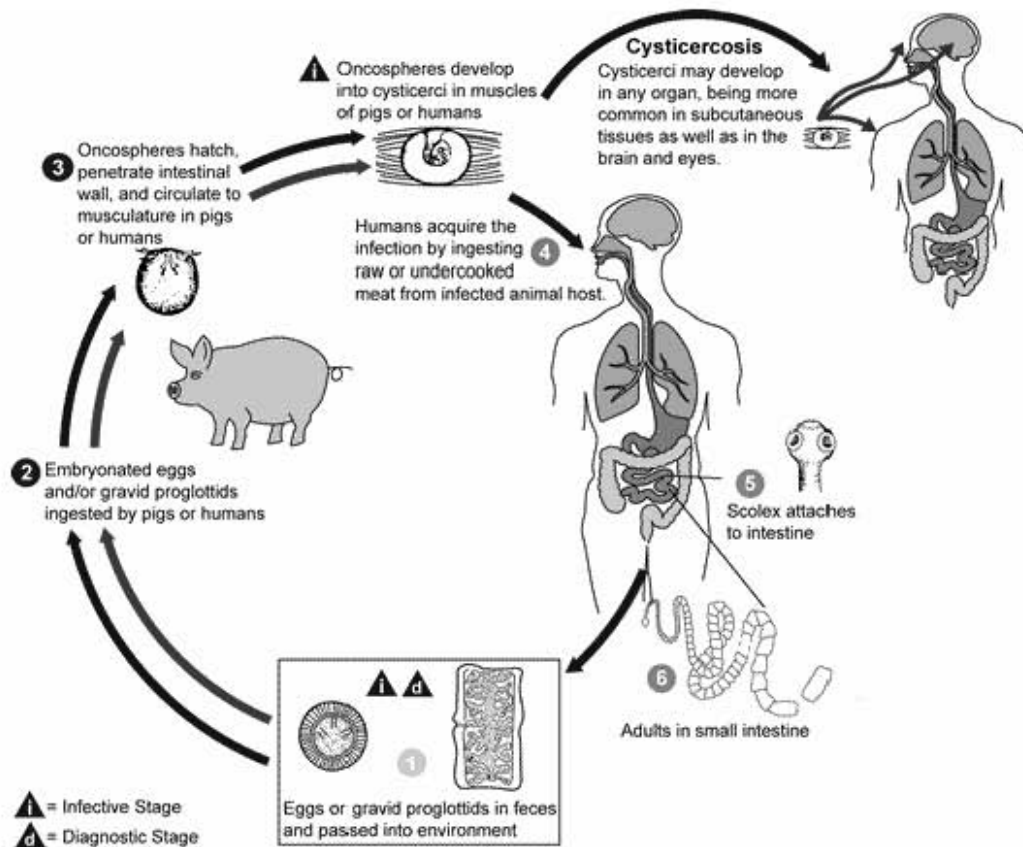


FIG. 2. Ciclo de vida de *Taenia solium*. Los huevos y/o proglótidos contenidos en heces fecales pueden ser ingeridos accidentalmente por el humano o por el cerdo, ambos actúan como huéspedes intermediarios, posteriormente el hombre ingiere carne de cerdo contaminada con cisticercos, los cuales evaginan por acción de las sales biliaris y se ancla en la pared del intestino humano hasta desarrollarse en un gusano adulto, finalmente el ciclo se cierra cuando un teniásico libera al medio ambiente los proglótidos en cuyo interior se encuentran miles de huevos de *Taenia solium*.

La *Taenia solium* adulta es un gusano de color blanquecino que puede llegar a medir mas de 4 metros de longitud (FIG. 3), y que además se aloja en el intestino del huésped definitivo mediante su estructura cefálica denominada escólex, provista de ganchos y ventosas que le permiten fijarse a la pared intestinal, causando la teniosis.

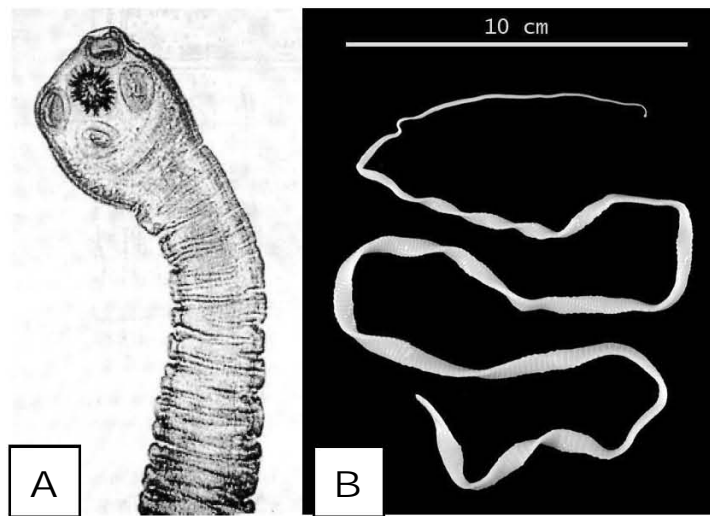


FIG. 3. *Taenia solium*. (A) Escólex de la *Tenia solium* madura, presenta ganchos y 4 ventosas que permiten fijarse al intestino. (B) Gusano adulto de *Taenia solium*, el cual mide varios metros y es de color blanquecino, el escólex se observa en la parte superior de la imagen.

Hacia la parte inferior del escólex se forma el cuerpo del gusano denominado estróbilo, que a su vez se compone de varios proglótidos. A medida que los proglótidos se alejan del escólex presentan un grado mayor de diferenciación, de esta forma encontramos proglótidos maduros en la parte media del gusano que contienen estructuras de reproducción tanto masculinas como femeninas. En la parte final del gusano encontramos los proglótidos grávidos que estan llenos de miles de huevos, los proglótidos gravidos son desprendidos del gusano y junto con las heces son desechados por el huésped teniásico que en este caso es el hombre (FIG 5).

Las heces provocan la descomposición de los proglótidos gravidos, y con esto se liberan los huevos en cuyo interior se localizan las oncosferas hexacanto (FIG. 4). Estas ultimas

estructuras llegan al hospedero intermediario (humano y/o cerdo) por ingestión de las heces, alimentos o agua cargados de huevos.

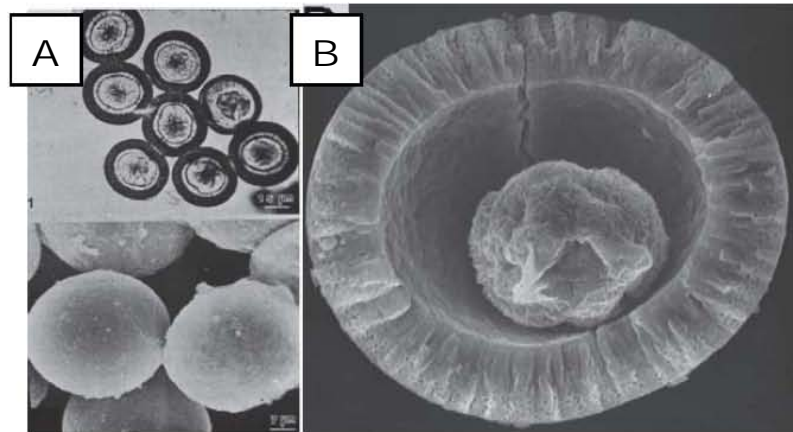


FIG. 4. (A) Huevos de *Taenia solium* vistos mediante microscopia de luz (arriba) o mediante microscopia electrónica (abajo). (B) Micrografía electrónica de barrido de una oncosfera de *Taenia solium* rodeada por el embrióforo.

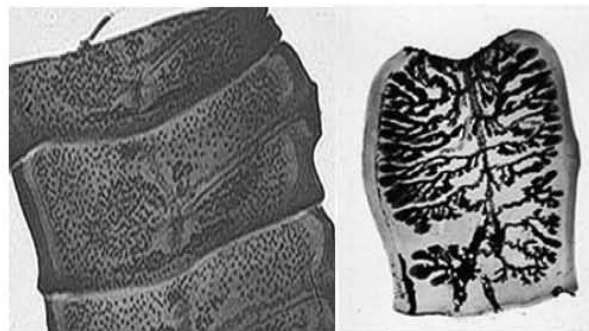


FIG. 5. Sistema reproductor de *Taenia solium*. Los proglótidos maduros (izq.) constituyen unidades de reproducción ya que presentan genitales tanto masculinos como femeninos. Los proglótidos grávidos (der.) se localizan en la región mas alejada con respecto al escólex y presentan un útero ramificado con miles de huevos.

Ya en el interior del huésped intermediario las enzimas proteolíticas y las sales biliares provocan la activación de la oncosfera contenida en el huevo, esta activación provoca la penetración de la pared intestinal hasta los capilares linfáticos y sanguíneos para transportar la oncosfera a órganos y tejidos diversos como son el tejido subcutáneo, músculo esquelético,

ojos y cerebro. Cuando se instala en alguna de estas regiones se desarrolla hasta convertirse en la forma larvaria del parásito o cisticerco (FIG. 6).

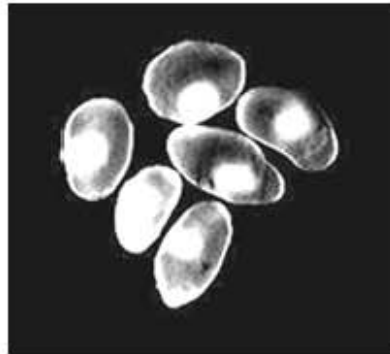


FIG 6. Cisticercos maduros de *Taenia solium*. La región clara es la pequeña larva de tenia y la región más oscura es una vesícula llena de fluido que ayuda a la larva a permanecer viva por cierto tiempo. Los cisticercos maduros pueden medir de 0.5 a 2.5 cm de diámetro.

Entonces el ciclo de vida se cierra cuando el humano ingiere cisticercos viables que se sitúan en la carne de cerdo infectado, logrando su instalación en el intestino delgado después de ser inducido por las sales biliares y las enzimas proteolíticas. En este punto se desarrolla hasta ser el gusano adulto o solitaria.

1.4 Prevención contra la cisticercosis y la teniosis

La teniosis y la cisticercosis causadas por *Taenia solium* representan un problema complejo de salud pública, afectando aspectos sociales y económicos. La interrupción en la transmisión de estas enfermedades requiere una combinación de medidas tanto preventivas como terapéuticas, en donde la educación y la conciencia en zonas rurales deben ser inculcadas en la población, una fuerte inspección en rastros, el manejo adecuado de carne de cerdo infectada, campañas de desparasitación y algunas herramientas como las vacunas pueden ser las vías que logren controlar la infección[16, 17, 18].

Debido al interés que han despertado estas enfermedades en el ámbito mundial, tanto países desarrollados como los países endémicos han optado por desarrollar algunas estrategias en contra del parásito, con el fin de informar a la población sobre este tema[19]. Se ha implementado material didáctico dentro de un sistema multimedia para poder difundir la información, así como la generación de un nuevo protocolo para el tratamiento de teniásicos que consiste en un agente purgativo además de la niclosamida que permita el desalojo total del parásito y con esto los estudios sobre el mismo se puedan incrementar[20]. Incluso algunos reportes mencionan el uso de alguna vacuna que actué en contra de la cisticercosis porcina como una forma de control de la enfermedad[1].

Aspectos inmunológicos han sido considerados en la protección contra este parásito. Actualmente poco se sabe acerca de los mecanismos que involucran la destrucción de este parásito. Sin embargo, existen varias propuestas y teorías estudiadas en modelos experimentales, pacientes y cerdos que pueden guiarnos para conocer y controlar la enfermedad.

1.5 Mecanismos inmunológicos de la protección en contra de la cisticercosis

Actualmente, poco se sabe acerca de los mecanismos que se encuentran involucrados en la protección contra esta enfermedad, sin embargo, existen observaciones y estudios que han dado la pauta para encontrar las soluciones en contra de la cisticercosis. Las propuestas actuales sugieren que la respuesta inmune del humano y del cerdo puede destruir al parásito dependiendo de la etapa de desarrollo que se encuentre. Una propuesta que ha sido muy bien aceptada es el hecho de que la eliminación de las oncosferas, en etapas tempranas de la infección con huevos, estaría mediada por anticuerpos y complemento[21]. Algunas pruebas

en ratas han revelado 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[22], aunque la defensa de anticuerpos y complemento se ha visto disminuida cuando las oncosferas desarrollan microvellosidades[23]. Otros estudios en donde se vacunaron a ovejas con un antígeno recombinante de oncosfera para controlar la cisticercosis producida por *Taenia ovis*, presentaron una disminución de la carga parasitaria posterior al reto con huevos de *Taenia ovis*, y que esta asociada con altos niveles de anticuerpos del tipo IgG1 e IgG2[24], los cuales se sabe de su capacidad para activar complemento. Se ha observado que el parásito puede sobrevivir por largos periodos de tiempo alojado en el huésped cisticercoso, aun y cuando se encuentra rodeado de anticuerpos circulantes de tipo IgG, esto sugiere que la respuesta inmune dada por anticuerpos no trasciende en contra de la fase larvaria del parásito[25]. Además, cabe mencionar que el propio cisticerco presenta mecanismos de evasión en contra de la respuesta inmune del huésped, ya que se han identificado receptores para la región Fc de los anticuerpos en la superficie de la larva que crean un cúmulo de moléculas propias del huésped logrando así la disminución del reconocimiento inmunológico[26]. Otra forma de evasión es la capacidad del parásito para liberar antígenos en la interfase huésped- parásito que desvían o modulan la respuesta inmunológica del huésped[27].

En cambio, se ha descrito que algunas células del sistema inmunitario son capaces de destruir cisticercos o larvas situadas en tejidos del huésped. Algunos autores también han propuesto que los eosinófilos, monocitos, linfocitos, macrófagos y células epiteliales desempeñan un papel importante en la destrucción de cisticercos, siendo los eosinófilos los protagonistas principales del proceso de eliminación parasitaria[28,29]. Observaciones directas en cuanto a la destrucción de la larva, muestran eosinofilia en contra del cisticerco, en donde hay

degranulación por parte de estas células y permitiendo así la infiltración en el tegumento de las larvas. Con referencia a estas publicaciones, se realizaron pruebas en ratones desafiados con huevos de *Taenia saginata* por vía intravenosa, revelando la presencia de macrófagos, linfocitos y algunas células plasmáticas, indicando que posiblemente los eosinófilos no están involucrados directamente en la destrucción de las larvas en etapas tempranas de su desarrollo, sino que su mayor actividad la presentan en etapas tardías como se ha manifestado en el cerdo[30].

Con toda la variedad de experimentos generados a este respecto, se puede seguir investigando los mecanismos inmunológicos que permitan afrontar el problema más a fondo. Ya que hasta ahora las evidencias indican que la respuesta humoral ejerce mayor protección en contra de una infección por huevos, mientras que las células de la respuesta inmune participan en la destrucción de las larvas. De esta forma los resultados más alentadores generan una hipótesis en donde las vacunas a desarrollar contra la cisticercosis puedan contrarrestar tanto los huevos como las larvas.

1.6 Desarrollo de una vacuna

En tiempos actuales varios grupos de investigación han enfocado sus estudios en el desarrollo de una vacuna que permita controlar la cisticercosis causada por *Taenia solium*, para esto se han utilizado extractos crudos del parásito[31], péptidos sintético[32,33], productos recombinantes (proteínas) [34,3] e inmunización génica[35,36]. Debido a los altos niveles de protección en cerdos se ha logrado despertar el interés por seguir desarrollando una vacuna eficaz a mediano plazo. Un buen prospecto es el uso de péptidos sintéticos heterólogos de *Taenia crassiceps* que en ensayos de vacunación disminuyeron en un porcentaje bastante alto la carga parasitaria[37]. En el grupo de investigación donde se ha desarrollado este trabajo

experimental se ha estudiado con gran ahínco un antígeno denominado paramiosina o AgB de *Taenia solium*, presentando niveles de protección entre 40 y 60 %[38]. La oncosfera o estado larvario han mostrado ser una rica fuente de antígenos capaces de generar respuesta inmune en el hospedero intermediario. Sobre estas bases se han clonado antígenos de la oncosfera que protegen del estado larvario, por ejemplo; el antígeno 45W clonado de la oncosfera de *Taenia ovis* ha sido utilizado como vacuna para la prevención de una infección en ovejas. Además se han encontrado otros dos antígenos recombinantes denominados TO16 y TO18 que han mostrado un grado de protección contra la cisticercosis en ovejas. Esto conllevó a tratar de averiguar si existía alguna relación con otros miembros de este tipo de cestodos. Lo que se encontró fue una estrecha homología entre los genes de estos organismos, y de esta forma surgieron antígenos homólogos de TO45W y TO18, designados TSA9 y TSA18, respectivamente, y que han mostrado ser protectores en cisticercosis del ganado vacuno[39,40,41]. Estos trabajos sugirieron que debido al gran parecido biológico de estos cestodos, se podrían realizar experimentos relacionados con *Taenia solium*. En un trabajo de investigación se encontraron niveles de protección semejante entre antígenos crudos de oncosfera de *Taenia solium* comparados con un pool de antígenos de *Taenia ovis*[34]. La idea de analizar los genes y comparar la similitud entre ellos generó la posibilidad de obtener antígenos de la oncosfera de *Taenia solium* para prevenir la cisticercosis en cerdos(FIG. 7), de esta forma se han obtenido una serie de antígenos que han dado resultados alentadores(cuadro 1).

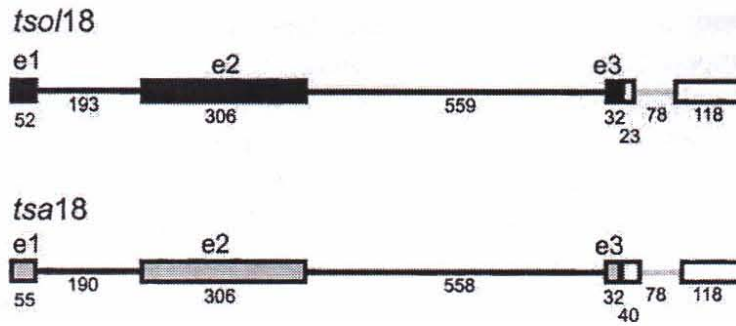


FIG. 7 Representación esquemática de la estructura del gen TSOL18 de *Taenia solium* comparado con la estructura del gen TSA18 de *Taenia saginata*. Ambos genes presentan regiones conservadas como son los 3 exones (barras e1-e3) y dos intrones (líneas horizontales).

Experimentos de vacunación en cerdos controlados e inmunizados con el producto recombinante de oncosfera de *Taenia solium* llamado TSOL18, generan altos niveles de protección, incluso hasta en un 100% contra un desafío oral con huevos de la *Taenia solium*[3]. También se ha encontrado que el antígeno denominado cC1 genera un 100 % de protección en contra de la fase larvaria[35].

Species	Antigen	Homology group a	Protectionb (%)	Reference
<i>Taenia ovis</i>	To45W	45W	94	Johnson et al., 1989
	To45S	45W	87	Lightowlers et al., 1996b
	To16K	16K	92	Harrison et al., 1996
	To18K	18K	99	Harrison et al., 1996
<i>Taenia saginata</i>	TSA-9	45Wc	99	Lightowlers et al., 1996a
	TSA-18	18Kc	99	Lightowlers et al., 1996a
<i>Taenia solium</i>	TSOL18	18K	100	Flisser et al., unpublished
<i>Echinococcus granulosus</i>	EG95	EG95	96	Lightowlers et al., 1996c
			100	Lightowlers et al., 1999
<i>Echinococcus multilocularis</i>	EM95	EG95	83	Gauci et al., 2002

Cuadro 1. Antígenos recombinantes de oncosfera provenientes de céstodos los cuales han mostrado inducir respuesta inmune en los huéspedes. (Tomado de Lightowlers et al)

Los resultados presentados en los reportes arriba mencionados generan grandes esperanzas para desarrollar una vacuna eficaz, de alguna forma sugieren que los hallazgos de antígenos

no han terminado en su totalidad. Además, los experimentos revelan un punto muy importante a considerar, y es el hecho de que no hay protección al 100 % en muchos de ellos y esto deja algunos parásitos vivos que son foco de infección.

De tal forma que es imprescindible crear una vacuna con antígenos que protejan al huésped en contra de la infección por huevos y cisticercos en profilaxis o terapéutica.

1.7 Inmunización génica

Actualmente la inmunización génica es una estrategia novedosa de presentación antigénica muy prometedora, consiste en inyectar ADN en tejidos del huésped, este ADN debe ser plasmídico y debe contener una secuencia codificadora para uno o incluso varios antígenos de nuestro interés [42,43]. El ADN llega hasta el núcleo de la célula por mecanismos que aun no se han logrado dilucidar, y ya en el núcleo se transcribe para luego expresar los antígenos de interés.

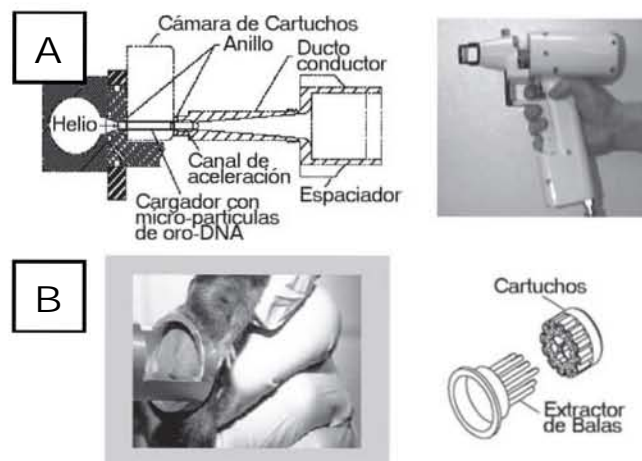


FIG. 8. Inmunización génica mediante la técnica del gene gun. (A) Representación esquemática del funcionamiento básico (izq.) de la pistola génica (der.) (B) Los cartuchos (der.) contienen las balas del dispositivo, los cuales son cilindros de plástico en cuyo interior se encuentran las micropartículas de oro recubiertas con ADN plasmídico. Posteriormente las micropartículas son disparadas con un flujo de helio en el tejido del animal (izq.).

Los plásmidos requieren de una secuencia denominada promotor viral que tiene la función de expresar genes que den origen a productos de fusión con secuencias secretoras, permitiendo que los antígenos proteicos se dirijan al espacio extracelular. De esta forma la respuesta inmunológica es muy específica ya que se generan células y anticuerpos contra los antígenos codificados[44].

Con el fin de optimizar la inmunización génica se han experimentado varias rutas de inoculación del ADN, siendo la intramuscular, subcutánea y la intradérmica las que se han utilizado hasta el momento. Respecto a la forma de inoculación de ADN también se ha reportado el uso de un dispositivo llamado “gene gun” (FIG. 8), este equipo logra introducir partículas de oro recubiertas por dicho ADN en células de tejidos del huésped mediante una presión de helio comprimido[45]. Dentro de las ventajas que presenta el uso de este equipo, es que la cantidad de ADN plasmídico para inducir una respuesta inmune satisfactoria en animales de laboratorio que va del orden de los microgramos. La inmunización génica presenta ventajas importantes con respecto a otros métodos como son el uso de extractos del microorganismo, péptidos sintéticos, proteínas recombinantes e incluso microorganismos atenuados. Se pueden citar otras ventajas del DNA con respecto a las proteínas como son la mayor estabilidad del ADN a temperatura ambiente, facilitando su transporte y almacenaje e incluso se obtienen grandes cantidades con relativa facilidad.

Otra de las ventajas que ofrece la inmunización génica es la posibilidad de incorporar al ADN plasmídico una serie de genes que puedan modular la respuesta inmune, como serían las interleucinas[46]. Incluso su administración no requiere de agentes adyuvantes como las requieren las proteínas, ya que la molécula de ADN se almacena y administra en solución salina libre de endotoxinas.

El desarrollo de esta vacuna no solo se ha enfocado en los parásitos, sino que su aplicación se extiende a virus y bacterias con resultados muy favorables.

Es importante mencionar que la respuesta inmune que despierta este tipo de ensayos genera anticuerpos y células de larga duración, logrando que su aplicación sea aprovechada para uso veterinario. La aplicación de esta vacuna sería en cerdos y no en humanos, con el fin de romper el ciclo de vida del parásito, además de las medidas mencionadas en este documento.

II. HIPÓTESIS

El uso del gen que codifica a la proteína TSOL18 administrado con la técnica de Gene gun puede generar una respuesta inmune, que serviría de herramienta para el control de la cisticercosis porcina.

III. OBJETIVOS

Dada la importancia que ha tenido la proteína TSOL18 de *Taenia solium* en la protección de la cisticercosis porcina, el objetivo principal de este trabajo es desarrollar la versión en ADN de la vacuna proteica y establecer las condiciones de su aplicación mediante la técnica de Gene Gun.

- Realizar la construcción de los vectores pRSETB-TSOL18 y pRSETB-TSOL18s.
- Inducir la expresión de las proteínas recombinantes recTSOL18 y recTSOL18s.
- Obtención el vector pCMV- TSOL18.
- Administración del vector pCMV- TSOL18 en ratones a través de la vía IM y Gen gun.

IV. MATERIALES Y METODOS

4.1 Construcción de genes sintéticos

Mediante el programa de GeneBuilder (FIG.9) y basándonos en la secuencia silvestre que codifica para el antígeno TSOL18 de *Taenia solium*, se diseñaron oligonucleótidos que generarán en los extremos del nuevo gen, sitios de restricción en BglII y XbaI. El programa además, ajusta la secuencia silvestre de acuerdo al uso de codones de mamífero. Posteriormente ese grupo de oligonucleótidos fue ensamblado por técnicas de PCR, dando como resultado el gen sintético de la TSOL18 con secuencia secretora(FIG. 10).

También se obtuvo el gen sintético de la TSOL18 sin secuencia secretora, mediante el diseño de un primer que al momento de amplificar el gen por PCR excluyera la secuencia nucleotídica que codificaba para la secuencia secretora.



FIG. 9 . Programa de computación utilizado para la creación de los genes sintéticos de *Taenia solium*. En la ventana superior se ingresa la secuencia de aminoácidos o ADN, luego se elige el organismo del cual se desea conocer la secuencia adaptada (Expressing organism). El programa genera una secuencia con los nuevos codones mediante una serie de oligonucleótidos complementarios que darán forma al nuevo gen(ventana derecha).

ATG GTT TGT CGG TTC GCT CTC ATA TTC CTT GTC GCC GTG GTG CTA GCC TCC GGG
 M V C R F A L I F L V A V V L A S G
GAT AGA ACA TTT GGC GAC GAT ATA TTC GTG CCC TAT CTG CGC TGC TTC GCC CTG
 D R T F G D D I F V P Y L R C F A L
AGC GCA ACC GAG ATC GGC GTC TTC TGG GAC GCG GGC GAG ATG GTT GGA CAT GGA
 S A T E I G V F W D A G E M V G H G
GTC GAG GAG ATC AAA GTG AAA GTG GAA AAG GCC ATC CAC CCA TAC AAA ATT TGG
 V E E I K V K V E K A I H P Y K I W
AAC GCA ACT GTG TCA GCC AAC AAT GGT AAG GTA ATT ATT AGG GAC CTG AAA GCT
 N A T V S A N N G K V I I R D L K A
AAG ACG ATC TAC AGA GTG GAC GTG GAT GGG TAC CGG AAT GAA ATC ATG GTA TTT
 K T I Y R V D V D G Y R N E I M V F
GGG TCT CAG CGT TTT GCT ACC ACA TTG CCT AAG AAG CAG ATC AAA CAC AAG AAG
 G S Q R F A T T L P K K Q I K H K K
GTC CGA CGC AGT
 V R R S

FIG. 10. Secuencia de ADN sintético y de aminoácidos del antígeno TSOL18. Los primeros 16 aminoácidos corresponden a la región secretora de la proteína, la cual se eliminó para incrementar la expresión de la TSOL18.

4.2 Construcción del plásmido para inmunización génica

Los productos de PCR fueron analizados en gel de agarosa al 1% con el fin de verificar el estado y concentración del ADN. Después de este análisis se realizó la digestión enzimática con las enzimas de restricción BglII y XbaI para generar los extremos cohesivos en ambos genes de la TSOL18 (FIG. 11).

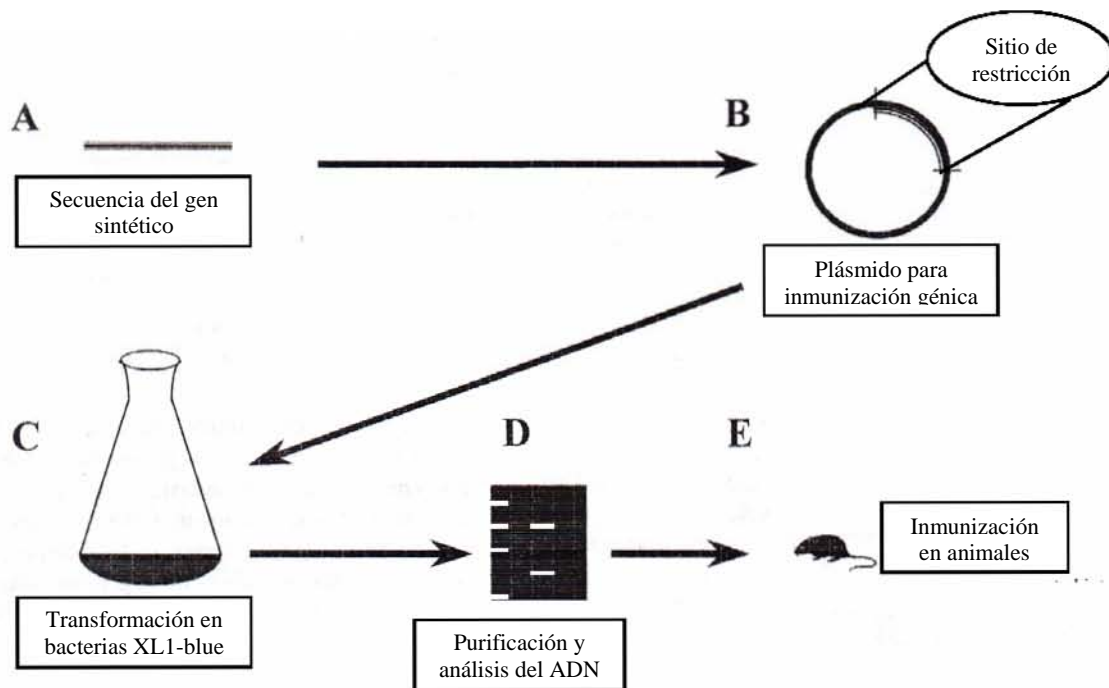


FIG. 11. Representación esquemática que ilustra la construcción, evaluación e inmunización de una vacuna génica.

El plásmido pCMV fue digerido en los sitios de restricción Bgl II y Xba I. Se analizó 1 μL del vector pCMV (0.624 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) en gel de agarosa al 1%, se observó la banda correspondiente al vector linearizado que es de 4835 pb (FIG 12). Ya identificada la banda del vector pCMV, se purificó del gel y se procedió a la reacción de ligación entre el vector pCMV digerido y los productos de PCR digeridos.

La reacción de ligación se realizó de acuerdo a las instrucciones dadas por el proveedor de los reactivos (Invitrogen) y a Maniatis et al [47]. Con la reacción de ligación se formaron los vectores pCMV-TSOL18 y pCMV-TSOL18 sin secuencia secretora.

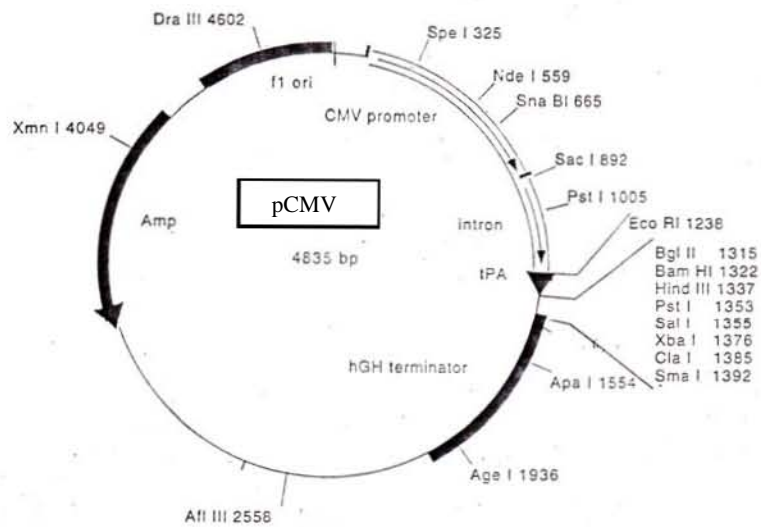


FIG. 12. Esquema del vector pCMV, el cual presenta en su estructura un mapa de restricción que permite clonarle secuencias de ADN capaces de generar inmunogenos en mamíferos.

4.3 Transformación de bacterias

En este método se utilizaron bacterias competentes *E. coli* XL1 blue tratadas con cloruro de rubidio. Las transformaciones se llevaron a cabo descongelando las bacterias en un recipiente con hielo durante 10 minutos, lentamente se adicionaron 0.1 μg del ADN plasmídico de los vectores pCMV- TSOL18 y pCMV-TSOL18 sin secuencia secretora, por separado, a las bacterias. Se incubó durante 30 min en hielo. Se les dio un choque térmico a 42°C durante 1 min, para después colocarlas 2 minutos en hielo. Se les adicionó 1 mL de medio LB en condiciones estériles. Se continuó con una incubación a 37 °C durante 45 minutos en agitación constante. Luego se centrifugó por espacio de un minuto a 14 000 rpm, se desechó el sobrenadante por decantación. El botón bacteriano se resuspendió con el medio LB residual y se sembraron cajas LB agar con ampicilina 100 mg/ mL. concentración final. Se dejó la incubación a 37 °C entre 14 – 16 horas. Después de ese tiempo se observó el crecimiento de

colonias bacterianas, pero el desarrollo de bacterias no era prueba contundente para afirmar que todas las bacterias adquirieron el vector pCMV-TSOL18, ya que pudo existir la posibilidad de que algunas bacterias hayan adquirido solo el vector pCMV y debido a que éste contiene el gen de resistencia a la ampicilina permitió el crecimiento de las bacterias. Con este antecedente, se picaron 10 colonias bacterianas y se inocularon en medio LB para después purificar el ADN de estos cultivos. Una proporción de ADN de cada una de las muestras fue sometida a una reacción de digestión enzimática con Bgl II y Xba I, de nuevo se analizaron por electroforesis en geles de agarosa. Con este ensayo pudimos identificar cual de las muestras presentaba las bandas del vector pCMV y TSOL18 en el mismo carril del gel. De esta forma, se secuenció el ADN y se revisó manualmente cada uno de los nucleótidos que forman parte del vector pCMV-TSOL18 antes de realizar un cultivo de mayor proporción.

4.4 Purificación del vector pCMV-TSOL18

Se identificaron las colonias positivas y se crecieron cultivos bacterianos a gran escala. Para esto se picó una colonia de la transformación y se inoculó en 10 mL de LB con ampicilina 100µg/µL concentración final. El cultivo creció a 37 °C durante 14 - 16 horas. Posteriormente se tomó una alícuota de 3 mL y se inocularon en 3 matraces de 800 mL cada uno con LB y suplementado con ampicilina 100µg/µL concentración final. Se dejaron creciendo los cultivos bacterianos hasta una D O = 0.9, luego se centrifugaron los cultivos a 5000 rpm durante 30 minutos a 4 ° C. Después se purificó el ADN con el kit comercial QIAGEN “Plasmid Giga kit”.

4.5 Preparación de balas para inmunización con la técnica del Gene Gun

Se mezclaron 15 mg de micropartículas de oro con 100µL de espermidina 0.05M, se vortexeo y sonicó durante 5 segundos. Luego se adicionaron 30 µL del ADN plasmídico (1µg/µL), agitando con vortex durante 5 segundos. Posterior a esto se adicionó lentamente y con agitación 100 µL de CaCl₂ 1M. Se incubó la suspensión durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después se centrifugó a 14000 rpm durante 15 segundos y se desechó el sobrenadante. El pellet se resuspendió con una breve agitación y se realizaron 3 lavados con 1 mL de etanol anhidro por vez. Se removieron los sobrenadantes y se adicionaron 200 µL de PVP 0.1 mg/mL. Se trasvasó la suspensión a un tubo falcon de 15 mL y se adicionaron 3.4 mL de PVP 0.1 mg/mL.

Se siguió el procedimiento descrito en BIO RAD “Helios Gene Gun System” para obtener las balas en cuyo interior se encontraban las micropartículas de oro recubiertas de ADN. Brevemente, se agregó al interior de un tubo (1/8 “ de diámetro interno y 30” de largo) la suspensión de ADN, se colocó el tubo en posición horizontal y se le pasó un flujo de nitrógeno por espacio de 45 segundos para remover el etanol. Se retiró el flujo de nitrógeno e inmediatamente se giró el tubo para permitir que la suspensión recubra de manera homogénea toda la parte interna del tubo. Se dejó secar por 5 minutos y al final se cortó el tubo en segmentos de 0.5 cm. Se almacenaron en viales perfectamente secos y guardados en un desecador hasta el momento de su uso.

4.6 Esquema de inmunización murina

Se inmunizaron ratones Balb/c hembras de 8 semanas de edad, los animales estuvieron con alimento y agua en las instalaciones del bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM. Se plantearon dos grupos de inmunización:

A) Inmunización intramuscular: Este grupo comprendió tres subgrupos (naive, vector pCMV solo y vector pCMV- TSOL18). Se administraron por ratón 100 µg del ADN en 100µL de solución salina 0.9 %, las regiones administradas fueron los cuádriceps derecho e izquierdo.

B) Inmunización con la técnica Gene gun: Este grupo también se dividió en 3 subgrupos como se menciona en la inmunización intramuscular. Lo primero que se hizo fue rasurar el pelo del vientre de cada ratón para poder dejar expuesta la piel y de esta forma se descargó el contenido de la bala en los tejidos del ratón.

Ambos grupos fueron inmunizados con dosis idénticas a los 17 y 33 días después de la primera inmunización, siendo tres inmunizaciones en total.

4.7 Sangrado de ratones

Los sangrados se obtuvieron a los 15, 30, 45 y 60 días posteriores al sangrado preinmune, dando un total de 5 sangrados.

Para sangrar, los ratones fueron expuestos a una lámpara de luz infrarroja de 250 watts durante 2 minutos, luego se les realizó un pequeño corte transversal en la cola y se colectaron alrededor de 0.5 mL de sangre por ratón. Posteriormente se introdujo un palillo de madera en el tubo que contenía la sangre cosechada y se dejó coagular a 37° C durante 45 minutos. Los

coágulos son removidos y los sueros son incubados a 4° C por un tiempo aproximado de 2 horas, se centrifugaron a 10,000 xg por 10 minutos a 4°C. Los sobrenadantes se vertieron a tubos limpios y se almacenaron a – 70 °C.

4.8 ELISA

Se sensibilizaron las placas Costar para ensayos inmunoenzimáticos con 100 ng de proteína diluidos en buffer de carbonatos pH = 9.6 por pozo y por duplicado. Se dejaron 16 horas a 4°C. Se decantó el sobrenadante y se lavaron las placas con PBS-Tween 20 al 0.1 % por duplicado. Después se bloqueó con 200 µL de gelatina al 1% (m/v), se dejaron a temperatura ambiente por 1 hora. Posteriormente se incubaron con sueros de ratones (1:500 en PBS-Tw20-BSA), adicionando 100µL por pozo y dejando la reacción durante 1 hora a 37°C (incluyendo sueros preinmunes y sueros inmunizados). Se lavaron tres veces las placas con PBS-Tw20 y se agregó el anticuerpo acoplado a peroxidasa en un volumen de 100µL por pozo diluido en PBS-Tw20 (1:1000). Se dejó incubando por 1 hora a 37 °C, se volvió a lavar con PBS-Tw20 por triplicado y se reveló con 100 µL de ODP. Se adicionaron 50µL de H₂SO₄ 2.5 N por pozo y se midió la absorbancia a 450 nm.

4.9 Producción de las proteínas recTSOL18 y recTSOL18s

La metodología descrita a continuación se aplicó para ambas proteínas. Se construyó el gen que codifica la proteína TSOL18 mediante la técnica de PCR, de la forma en como se describe en la sección de genes sintéticos, con la diferencia que los extremos de este gen presentaron sitios de restricción en EcoRI y HindIII. El producto de PCR se analizó en gel de agarosa al

1%. Las bandas de ADN se identificaron basándose en su peso molecular y se purificaron para someterlas a una digestión enzimática en los sitios de restricción EcoRI y Hind III.

El vector pRSETB (Invitrogen) fue seleccionado para ligarle la secuencia codificadora de la proteína TSOL18 (FIG. 13). Este vector fue sujeto a una digestión enzimática en los sitios de restricción EcoRI y Hind III. Las bandas de ADN se identificaron y purificaron del gel de agarosa al 1%.

Se realizó la ligación del gen TSOL18 con el vector pRSETB a 4°C durante 16 horas para formar el vector pRSETB-TSOL18. Después se transformaron bacterias competentes JM109 con el producto de ligación, adicionando 10 µL de la reacción a 100µL de cultivo bacteriano. Las bacterias se sembraron en agar LB suplementado con ampicilina 100µg/µL concentración final y se dejaron creciendo a 37°C por 14 –16 horas. Se picaron varias colonias para crecerlas en cultivos de 10 mL de LB líquido suplementado con ampicilina 100µg/µL concentración final, los cultivos se desarrollaron a 37°C por 14 –16 horas y con agitación constante a 250 rpm. Se purificó el ADN y para identificar cual de esas muestras presentaba el inserto TSOL18 por medio de la técnica de PCR como se describió anteriormente. Se eligió únicamente una de las muestras positivas y se secuenció para verificar que no existieran mutaciones en el ADN.

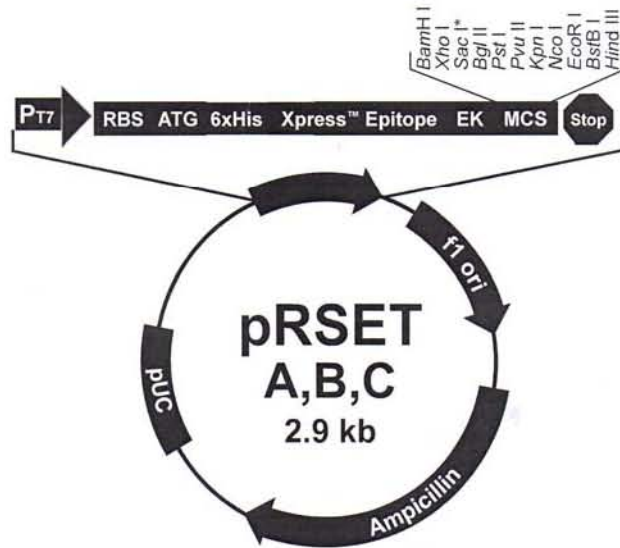


FIG. 13. Representación esquemática del vector pRSETB, utilizado para incorporarle secuencias de ADN, y de esta forma producir proteínas recombinantes.

El plásmido seleccionado fue requerido para transformar bacterias competentes JM109, se picó una colonia bacteriana que estuviera aislada y se inoculó en 10mL de medio SOB (20g triptona, 5.0 g extracto de lavadura, 0.5g NaCl, 186.0 mg KCl y 10 mL MgSO₄ 1M para un litro) con 100μL de ampicilina 100μg/μL concentración final, dejando el cultivo por 14 horas a 37°C y 250 rpm. Posteriormente se tomó una alícuota de 200μL del cultivo y se adicionó a 500mL de SOB suplementado con ampicilina 100μg/μL concentración final. Se dejó crecer hasta una D. O. = 0.3 y se indujo la expresión de la proteína adicionando 500 μL IPTG y 2mL de fago M13/T7 (2.9 x 10¹³ pfu/mL). Cosechando alícuotas de 1mL por vez a las 0, 2, 4 y 6 horas de inducción. Se analizaron las muestras por electroforesis en gel de acrilamida al 12% para identificar la proteína inducida. Luego se purificó la proteína recombinante utilizando columna de afinidad Hi Trap Chelating (Invitrogen).

4.10 Cuantificación de proteína

Las proteínas fueron cuantificadas por el método de Bradford, se mezclaron 800µL de agua, 180µL del reactivo de Bradford y 20 µL de la muestra. Se midió la absorbancia a 595nm y la concentración de las muestras se determinó con relación a una curva patrón construida con diferentes concentraciones conocidas de BSA.

4.11 Electroforesis de proteínas en gel de acrilamida

Se utilizó el método de electroforesis en gel de acrilamida al 12 y 15%. Primero, los extractos proteicos se trataron con un agente desnaturizante (glicerol al 10 %, SDS al 23 %, 62 mM de Tris-HCl pH= 6.8, mercaptoetanol al 5% y azul de bromofenol al 0.001%) y se hirvieron durante 5 minutos antes de dosificarlos en el gel. La electroforesis se efectuó en el buffer Tris-glicina (0.025M Tris pH= 8.3, 0.192 M glicina y 0.1% SDS) y a 100 volts constantes durante 2 horas. Luego se tiñeron las proteínas con una solución de Coomassie (0.025% Coomassie Blue R-250, 40% metanol y 7% ácido acético) durante 1 hora con agitación constante, posteriormente se destiño el gel con una mezcla de metanol y ácido acético al 40 y 7 % respectivamente, hasta observar las bandas proteicas con el mejor contraste.

4.12 Western Blot

Se transfirieron las proteínas resueltas por electroforesis en gel a una membrana de nitrocelulosa utilizando el buffer de transferencia (0.025M Tris pH= 8.3, 0.192 M glicina y 20% metanol), aplicando 1 AMP durante 45 minutos. La membrana se sumergió en una solución de rojo de Ponceau al 0.5% en ácido acético al 2% y se dejó 10 minutos con agitación. Se lavó la membrana con agua hasta obtener una buena resolución de las proteínas

y se cortaron tiras correspondientes a los carriles de la electroforesis en gel (o bien el gel completo cuando se utilizó un solo anticuerpo).

La membrana se introdujo en 50 mL de leche al 5% en PBS-Tween20 y se dejó en agitación vertical a 4°C durante 16 horas, se desechó la leche y se incubó con los sueros diluidos en PBS-Tw20/leche al 5% (sueros preinmunes, inmunizados y antihistidinas) a temperatura ambiente durante 1 hora y con agitación lenta. Se realizaron 4 lavados con 50 mL de PBS-Tween20 por vez. Se adicionó el anticuerpo secundario (anti-IgG de ratón) diluido en PBS-Tween20 y se dejó durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación constante. Se realizaron lavados como antes se mencionó y la reacción se reveló con diaminobencidina y peróxido de hidrógeno al 0.001 % disueltos en PBS.

V. RESULTADOS

A partir de la secuencia obtenida en el “gene bank” para la TSOL18 se diseñaron las nuevas secuencias de los genes sintéticos (synTSOL18 y synTSOL18s) mediante un programa de computadora, para adaptarlos al sistema de expresión en mamíferos. En el programa se generaron una serie de oligonucleótidos que se traslapan entre sí para abarcar el gen completo. Los oligonucleótidos se mezclaron en cantidades equivalentes y mediante la técnica de PCR se ensambló el nuevo gen sintético (FIG 14).

Más adelante se decidió eliminar la secuencia secretora de la TSOL18, que correspondía a los primeros 16 aminoácidos ubicados hacia la región amino terminal (FIG. 15), debido a resultados publicados en donde se hacía referencia a que la expresión de la proteína recombinante se veía favorecida sin esta región del antígeno[48]. Para tal motivo se diseñaron unos primers que permitieron eliminar la secuencia secretora con ayuda de las técnicas de PCR:

Primer forward: ECORI-SYN TSOL18- F

5´AAG AAT TCT CCG GGG ATA GAA CAT TTG GCG ACG ATA TAT TCG TGC CCT
ATC TG 3´

Primer reverse: REVERS0TSOL18 PRSET

5´GGG AAG CTT TCA ACT GCG TCG GAC CTT CTT GTG TTT GAT CTG CTT CTT
AGG CAA 3´

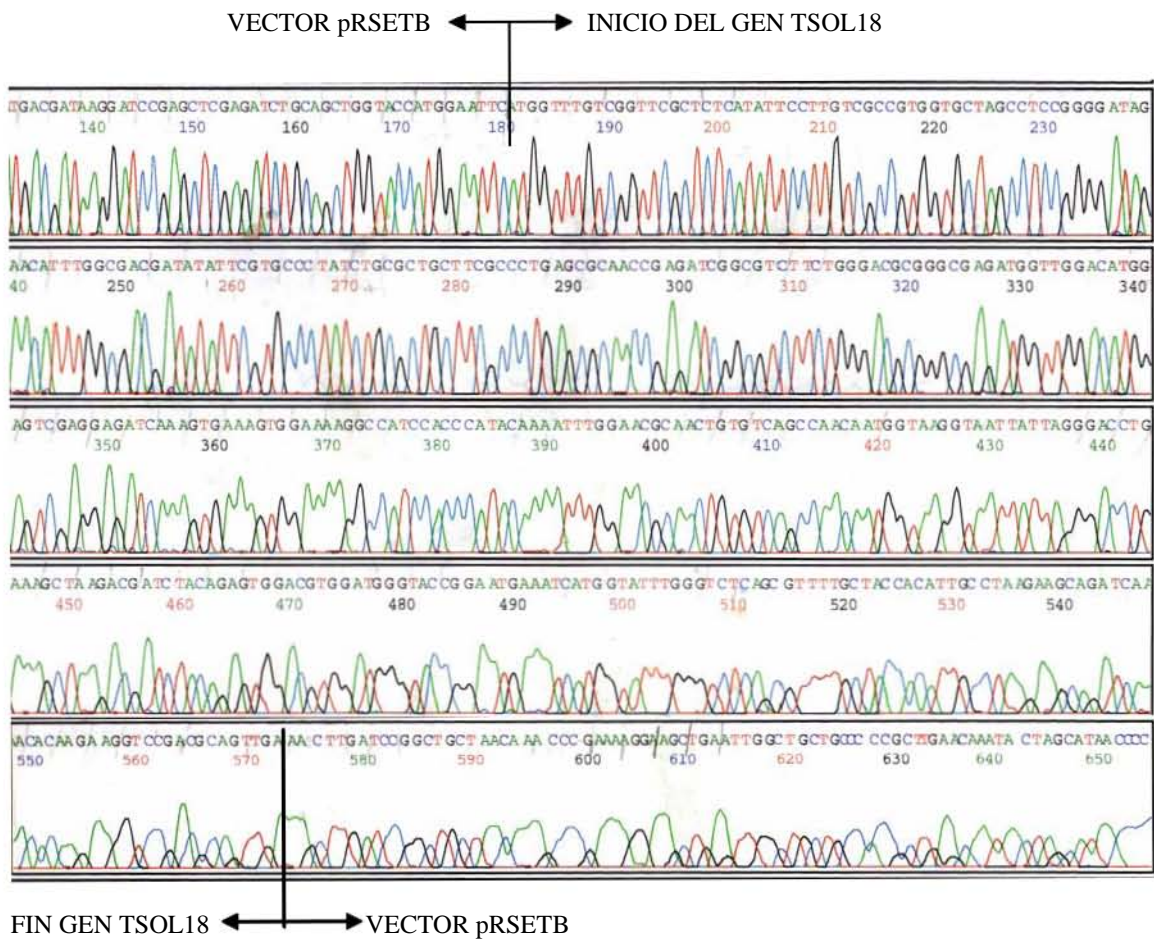


FIG.14. Electroferograma de la secuencia nucleotídica que corresponde al gen TSOL18 clonado en el vector pRSETB.

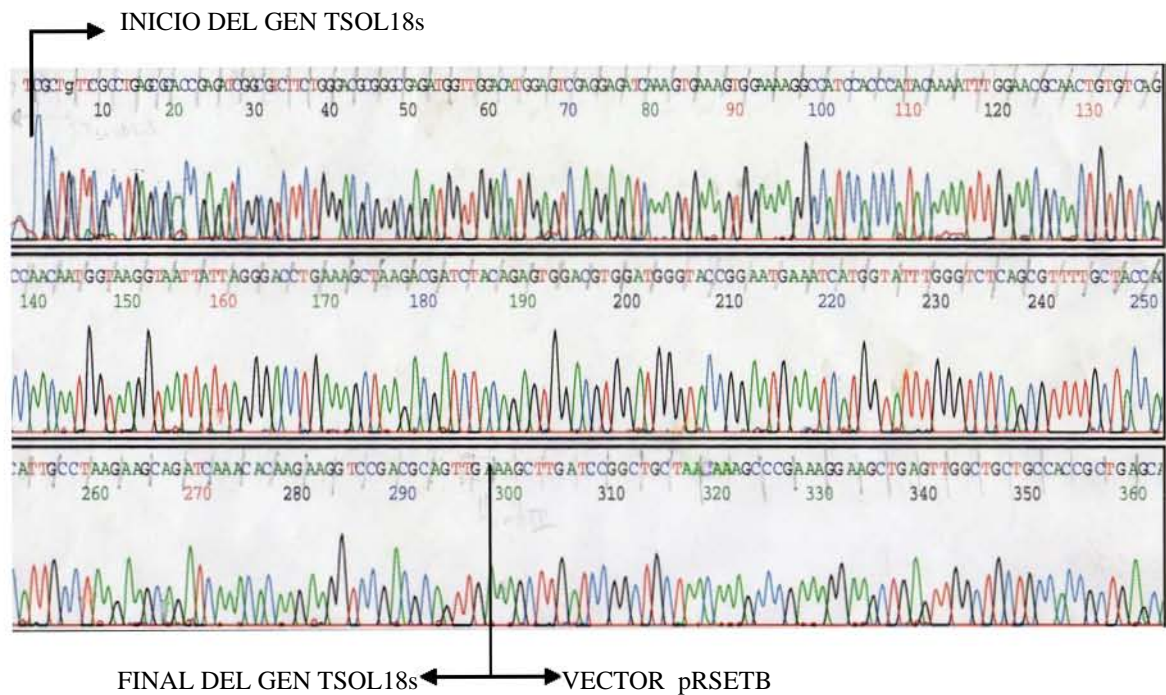


FIG. 15. Electroferograma de la secuencia nucleotídica del gen TSOL18 sin secuencia secretora clonado en el vector pRSETB.

Los genes sintéticos fueron tratados con enzimas de restricción EcoRI y Hind III (FIG. 16) con el fin de generar extremos cohesivos que permitieran su clonación en el vector pret (FIG. 17) que también fue digerido con las enzimas antes mencionadas. Para verificar el estado y peso molecular del ADN se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1%, en este ensayo las bandas se compararon con respecto a un marcador de peso molecular, encontrándose una banda aproximada de 2900 pb que correspondió con el peso teórico del vector pRSETB y otra banda de 490 pb que indicaba el peso teórico de la TSOL18 (FIG. 18).

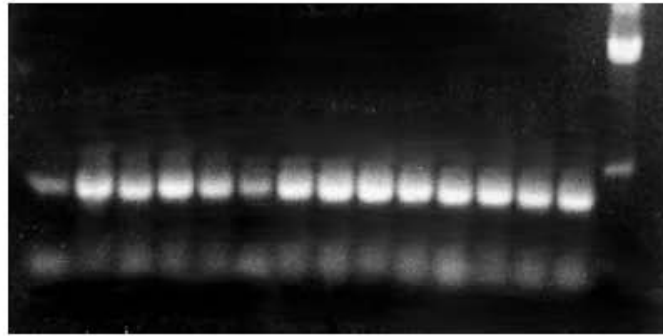


FIG 16. Análisis por electroforesis en gel de agarosa de varios productos de PCR con los extremos EcoRI y HindIII que corresponden al peso molecular de la TSOL18 (490 pb).

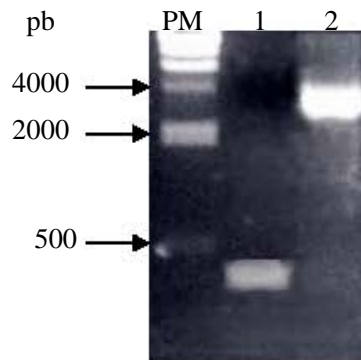


FIG. 17. Análisis por electroforesis en gel de agarosa de ADN correspondientes al peso molecular de la TSOL18 (carril 2) y al vector pRSETB linearizado (carril 3), después de digerirlos con las enzimas de restricción EcoRI y HindIII. Comparado con un marcador de peso molecular (carril 1).



FIG. 18 . Análisis por electroforesis en gel de agarosa del vector pRSETB - TSOL18, despues de tratarlo con las enzimas de restricción EcoR1 y HindIII.

La ligación pRSETB-TSOL18 permitió la transformación de bacterias competentes *E. coli* JM109 que tienen la capacidad de expresar proteínas recombinantes. Seguido de la transformación se plaquearon cajas con agar LB suplementado con ampicilina 100µg/µL

concentración final. se identificaron las bacterias que incorporaron el plásmido con el gen TSOL18, a través de técnicas de PCR y geles de agarosa al 1%. El ADN se analizó en un secuenciador ABI PRISM. Luego se indujo la expresión de la proteína recombinante con el procedimiento de Invitrogen que utiliza el inductor IPTG y el fago M13/T7.

La proteína obtenida presenta una región comprendida de 6 histidinas, las cuales permitieron su purificación del extracto bacteriano mediante columnas de afinidad Hi trap Chelating Invitrogen. La cuantificación de la proteína se determinó con el método de Bradford, obteniendo 296 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de la proteína recTSOL18s.

La proteína se identificó mediante una electroforesis en gel de acrilamida al 12%, basándonos en su peso molecular aproximado de 18 kDa. Para el caso de de la proteína con la secuencia secretora encontramos la presencia de una banda con un peso molecular de 36kDa, lo cual conllevó a eliminar la secuencia secretora. (FIG. 19).

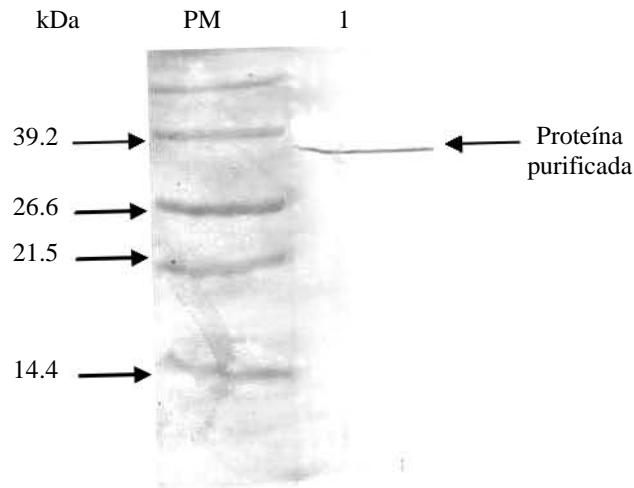


FIG. 19 . Análisis por Western blot de la proteína recTSOL18. La banda que se identifica presenta un peso molecular aproximado de 39kDa, que podría ser un dímero formado por la misma proteína.

Después de eliminar la secuencia secretora de la proteína, se desarrolló el mismo procedimiento para la obtención de la proteína recTSOL18s (FIG. 20). Posteriormente se purificó la proteína como se describe anteriormente. (FIG. 21).

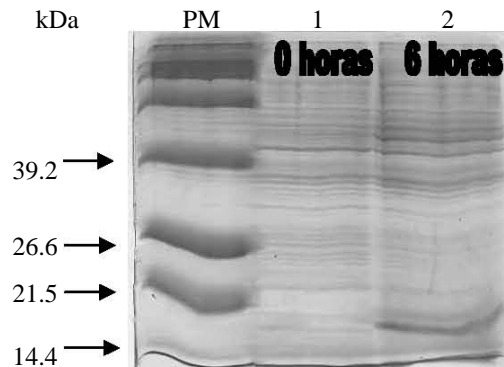


FIG. 20. Análisis por electroforesis en gel de acrilamida de la inducción y expresión de la proteína recTSOL18s. Se tomó una alícuota del cultivo antes de inducir la expresión de la proteína para tener un control o blanco en nuestro análisis (carril 1). La inducción se dejó a un máximo de 6 horas y en ese momento se tomó una muestra para analizarla junto con el tiempo a las 0 horas. Después de efectuar la electroforesis se identificó una banda en el carril 2 que indicaba la presencia de la recTSOL18s.

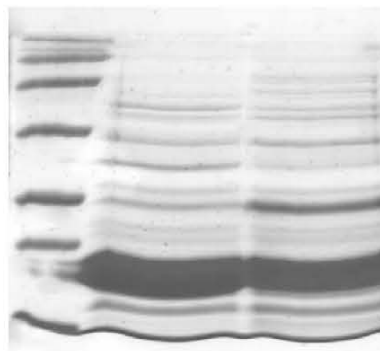


FIG. 21. Análisis en gel de acrilamida de una fracción de la proteína recTSOL18s purificada mediante columnas de afinidad. La banda más intensa corresponde al peso molecular esperado del péptido de fusión (19kDa). Las fracciones purificadas se ocuparon para realizar los ensayos inmunoenzimáticos descritos en este trabajo.

El ensayo del Western blot se utilizó para comprobar que las proteínas resueltas en los geles de acrilamida fueran reconocidas por los anticuerpos contenidos en los sueros de los ratones inmunizados (FIG. 22).

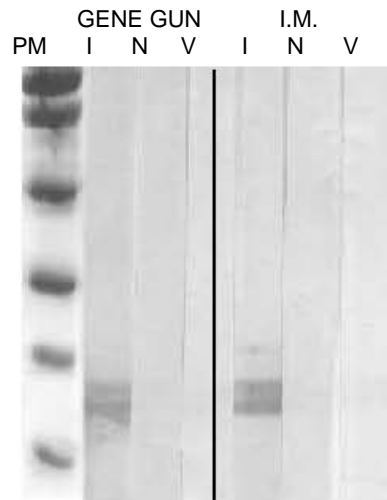


FIG. 22. Reconocimiento de los anticuerpos formados por los ratones después de la inmunización génica hacia la proteína recTSOL18s (carriles “I”). Se usaron los sueros de los ratones administrados con el vector sin la secuencia de la proteína(carriles “V”) y a un grupo naïve (carriles “N”)como controles para verificar que el análisis fuera solo positivo para los grupos inmunizados. En el lado izquierdo de la imagen se observa el experimento para la inmunización con la técnica del gene gun, mientras que del lado derecho se observa el resultado de la inmunización intramuscular.

Se digirió el gen TSOL18 (FIG. 23) y el vector pCMV con las enzimas de restricción BglII y XbaI para poder clonar ambas secuencias de ADN. Se realizó un gel de agarosa al 1 % y se analizaron las bandas de ADN, los resultados fueron una banda aproximada de 4835 pb y otra banda de 480 pb, siendo el vector pCMV y el gen TSOL18 respectivamente. Las bandas de ADN identificadas por su peso molecular se purificaron y se realizaron las ligaciones correspondientes (FIG.24).



FIG.23. Análisis por electroforesis en gel de agarosa de varios productos obtenidos por PCR para la construcción del gen sintético TSOL18 con los extremos BglII y XbaI.

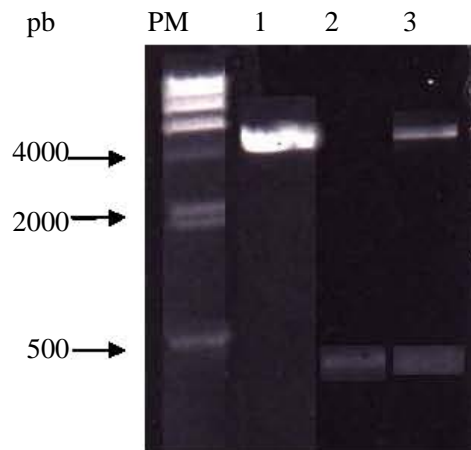
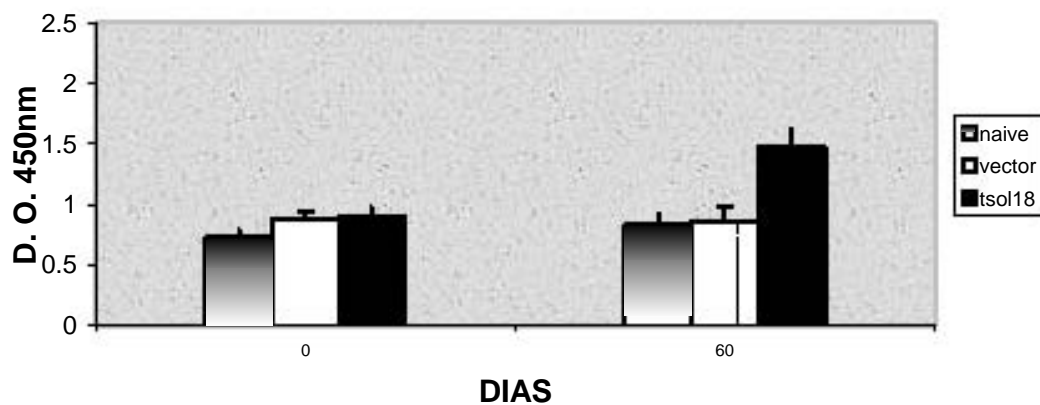


FIG. 24. Análisis por electroforesis en gel de agarosa del ADN utilizado para la construcción del vector pCMV-TSOL18. Las muestras de ADN fueron digeridas con las enzimas de restricción BglII y XbaI. El vector pCMV presenta un peso molecular de 4900 pb(carril 1), mientras que el gen TSOL18 se encuentra cerca de las 490 pb (carril 2), por último observamos ambas muestras de ADN despues de haber hecho la construcción del vector y haberlo digerido con las enzimas antes mencionadas (carril 3).

Se transformaron bacterias competentes *E. coli* XL1-blue con el vector pCMV-TSOL18, se desarrolló un cultivo de 2.5 L con bacterias transformadas, después de 20 horas de incubación a 37°C y agitación constante, las bacterias fueron cosechadas y se purificó el ADN plasmídico como se describe en QIAGEN “Plasmid Giga Kit”, obteniéndose una elevada cantidad de ADN (6.20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), de la misma forma se obtuvo el vector pCMV sin el gen synTsol18 (6.14 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$).

Posteriormente, se realizó la inmunización génica e intramuscular. Se sangraron a los ratones y se recolectaron los sueros. El siguiente ensayo que se efectuó fue la caracterización de la respuesta inmune mediante la técnica de ELISA, en la cual se identificaron la presencia de anticuerpos en contra del antígeno recTSOL18 y recTSOL18s (FIG. 25).

GENE GUN



INTRAMUSCULAR

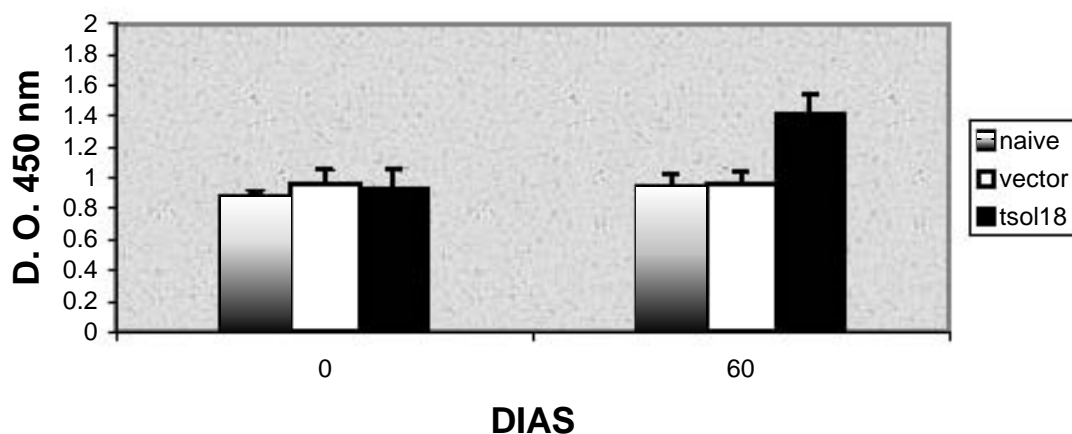


FIG. 25. Caracterización inicial de la respuesta inmune dada por anticuerpos en ratones inmunizados génicamente con synTSOL18. Se inmunizó a un grupo de ratones Balb/c con la construcción pCMV-synTSOL18 (synTSOL18). Se formó un grupo de ratones control no-inmunizados (naive) y otro grupo de ratones control a los cuales se les administró el vector pCMV vacío. Se colectaron muestras de sangre de los grupos de ratones a intervalos de 15 días después de la inmunización inicial. La producción de anticuerpos específicos para TSOL18 se evaluó a través de un ensayo de ELISA. La proteína recTSOL18s se utilizó para sensibilizar las placas de ELISA (100ng de proteína por pozo). Las graficas muestran la respuesta dada por anticuerpos de tipo IgG específicos para recTSOL18s, analizada 45 días después de la inmunización inicial en los sueros de los ratones inmunizados con synTSOL18. La gráfica superior muestra el experimento con la técnica del gene gun y la gráfica inferior revelo los resultados para la vía intramuscular.

VI. DISCUSIÓN

En el presente trabajo de tesis, se realizaron diferentes experimentos que permitieran desarrollar una vacuna en contra de la oncosfera de *Taenia solium*.

Se consideró que el antígeno TSOL18 presentaba grandes posibilidades de ser un candidato eficaz para el desarrollo de la vacuna. Considerando este punto se creó el gen sintético de la TSOL18 (synTSOL18). Se le llama gen sintético dado que utiliza codones adaptados para su expresión en células de mamíferos. En algunos reportes se ha demostrado que la expresión de una proteína se ve favorecida mediante estos cambios, ya que la maquinaria celular en mamíferos reconoce de mejor forma los nuevos codones y no los que utiliza el parásito originalmente. Es importante mencionar que la nueva versión del gen no modifica la capacidad antigénica que tiene en principio la TSOL18.

Después de haber obtenido el gen sintético, se desarrolló el vector (pRSETB-TSOL18) que tuviera la capacidad de expresar la proteína que serviría de antígeno en los ensayos inmunológicos. Originalmente el antígeno TSOL18 se logró expresar en pequeñas cantidades y se formaban agregados de la proteína. Este hecho sugirió que la proteína posiblemente formaba cuerpos de inclusión dentro de las bacterias y de ahí que su expresión no fuera en mayor cantidad.

Se encontró en la literatura una publicación donde la expresión de la proteína TSOL18 se veía incrementada si se le eliminaba la región de la secuencia secretora[48]. Dada esta situación se decidió crear un nuevo gen sin dicha secuencia secretora (synTSOL18s).

Los resultados obtenidos para esta nueva proteína recTSOL18s, arrojaron información importante en el sentido de que las cantidades expresadas de esta proteína fueron superiores a

las obtenidas por la proteína recTSOL18 y sin la agregación que se observaba con la proteína completa . Se purificó la proteína expresada en estas condiciones y se obtuvo la proteína a uniformidad. Con la proteína purificada, se estuvo en condiciones de evaluar la producción de anticuerpos en respuesta a la inmunización con ADN inoculada de dos maneras: vía intramuscular y vía partículas aceleradas por presión.

Para la generación de anticuerpos, el gen sintético se clonó en un vector que permitiera expresar a la proteína TSOL18 en células de mamífero, en este caso se utilizaron ratones de la cepa Balb C . El vector pCMV-TSOL18 fue administrado por la vía intramuscular y por la vía dérmica a través de la técnica del gene gun. Las vías de administración fueron elegidas basándose en los datos publicados[44], los cuales indican que estas formas de inoculación son las que dan mejores resultados. Se trabajaron con dos grupos de animales (intramuscular y gene gun) tratados bajo las mismas condiciones. Después de inocular se obtuvieron los sueros de ambos grupos de ratones(cuadro 2). El suero de estos ratones se uso para los ensayos de ELISA y Western Blott.

GRUPOS	NUMERO DE RATONES (INTRAMUSCULAR)	NUMERO DE RATONES (GENE GUN)
NAIVE	5	5
VECTOR SOLO	5	5
TSOL18	5	5

Cuadro 2. Esquema de los grupos formados para el experimento de inmunización genica.

En el ensayo de ELISA, los datos indicaron la presencia de anticuerpos en el suero de los ratones inmunizados en contra del antígeno TSOL18. Además se encontró una respuesta

similar con la técnica de gene gun en comparación con la vía intramuscular. Sin embargo, si tomamos en cuenta las cantidades de DNA administradas por ambas vías, podemos corroborar que la técnica del gene gun es más eficaz para generar una respuesta inmune.

El suero de los ratones inmunizados se evaluó también mediante el ensayo de Western blot. Con esta metodología se confirmó el hecho de que los anticuerpos generados por los ratones fueron específicos para el antígeno TSOL18 y no una reacción cruzada, dado que solo existió reacción con la banda proteica de la TSOL18 y no con los grupos control o con alguna otra proteína.

VII. CONCLUSIONES

Si nos basamos en los objetivos planteados en un inicio, podemos concluir que se obtuvieron los vectores tanto para la expresión de la proteína en bacterias, así como el vector capaz de utilizarse en ensayos de inmunización. Se obtuvo con éxito la proteína TSOL18 que se usó como antígeno en experimentos inmunológicos y la administración del vector pCMV-TSOL18 con la técnica del gene gun y por la vía intramuscular, logrando generar una respuesta inmune en los ratones.

I. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Lightowlers MW. Eradication of *Taenia solium* cysticercosis: a role for vaccination of pigs. *Int J Parasitol.* 1999;29:811-817.
2. Flisser A. Taeniasis and cysticercosis due to *Taenia solium*. *Prog Clin Parasitol.* 1994;4:77-116.
3. Flisser A, Gauci CG, Zoli A, Martinez-Ocaña J, Garza-Rodríguez A, Domínguez-Alpizar JL, Maravilla P, Rodríguez-Canul R, Avila G, Aguilar-Vega L, Kyngdon C, Geerts S, Lightowlers MW. Induction of protection against porcine cysticercosis by vaccination with recombinant oncosphere antigens. *Infection and Immunity.* 2004;72:5292-5297.
4. Baily GC, Masson PR. Serological diagnosis of neurocysticercosis: evaluation of ELISA test using cyst fluid and other components of *Taenia solium* cysticerci as antigens. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg.* 1988;82: 295.
5. Espinoza B, Ruiz-Palacios G, Tovar A, Sandoval MA, Plancarte A, Flisser A. 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.
6. Garcia HH, Pretell EJ, Gilman RH, Martinez SM, Moulton LH, Del Bruto OH, Herrera G, Evans CA, Gonzalez AE; Cysticercosis Working group in Peru. A trial of antiparasitic treatment to reduce the rate of seizures due to cerebral cysticercosis. *N Engl J Med.* 2004;350: 249-258.
7. Acevedo-Hernandez A. Economic impact of porcine cysticercosis. *Cysticercosis: Present Sate of Knowledge and Perspectives.* Academic Press, Inc.1982 p 63.
8. Flisser A, Lightowlers MW. Vaccination against *Taenia solium* cysticercosis. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2001;96:353-356.
9. Boa M, Mukaratirwa S, Willingham AL, Johansen MV. Regional action plan for combating *Taenia solium* cysticercosis/taeniosis in Eastern and Southern Africa. *Acta Trop.* 2003;87: 183-186.
10. Flisser A, Sarti E, Lightowlers M, Schantz P. Neurocysticercosis: regional status, epidemiology, impact and control measures in the Americas. *Acta Trop.* 2003;87: 43-51.

11. Carrique-Mas J, Iihoshi N, Widdowson MA, Roca Y, Morales G, Quiroga J, Cejas F, Caihuara M, Ibarra R, Edelsten M. An epidemiological study of *Taenia solium* cysticercosis in a rural population in the Bolivian Chaco. *Acta Trop.* 2001;80: 229-235.
12. 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. Hyperendemic human and porcine *Taenia solium* infection in Peru. *Am J Trop Med Hyg.* 2003;68: 268-275.
13. Rajshekhar V, Joshi DD, Doanh NQ, Van De N, Xiaonon Z. *Taenia solium* taeniosis/cysticercosis in Asia: epidemiology, impact and issues. *Acta Trop.* 2003;87: 53-60.
14. Watson JM. *Medical helminthology*, London, Baillière, Tindall & Cox. 1960.
15. Flisser A. Neurocysticercosis in Mexico. *Parasitol Today.* 1988; 4: 131-137.
16. Sander JW, Perucca E. Epilepsy and comorbidity: infections and antimicrobials usage in relation to epilepsy management. *Acta Neurol Scand.* 2003;180:16-22.
17. Sarti E, Schantz PM, Avila G, Ambrosio J, Medina-Santillan R, Flisser A. Mass treatment against human taeniasis for the control of cysticercosis: a population-based intervention study. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2000;94: 85-89.
18. Widdowson MA, Cook AJ, Williams JJ, Argaes F, Rodriguez I, Dominguez JL, Rodriguez R. 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.* 2000;94: 620-624.
19. Sanchez AL, Fairfield T. Using electronic technology for *Taenia solium* education: educating the educators. *Acta Trop.* 2003;87: 165-170.
20. Jeri C, Gilman RH, Lescano AG, Mayta H, Ramirez ME, Gonzalez AE, Nazerali R, Garcia HH. Species identification after treatment for human taeniasis. *Lancet.* 2004;363: 949-950.
21. Lightowlers MW, Colebrook AL, Gauci CG, Gauci SM, Kyngdon CT, Monkhouse JL, Vallejo-Rodriguez C, Read AJ, Rolfe RA, Sato C. Vaccination against cestode parasites: anti-helminth vaccines that work and why. *Vet Parasitol.* 2003;115: 83-123.
22. Williams JF, Englekirk PG, Lindsay MC. Mechanisms of immunity in rodent cysticercosis. p 621-632. In: Flisser A, Willms K, Lacleite JP, Larralde C, Ridaura C, and Beltran F (eds); *Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives.* Academic Press. New York, USA. 1982.

23. Rickard MD, Williams JF. Hydatidosis/cysticercosis: immune mechanisms and immunization against infection. *Adv Parasitol.* 1982;21: 229-296.
24. Rothel JS, Lightowlers MW, Seow HF, Wood PR, Rothel LJ, Heath DD, Harrison GBL. Immune responses associated with protection in sheep vaccinated with a recombinant antigen from *Taenia ovis*. *Parasite Immunol.* 1996;18: 201-208.
25. Ambrosio J, Landa A, Merchant MT, Laclette JP. Protein uptake by cysticerci of *Taenia crassiceps*. *Arch Med Res.* 1994;25: 325-330.
26. Kalinna B, Mcmanus DP. An IgG (Fc)-binding protein of *Taenia crassiceps* (Cestoda) exhibits sequence homology and antigenic similarity with Schistosome paramyosin. *Parasitol.* 1993;106: 289-296.
27. Spolski RJ, Corson J, Thomas PG, Kuhn RE. Parasite-secreted products regulate the host response to larval *Taenia crassiceps*. *Parasite Immunol.* 2000;22: 297-305.
28. Molinari JL, Soto R, Tato P, Rodriguez D, Retana A, Sepulveda J, Palet A. Immunization against porcine cysticercosis in an endemic area in Mexico: a field and laboratory study. *Am J Trop Med Hyg.* 1993;49: 502-512.
29. Nascimento E, Costa JO, Guimaraes MP, Tavares CA. Effective immune protection of pigs against cysticercosis. *Vet Immunol Immunopathol.* 1995;45: 127-137.
30. Molinari JL, Tato P, Aguilar T, Palet A. Immunity in mice to an oncosphere infection by using oncospherical antigens from *Taenia solium* or *Taeniarhynchus saginatus*. *Rev Latinoam Microbiol.* 1988;30: 325-333.
31. Molinari JL, Rodriguez D, Tato P, Soto R, Arechavaleta F, Solano S. Field trial for reducing porcine *Taenia solium* cysticercosis in Mexico by systematic vaccination of pigs. *Vet Parasitol.* 1997;69: 55-63.
32. Huerta M., DE Aluja De AS, Fragoso G, Toledo A, Villalobos N, Hernández M, G. Gevorkian G, Acero G, Diaz A, Alvarez I, Avila R, Beltrán C, Garcia G, Martinez JJ, Larralde C, Sciutto E. Synthetic peptide vaccine against *Taenia solium* pig cysticercosis: successful vaccination in a controlled field trial in rural Mexico. *Vaccine.* 2001;20: 262-266.
33. Sciutto E et al. New approaches to improve a peptide vaccine against porcine *Taenia solium* cysticercosis. *Archives of Medical Research.* 2002;33:371-378.
34. Plancarte A, Flisser A, Gauci CG, Lightowlers MW. Vaccination against *Taenia solium* cysticercosis in pigs using native and recombinant oncosphere antigens. *International Journal of Parasitology.* 1999;29:643-647.

35. Guo YJ, Sun SH, Zhang Y, Chen ZH, Wang KY, Husng L, Zhang S, Zhang HY, Wang QM, Wu D, Zhu WJ. Protection of pigs against *Taenia solium* cysticercosis using recombinant antigen or in combination with DNA vaccine. *Vaccine*. 2004;22: 3841-3847.
36. Rosas G, Fragoso G, Garate T, Hernandez B, Ferrero P, Foster-Cuevas M, Parkhouse RM, Harrison LJ, Briones SL, Gonzalez LM, Sciutto E. Protective immunity against *Taenia crassiceps* murine cysticercosis induced by DNA vaccination with a *Taenia saginata* tegument antigen. *Microbes Infect*. 2002;4:1417-1426.
37. Cruz-Revilla C, Rosas G, Fragoso G, Lopez-Casillas F, Toledo A, Larralde C, Sciutto E. *Taenia crassiceps* cysticercosis: protective effect and immune response elicited by DNA immunization. *J Parasitol*. 2000;86:67-74.
38. Vázquez-Talavera J, Solís CF, Terrazas LI, Lacleste JP. Characterization and protective potential of the immune response to *Taenia solium* paramyosin in a murine model of cysticercosis. *Infection and Immunity*. 2001;69:5412-5416.
39. Gauci C, Lightowers MW. Molecular cloning of genes encoding oncosphere proteins reveals conservation of modular protein structure in cestode antigens. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 2003;127:193-198.
40. Gauci CG, Lightowers MW. Alternative splicing and sequence diversity of transcripts from the oncosphere stage of *Taenia solium* with homology to the 45W antigen of *Taenia ovis*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 2001;112:173-181.
41. Lightowers MW. Vaccines for prevention of cysticercosis. *Acta Tropica*. 2003;87:129-135.
42. Johnston SA, Talaat AM, McGuire MJ. Genetic Immunization: What's in a name?. *Archives of Medical Research*. 2002;33:325-329.
43. Hasan UA, Abai AM, Harper DR, Wren BW, Morrow WJW. Nucleic acid immunization: concepts and techniques associated with third generation vaccines. *Journal of Immunological Methods*. 1999;229:1-22.
44. Reyes A, Pinto AR. Vacunas de DNA. *Temas de actualidad en microbiología, ambiente y salud*. 2002:327-342.
45. Boyle CM, Robinson HL. Basic mechanisms of DNA-raised antibody responses to intramuscular and gene gun immunizations. *DNA Cell Biol*. 2000;19: 157-165.
46. Maecker HT, Umetsu DT, Dekruyff RH, Levy S. DNA vaccination with cytokine fusion constructs biases the immune response to ovalbumin Vaccine. 1997;15: 1687-1696.

47. Maniatis T, Sambrook J, Fritsch EF. *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Second edition. 1989.
48. Lightowlers MW, Gauci CG, Chow C, Drew DR, Gauci SM, Heath DD, Jackson DC, Dadley-Moore DL, Read AJ. Molecular and genetic characterisation of the host-protective oncosphere antigens of taeniid cestode parasites. *International Journal for Parasitology*. 2003;33:1207-1217.