



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

LA PROTEÍNA DE UNIÓN A ÁCIDOS GRASOS DE LA
***Taenia solium* COMO AGENTE VACUNAL EN CONTRA**
DE LA TENIASIS/CISTICERCOSIS

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

OSCAR ILLESCAS POMPOSO

TUTOR(A) PRINCIPAL DE TESIS: Dr. JUAN PEDRO LACLETTE SAN ROMÁN
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

COMITÉ TUTOR: Dra. ANA FLISSER STEINBRUCH

FACULTAD DE MEDICINA

Dr. JULIO CESAR CARRERO SÁNCHEZ

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

MÉXICO, D.F.

JULIO, 2014.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

LA PROTEÍNA DE UNIÓN A ÁCIDOS GRASOS DE LA
***Taenia solium* COMO AGENTE VACUNAL EN CONTRA**
DE LA TENIASIS/CISTICERCOSIS

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

OSCAR ILLESCAS POMPOSO

TUTOR(A) PRINCIPAL DE TESIS: Dr. JUAN PEDRO LACLETTE SAN ROMÁN
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

COMITÉ TUTOR: Dra. ANA FLISSER STEINBRUCH

FACULTAD DE MEDICINA

Dr. JULIO CESAR CARRERO SÁNCHEZ

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

MÉXICO, D.F.

JULIO, 2014.

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM.
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 26 de mayo de 2014, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** del alumno **ILLESCAS POMPOSO OSCAR** con número de cuenta **300083877** con la tesis titulada **"LA PROTEÍNA DE UNIÓN A ÁCIDOS GRASOS DE LA *Taenia solium* COMO AGENTE VACUNAL EN CONTRA DE LA TAENIASIS/CISTICERCOSIS"**, realizada bajo la dirección del **DR. JUAN PEDRO LACLETTE SAN ROMÁN**:

Presidente: DR. ABRAHAM LANDA PIEDRA
Vocal: DRA. INGEBORG DOROTHEA BECKER FAUSER
Secretario: DR. JULIO CESAR CARRERO SÁNCHEZ
Suplente: DRA. MARÍA DOLORES CORREA BELTRAN
Suplente: DRA. GLADIS DEL CARMEN FRAGOSO GONZÁLEZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 26 de junio de 2014.



M. del Coro Arizmendi
DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM, por permitir y facilitar mi formación.

Al CONACYT por el apoyo económico otorgado para la realización de mis estudios de doctorado (No. Becario 220667).

A la DGAPA, por el otorgamiento de un apoyo del PAPIIT para la realización de mi proyecto de doctorado (IN213711).

Al Dr. Juan Pedro Laclette por todo su apoyo durante mis estudios y para la realización de esta tesis, por ayudarme a sobrepasar los obstáculos que se presentaron a lo largo del doctorado, así como por ser un ejemplo para mí como profesional, como investigador y como persona.

A la Dra. Ana Flisser Steinbruch por recibirme en su laboratorio como uno más de sus alumnos, por siempre escuchar mis puntos de vista y por mostrarme con su ejemplo cómo defender los míos.

Al Dr. Julio César Carrero Sánchez por siempre estar atento a mi trabajo y dispuesto a ayudarme con el mismo, así como por su crítica a mi trabajo y su exigencia en el mismo.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

A los miembros del jurado, por sus señalamientos y sugerencias, que permitieron completar esta tesis.

Al Dr. Raúl Bobes por todo su apoyo y su asesoría en mi proyecto.

A la M. en C. Patricia de la Torre por toda la ayuda que me prestó en cada uno de mis experimentos.

DEDICATORIA

A mi familia por siempre estar presente.

A mis compañeros de laboratorio, por el apoyo, la paciencia y los buenos momentos.

A todo el grupo 19, familia por decisión.

A todos los amigos que conocí durante mi licenciatura, con quienes he compartido mucho.

A todos los que de una u otra manera han influido en mi vida y me han llevado hasta aquí.

ÍNDICE

RESUMEN	4
SUMMARY	5
I INTRODUCCIÓN	6
1 <i>Taenia solium</i> un parásito platelminto	6
1.1 Clasificación taxonómica	6
1.2 Ciclo biológico	6
1.3 Taeniosis y cisticercosis	7
2 Proyecto del genoma de <i>T. solium</i>	8
2.1 La proteína de unión a ácidos grasos de la <i>T. solium</i> , TsFABP1	9
2.2 Metabolismo de ácidos grasos en helmintos	9
3 Vacunación contra taeniosis/cisticercosis	10
3.1 Modelo experimental y reproducción de la cisticercosis en laboratorio	11
3.2 Modelos experimentales de teniosis	12
3.3 Vacunas contra <i>T. solium</i> existentes o en desarrollo	12
3.4 Las proteínas de unión a ácidos grasos	13
3.5 Las FABPs como candidatos a vacuna	13
4 Localización de FABPs en parásitos	15
II PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	16
III OBJETIVOS.....	16
1 Objetivo general	17
2 Objetivos particulares	17
IV MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
1 Análisis de la secuencias nucleotídica y aminoacídica de la TsFABP1 y 2	17
2 Expresión recombinante de la TsFABP1	18
3 Ensayos de unión a ácidos grasos	19
3.1 Ensayos en ausencia de rTsFABP1	19
3.2 Ensayos en presencia de rTsFABP1.....	20
4 Sueros hiperinmunes anti-rTsFABP1	21
4.1 Extractos proteicos	21
4.2 Título de los sueros hiperinmunes	22
4.3 Especificidad	22
5 Estudios de inmunolocalización en tejido de parásitos.....	23
5.1 Obtención y manejo de muestras biológicas	23
5.2 Ensayos de inmunohistoquímica	23

6	Ensayos de vacunación en el modelo de cisticercosis murina	23
6.1	Diseño experimental y protocolo de inmunización	24
6.2	Evaluación de la respuesta inmune	24
6.3	Ensayos de proliferación celular	24
7	Análisis estadísticos	25
V USO Y CUIDADO DE ANIMALES PARA EXPERIMENTACIÓN		25
VI RESULTADOS		26
1	Análisis de las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de las TsFABP1 y 2.....	26
1.1	Comparación con la secuencia de otras FABPs	29
2	Expresión recombinante de TsFABP1	29
3	Ensayos de unión a ácidos grasos	31
4	Sueros hiperinmunes	33
5	Localización en tejido de parásitos helmintos	33
5.1	Cisticercos de <i>T. solium</i> , <i>T. pisiformis</i> y <i>T. crassiceps</i>	33
5.2	Gusanos adultos de <i>T. solium</i> y <i>T. saginata</i>	37
6	Ensayos de vacunación	37
6.1	Reducción en la carga parasitaria	37
6.2	Producción de anticuerpos específicos en animales inmunizados	40
6.3	Respuesta inmune celular	40
VII DISCUSIÓN.....		42
VIII CONCLUSIONES		49
IX ANEXOS.....		49
1	Artículo publicado.....	49
2	Las proteínas intracelulares de unión a lípidos (iLBPs)	59
2.1	Estructura terciaria	59
2.2	Clasificación	60
2.3	Mecanismo de acción intracelular	61
2.4	Localización tisular y funciones en mamíferos	61
2.5	iLBPs reportadas en helmintos	63
2.6	Funciones de las iLBPs en parásitos	64
3	Determinación de afinidades de unión	64
3.1	Métodos reportados para la determinación de afinidades de unión	64
3.2	Afinidades de unión de iLBPs parasitarias	65
4	Gráficas para la determinación de K_D y n	67

X REFERENCIAS	70
---------------------	----

TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Ensayos de vacunación contra taénidos	13
Tabla 2. Ensayos de vacunación realizados con FABPs de helmintos	14
Tabla 3. Constantes de disociación (K_D) para ADIFAB	32
Tabla 4. Constantes de disociación (K_D) y sitios de unión (n) para rTsFABP1.....	32
Tabla 5. Reducción en carga parasitaria	39
Tabla 6. Respuesta humoral de ratones inmunizados con rTsFABP1	40
Tabla 7. FABPs en vertebrados, nomenclatura y funciones principales	61
Tabla 8. Afinidades de iLBPs parasitarios por distintos lípidos.....	66
Figura 1. Ciclo vital de <i>T. solium</i>	7
Figura 2. Regiones endémicas para neurocisticercosis.....	8
Figura 3. Genes de la TsFABP1 y 2.....	27
Figura 4. Estructura terciaria de las TsFABP1 y 2.....	28
Figura 5. Alineamiento de las TsFABP1 y 2 con otras iLBPs de parásitos y una humana	30
Figura 6. Expresión recombinante y reconocimiento immune de rTsFABP	31
Figura 7. Inmunolocalización de TsFABP1 y probables proteínas homólogas en cisticercos	34
Figura 8. Inmunolocalización de TsFABP1 y una probable proteína homóloga en gusanos adultos.....	38
Figura 9. Reducción en la carga parasitaria de animales inmunizados	39
Figura 10. Respuesta humoral de ratones inmunizados con rTsFABP1	41
Figura 11. Ensayos de proliferación de linfocitos.....	41
Figura 12. Gráfica de Scatchard para palmitato	67
Figura 13. Gráfica de Scatchard para estearato.....	67
Figura 14. Gráfica de Scatchard para oleato	68
Figura 15. Gráfica de Scatchard para linoleato	68
Figura 16. Gráfica de Scatchard para linolenato	69
Figura 17. Gráfica de Scatchard para araquidonato	69

RESUMEN

Taenia solium es un parásito que infecta al humano y al cerdo como parte de su ciclo de vida. La infección es prevalente en países en desarrollo y está relacionada con malos hábitos de higiene. Como parte de los resultados de la secuenciación del genoma de *T. solium* se identificaron dos proteínas de unión a ácidos grasos (FABPs) que se expresan abundantemente, lo que sugiere que participan en el mecanismo fisiológico de obtención de ácidos grasos por parte del parásito, que no es capaz de sintetizar ácidos grasos o lípidos complejos.

Las FABPs están ampliamente distribuidas en el reino animal y se ha reportado su localización en distintas estructuras parasitarias y en todos los estadios de desarrollo. Estas proteínas son consideradas candidatos a vacuna en el caso de distintos parásitos platelmintos. A pesar de lo anterior, las FABPs de parásitos han sido escasamente estudiadas y se desconoce su función. En esta tesis se caracterizó una de las FABPs de la *Taenia solium*: TsFABP1.

Se realizó un análisis de las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas *in silico*, por comparación con las secuencias de proteínas ortólogas de otros parásitos. Se construyó un plásmido para la expresión de la TsFABP1 en bacterias. La proteína recombinante se purificó por afinidad a dicationes metálicos, y se utilizó para realizar determinaciones funcionales de unión a ácidos grasos mediante un ensayo espectrofluorométrico de competencia con la proteína paróloga modificada ADIFAB. Se localizó a la proteína por inmunohistoquímica en los tejidos de cisticercos y gusanos adultos de *T. solium*, *Taenia saginata*, *Taenia crassiceps* y *Taenia pisiformis*. Finalmente, se realizaron ensayos de protección en ratones contra la infección por *T. crassiceps*.

Los resultados mostraron que las FABPs de parásitos presentan conservados los residuos relacionados con su función, a pesar de que el porcentaje de identidad puede variar considerablemente en distintos grupos de organismos. También se demostró que la TsFABP1 es capaz de unir distintos ácidos grasos con preferencia por aquellos de cadena larga y con insaturaciones. Fue localizada en todas las muestras de tejidos ensayadas aunque se identificaron diferencias entre especies y entre estadios de desarrollo. Por su localización en los tejidos, la TsFABP1 parece estar involucrada en la absorción de ácidos grasos a partir del hospedero y en su metabolismo en los tejidos del parásito. Finalmente se probó el potencial protector de la TsFABP1 recombinante contra la cisticercosis en el modelo murino, encontrando una disminución en la carga parasitaria cercana al 50%. Se trata entonces de un antígeno moderadamente protector en contra la cisticercosis murina. Este es el primer estudio detallado de una FABP en céstodos.

SUMMARY

The parasite *Taenia solium* infects both human and swine as part of its life cycle. The infection is prevalent in underdeveloped countries and is related to bad hygiene habits. Two fatty acid binding proteins (FABPs) were identified as part of the *T. solium* genome sequence project, their high expression suggests that they may be involved in the parasite's fatty acid uptake mechanism, considering the parasite inability to synthesize fatty acids or complex lipids.

The FABPs have an ample distribution in the animal kingdom, and have been localized in different parasite tissue structures and all life stages. These proteins are considered vaccine candidates against different platyhelminth parasites.

Regardless of this, parasite FABPs have been poorly characterized and its function is unknown. In this thesis, one of the *Taenia solium* FABPs is characterized: TsFABP1.

In silico analysis of the protein sequences was carried out by comparison with the sequences of orthologous proteins of other parasites. A plasmid was constructed in order to express TsFABP1 in bacteria. The recombinant protein was purified by metallic bicationic affinity, and was used to perform functional competitive assays of fatty acid binding with the paralogous fluorescent protein ADIFAB. The protein was localized with immunohistochemistry assays carried out in larval and adult tissue of *T. solium*, *Taenia saginata*, *Taenia crassiceps* and *Taenia pisiformis*. Finally, protection assays against the *T. crassiceps* infection were carried out in mice.

The obtained results showed that the parasitic FABPs have conserved residues related to its function in their sequence, even when the percentage of identity is highly variable for different groups of organisms. Also, it was demonstrated that TsFABP1 can bind different fatty acids, preferring those unsaturated and with longer chains. The protein was localized in all the parasite tissue samples assayed, but differences between species and life stages were found. This localization of the protein in the parasites tissue, suggest the protein involvement in the fatty acid uptake from the host and its metabolism in the parasite. Finally, the protective potential of the recombinant TsFABP1 against cisticercosis was tested in the murine model, obtaining a parasite load reduction near 50%. Thus, the protective potential of the protein against murine cysticercosis is moderate. This is the first detailed study of a cestode FABP.

I INTRODUCCIÓN

1 *Taenia solium*, un parásito platelminto.

T. solium es un céstodo que infecta diversos tejidos del cerdo, así como el intestino delgado del humano, como parte de su ciclo de vida. Los céstodos son parásitos platelmintos que presentan adaptaciones morfológicas y funcionales relacionadas al parasitismo, como la ausencia de intestino, cabeza y órganos sensibles a la luz. Presentan además tegumento, una superficie que lo protege de elementos dañinos en el medio como ácidos biliares o el pH estomacal, y le permite absorber nutrientes (Willms et al. 2005). Su tejido, tanto en su estado larvario como el adulto, está mayormente formado por una capa citoplasmática multinucleada (sincicio) (Willms et al. 2006); en el adulto pueden distinguirse estructuras como úteros, testículos o músculo liso entre otras, que han sido descritas en detalle anteriormente (Willms et al. 2003). El estadio larvario o cisticerco, es una vesícula llena de líquido que contiene un escólex invaginado, órgano semejante a una cabeza que cuenta con ganchos y ventosas (rostelo) que sirven para la sujeción del parásito a la pared del intestino una vez que ha evaginado. Ya sujeto, el parásito adulto desarrolla proglótidos a partir de su cuello, que en conjunto reciben el nombre de estróbilos. Los proglótidos que se suceden entre sí, dan al parásito la apariencia de listón con la que se le describe tradicionalmente, y contienen órganos reproductores masculinos y femeninos que permiten la producción de miles de huevos en cada proglótido grávido, estos últimos son liberados al ambiente junto con las heces, conforme alcanzan la maduración.

1.1 Clasificación taxonómica.

Subreino: *Metazoarios*, Phylum: *Plathelminthos*, Clase: *Cestoidea*, Subclase: *Cestoda*, Orden: *Ciclophyllidea*, Familia: *Taeniidae*, Género: *Taenia*. Especie: *Taenia solium*.

1.2 Ciclo biológico.

El ciclo de vida del parásito incluye al cerdo como hospedero intermediario y al humano como definitivo (**Figura 1**), sin embargo el humano también puede ser un hospedero intermediario accidental. Cuando el humano se infecta a través de ingerir huevos de *T. solium*, desarrolla la cisticercosis. Los parásitos pueden alojarse en el SNC ocasionando una enfermedad conocida como neurocisticercosis que puede tener distintas manifestaciones clínicas. Aunque en general se acepta que *T. solium* infecta exclusivamente al humano y al cerdo,

existen reportes de que el perro (*Canis familiaris*) puede ser hospedero intermediario; esto fue observado en un estudio en Papua (Irian Jaya) donde se identificaron cisticercos de *T. solium* (variedad asiática) por medio de técnicas inmunológicas y análisis de ADN mitocondrial, en tejidos de perros infectados (Ito et al. 2002).

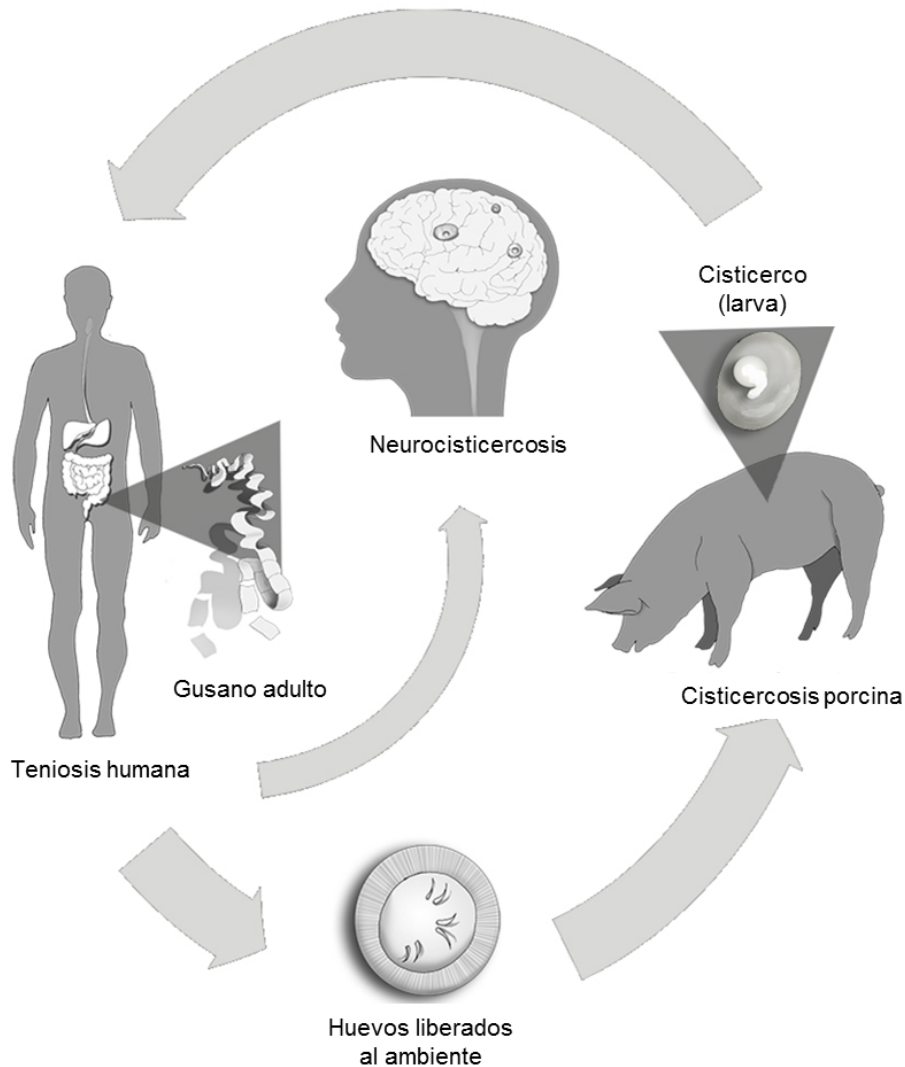


Figura 1. Ciclo de vida de *Taenia solium*. (Tomada con modificaciones de Bobes et al. 2014).

1.3 Taeniosis y cisticercosis.

El único hospedero definitivo para *T. solium* es el humano, el cual se infecta con el cisticerco y desarrolla teniosis, al alojar al gusano adulto desarrolla teniosis. Un

individuo con teniosis puede liberar cientos de miles de huevos junto con sus heces. El cerdo, y el humano de manera accidental, pueden infectarse al consumir los huevos y desarrollar una infección con el estadio larvario, la cisticercosis. Al ser transmitida por heces contaminadas, la transmisión depende de los hábitos higiénicos de la población humana, así como de las condiciones de vida del cerdo. En el caso específico de la neurocisticercosis, se ha demostrado que un factor necesario para la transmisión es la cohabitación con una persona infectada con teniosis. La teniosis/cisticercosis es una enfermedad relacionada con malos hábitos de higiene, que mantiene prevalencia en países en desarrollo (**Figura 2**). Se calcula que tiene una prevalencia de 0.4 millones de personas sólo en América latina (Hotez et al. 2008).

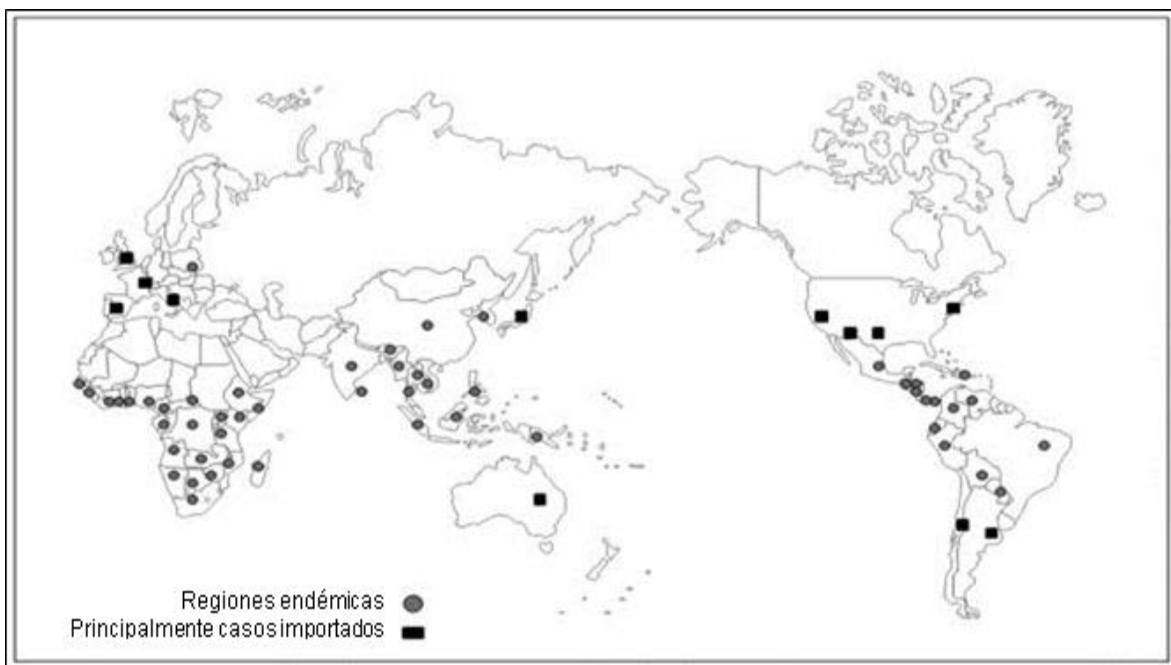


Figura 2. Regiones endémicas para neurocisticercosis. (Tomada con modificaciones de Del Brutto O. H. 2012).

2 Proyecto del genoma de *T. solium*.

En el año 2005 fue creado un consorcio de laboratorios de la Universidad Nacional Autónoma de México, con el fin de secuenciar el genoma de *T. solium* (Aguilar-Díaz et al. 2006; Tsai et al. 2013). Durante la caracterización de poco más de 60,000 ESTs correspondientes al gusano adulto, a través de secuenciación capilar de cDNAs seleccionados al azar, se encontró que uno de los mensajeros más abundantes codificaba para una proteína de unión a ácidos grasos (FABP), esta primera secuencia identificada fue denominada TsFABP1.

2.1 La proteína de unión a ácidos grasos de la *T. solium*, TsFABP1.

De acuerdo a la secuencia de cDNA obtenida en el proyecto del genoma, la TsFABP1 es una proteína de bajo peso molecular (~ 15 KDa, 133 aminoácidos), punto isoeléctrico teórico de 8.61 e hidropaticidad de -0.42, lo que indica que es soluble en agua. En general, se considera que las FABPs tienen como función el transporte intracelular de ácidos grasos, lo cual resulta interesante en un organismo como *T. solium*, considerado como incapaz de producir ácidos grasos *de novo*, y dependiente de carbohidratos para cubrir sus requerimientos energéticos (Smyth JD 1989; Willms K 2005).

2.2 Metabolismo de ácidos grasos en helmintos.

En la literatura existente hasta hace unos pocos años, se afirmaba que los helmintos no son capaces de sintetizar ácidos grasos ni lípidos complejos, pero no se describía un mecanismo por el que pudieran obtenerlos (Smyth JD 1989). Con las recientes publicaciones de los genomas, transcriptomas o proteomas de distintos parásitos helmintos (Olson et al. 2012; Yang et al. 2012; Tsai et al. 2013), esta información se ha ido ampliando. Se ha confirmado que parásitos como *Schistosoma japonicum*, *Schistosoma mansoni*, *Clonorchis sinensis*, *Echinococcus granulosus*, *Echinococcus multilocularis*, *Hymenolepis microstoma* y *T. solium*, no son capaces de sintetizar inositol, ácidos grasos, esteroides u hormonas *de novo*, pero son capaces de incorporar y (o) modificar diversas sustancias lipídicas a partir del hospedero (Brouwers et al. 1997; Lee et al. 2007) o cuentan con enzimas y proteínas que podrían estar involucradas en dicho proceso, tales como apolipoproteínas, receptores de lipoproteínas de baja densidad y tipo scavenger, colesterol esterasa, proteínas de unión a lipoproteínas de muy baja densidad (VLDLR), proteínas de unión a ligandos hidrofóbicos (HLBPs), proteínas de unión a ácidos grasos y retinol (FARs) y FABPs (Dinguirard y Yoshino 2006; Fairfax et al. 2009; Han et al. 2009; Zhou et al. 2009).

En el caso de *E. granulosus*, *E. multilocularis*, *H. microstoma* y *T. solium*, se ha confirmado que el metabolismo de los ácidos α -linolénico, linoleico y araquidónico, se encuentra altamente limitado por la baja conservación de las rutas metabólicas involucradas, mientras que el metabolismo de glicerolípidos y fosfoglicerolípidos parecer ser funcional aunque también tienen un grado de conservación baja, en general presentando sólo 30% de las enzimas totales de la ruta o menos (Tsai et al. 2013). Éstos parásitos parecen ser capaces también de modificar ácidos grasos hasta cierto grado, al igual que *S. mansoni*, podrían elongar los ácidos que

incorporan y formar triglicéridos y fosfolípidos, aunque no pueden desaturarlos. *E. granulosus* y *T. solium* presentan incluso una enzima involucrada en la síntesis de esteroides, la 17 β -estradiol 17-deshidrogenasa, misma que se presenta en el caso de *Taenia crassiceps*, dónde se ha comprobado su actividad (Meyer et al. 1970; Brouwers et al. 1997; Aceves-Ramos et al. 2013; Cui et al. 2013; Tsai et al. 2013).

Existen indicios de que algunos helmintos son capaces de metabolizar ácidos poliinsaturados para la producción de algunas clases de eicosanoides, como prostaglandinas, leucotrienos y ácidos hidroxieicosatetraenoicos (HETEs), que dicha producción depende del estadio de desarrollo en el que se encuentre, y que está relacionada con los mecanismos de invasión del parásito (Leid y McConnell 1983 (1); Leid y McConnell 1983 (2); Fusco et al. 1986; Salafsky y Fusco 1987). Otro grupo parásitos, las filarias (nemátodos), pueden sintetizar algunos eicosanoides como la protaglandina E₂ y además parecen presentar distintas elongasas y desaturasas, de acuerdo a la información reportada de sus genomas, aunque su capacidad de modificar ácidos grasos no ha sido comprobada (Brattig et al. 2006; Desjardins et al. 2013).

Otras rutas metabólicas como las relacionadas con la síntesis de los fosfolípidos de membrana y la β -oxidación se encuentran completas en los genomas de varios parásitos como *S. mansoni* y parecen estar activas, aunque su capacidad para utilizar triglicéridos como fuente de ácidos grasos es limitada, al menos en su estadio adulto (Meyer et al. 1970; Berriman et al. 2009). Por otro lado, existen reportes que indican que *T. crassiceps* puede activar la β -oxidación como resultado de un estrés inducido con fármacos, para la obtención de energía (Vinaud et al. 2009).

En contraste *Schmidtea mediterranea*, un platelminto de vida libre, tiene vías de síntesis de ácidos grasos completas (Robb et al. 2008). Otro organismo de vida libre, la planaria *Dugesia dorocephala*, carece de la capacidad de sintetizar ácidos grasos y esteroides de *novo*, aunque posee la de sintetizar otros derivados lipídicos como glicolípidos (Meyer et al. 1970), sin embargo, la mayoría de los platelmintos parecen conservarlos, esto lleva a pensar que la pérdida de rutas relacionadas con la síntesis y el metabolismo de ácidos grasos se debe a la adaptación al parasitismo.

3 Vacunación contra taeniosis/cisticercosis.

El interés científico por crear una vacuna contra la *T. solium* ha existido desde hace tiempo, tanto por el problema social y veterinario que puede generar al infectar cerdos de traspatio, como por la posibilidad de prevenir la

neurocisticercosis en el humano. Sin embargo, los intentos por desarrollar una vacuna han sido limitados por la falta de interés de grandes empresas y gobiernos en el tema (Caffrey 2012), razones por las cuales la teniosis y cisticercosis son consideradas enfermedades desatendidas por la OMS (http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/#). Otro problema es la incapacidad de reproducir el ciclo de vida del parásito en condiciones de laboratorio, que obliga a obtener el parásito de fuentes naturales, lo que ha probado ser un reto sobre todo en el caso del gusano adulto.

3.1 Modelo experimental y reproducción de la cisticercosis en laboratorio.

Para el estudio de la cisticercosis por *T. solium*, se ha recurrido a reproducir en laboratorio la cisticercosis porcina, o bien a reproducir la infección de *Taenia pisiformis* en conejos. Además, se desarrolló un modelo que utiliza otra especie relacionada, *T. crassiceps*, que es ampliamente utilizado.

A) Cisticercosis en cerdos (*Sus scrofa*).

El cerdo es el hospedero intermedio natural del parásito. Los animales son infectados con huevos de *T. solium* por vía oral, los cisticercos que son recuperados después del sacrificio del animal tienen capacidad infectiva. La principal limitante para la reproducción de esta infección en laboratorio es el acceso a huevos de *T. solium*, dada la dificultad que se tiene para la detección de los portadores humanos del gusano adulto. Además, se sabe que un cerdo infectado experimentalmente y que es bien alimentado, es capaz de calcificar los parásitos después de varios meses (de Aluja et al. 1996; Santamaria et al. 2002).

B) Cisticercosis en conejo (*Oryctolagus cuniculus*).

Los conejos son hospederos naturales de *T. pisiformis*, que se infectan al ingerir los huevos del parásito por vía oral. Los huevos utilizados en el laboratorio para reproducir la infección, provienen de parásitos recuperados de perros infectados naturalmente, o bien del modelo de teniosis hámster (Rickard y Outteridge 1974; Toral-Bastida et al. 2011).

C) Modelo de cisticercosis en ratón (*Mus musculus*).

Para este modelo, existen varias cepas de *T. crassiceps* que pueden utilizarse, tales como la ORF, WFU y HYG, las cuales difieren en la capacidad reproductiva y de desarrollo, HYG y WFU presentan reproducción lenta en la que el parásito se desarrolla por completo, ORF tiene una reproducción rápida pero el parásito es incapaz de desarrollarse completamente. En el modelo se utilizan ratones hembra de la cepa

BALB/c, que han demostrado ser susceptibles a la infección y permiten mantener a los parásitos replicando la infección en nuevos ratones periódicamente (Sciutto et al. 1990; Fragoso et al. 2008).

3.2 Modelos experimentales de teniosis.

La incapacidad del gusano de establecerse, madurar y reproducirse en animales diferentes al humano bajo condiciones normales, es causa de que para el estudio de la teniosis, se hayan desarrollado distintos modelos.

A) Modelo de teniosis en hámster (*Mesocricetus auratus*).

Los hámsters son infectados oralmente con cisticercos obtenidos de cerdos infectados naturalmente con *T. solium* o provenientes de conejos en el caso de *T. pisiformis*. Los parásitos de *T. solium* no se desarrollan a madurez aún con el uso de inmunosupresores, y sin el uso de éstos, el animal expulsa los gusanos después de 14 días de manera natural, por una polarización de la respuesta inmune hacia Th2 (Avila et al. 2008; Leon-Cabrera et al. 2009). Los parásitos de *T. pisiformis* se desarrollan a un estado adulto y producen huevos infectivos (Toral-Bastida et al. 2011).

B) Modelo de teniosis en chinchilla (*Chinchilla laniger*).

Las chinchillas son inmunosuprimidas e infectadas con cisticercos de *T. solium*, que son capaces de alcanzar el estadio adulto y de producir huevos infectivos (Maravilla et al. 2011).

C) Modelo de teniosis en gerbos (*Meriones unguiculatus*).

Al igual que en el modelo de hámster, no se obtuvieron proglótidos grávidos. Es necesario inducir una inmunosupresión para el establecimiento de la infección (Maravilla et al. 1998).

3.3 Vacunas contra *T. solium* existentes o en desarrollo.

Se han desarrollado ensayos de vacunación contra la infección por *T. solium* dirigidos tanto a prevenir la cisticercosis como la teniosis en distintos modelos animales, reproduciendo la infección natural en laboratorio o trabajando con especies de parásitos relacionadas. Estos ensayos han involucrado diferentes metodologías aunque predominan los ensayos con proteínas recombinantes dirigidas a prevenir la infección en el cerdo (**Tabla 1**).

3.4 Las proteínas de unión a ácidos grasos.

El primer reporte que existe de las FABPs es de 1972, en el que se les describe como una sola proteína presente en distintos órganos, y con una alta afinidad de unión por ácidos grasos de cadena larga (Ockner et al. 1972). Las FABPs forman parte de las llamadas proteínas intracelulares de unión a ácidos grasos (iLBPs), que a su vez son clasificadas como calicinas. Sus características y clasificación se encuentran detalladas en el **Anexo 1**.

3.5 Las FABPs como candidatos a vacuna.

La primer FABP parasitaria (Sm14) fue aislada de *S. mansoni* (Moser et al. 1991), llamó la atención de algunos grupos de investigación por su capacidad inmunogénica y fue por lo mismo considerada como un candidato a vacuna (Bergquist y Colley 1998). Otras FABPs que han sido probadas como candidatos a vacuna han sido las de *S. japonicum*, *Fasciola hepatica*, *Fasciola gigantica*, *E. granulosus* (**Tabla 2**).

Tabla 1. Ensayos de vacunación contra taénidos.

Vacuna ó molécula	Modelo	Resultados ¹	Referencia
TSOL16 y TSOL18 (S, r)*	Cerdo**	Reducción de 99.7% (cisticercos). Protección de 93.8%.	(Jayashi et al. 2012)
S3Pvac (S, sintética)	Conejo	Reducción de 98% (cisticercos), Protección de 92%.	(Betancourt et al. 2012)
S3Pvac 2.(S, r)		Reducción de 94% (cisticercos), Protección de 83%.	
S3Pvac + BLS-KETc1 (S, r)	Hámster	Reducción de 78% (gusanos).	(Cruz-Revilla et al. 2006)
Paramiosina (DNA)	Ratón	Reducción de 48% (cisticercos).	(Solis et al. 2005)
Paramiosina (S, r)	Ratón	Reducción de 52% (cisticercos).	(Vazquez-Talavera et al. 2001)
PcDNA3-B (ADN)	Cerdo	Reducción de 92% (cisticercos).	(Guo et al. 2007)
Calreticulina (S, r)	Hámster	Reducciones de 33, 44 y 100% (gusanos) ² .	(Leon-Cabrera et al. 2009)

¹Reducción se refiere a la diferencia porcentual en el número de parásitos encontrados al final del experimento en los animales vacunados con respecto a

los controles. Protección se refiere al porcentaje de animales vacunados que no presentaron ningún parásito al final del experimento.

²Resultados de experimentos independientes.

* S: Subunitaria. r: recombinante. n: nativa. ADN: vacuna de ADN.

** : Experimento en campo.

Tabla 2. Ensayos de vacunación realizados con FABPs de helmintos (1 de 2).

Parásito	FABP	Modelo	Resultados ¹	Referencia
<i>S. mansoni</i>	Sm14 (S, r)*	Oveja	Protección de 71% (<i>F. hepatica</i>).	(Almeida et al. 2003)
	Sm14 (S, r)	Ratón	Protección de 100%.	(Tendler et al. 1996)
	Sm14 (S, r)	Ratón	Protección de 65% (<i>S. mansoni</i>).	
<i>S. japonicum</i>	SjFABPc (S, r)	Oveja	Reducción de 59% (gusanos, <i>S. japonicum</i>).	(Liu et al. 2004)
	(ADN) + il-18	Ratón	Reducción de 38%.	(Wei et al. 2009)
	(ADN) + Sj26GST**	Ratón	Reducción de 39%.	(Wei et al. 2010)
	(ADN) + Sj26GST	Oveja	Reducción de 48%.	
<i>S. mansoni</i> / <i>F. hepática</i>	Sm14/Fh15 (péptidos sintéticos 1.3, 1.4 y 2.1)	Ratón	Reducción entre 42 y 50% (gusanos, <i>S. mansoni</i>).	(Vilar et al. 2003)
		Ratón	Reducción entre 50 y 100% (gusanos, <i>F. hepatica</i>).	
<i>F. hepática</i>	Fh12 (S, n)	Ratón	Reducción de 91% (gusanos, <i>Schistosoma bovis</i>).	(Aban et al. 1999)
	Fh12 (S, n)+ PAL**	Oveja	Reducción de 42%.	(Lopez-Aban et al. 2008)
	Fh15 (S, r)	Ratón	Reducción de 72%.	(Abane et al. 2000)
	Fh15 (S, r)	Conejo	Reducción de 76% (gusano, <i>F. hepatica</i>).	(Casanueva et al. 2001)

Tabla 2. Ensayos de vacunación realizados con FABPs de helmintos (2 de 2).

Parásito	FABP	Modelo	Resultados ¹	Referencia
<i>F. gigantica</i>	FgFABP (S, r)	Búfalo	Reducción de 35% (gusanos, <i>F. gigantica</i>).	(Nambi et al. 2005)
	FgFABP (S, n)	Ratón	Reducción de 72% (gusanos, <i>S. mansoni</i>).	(Rabia Aly et al. 2012)
<i>C. sinensis</i>	CsFABP (ADN)	Ratas	Reducción de 40% (gusanos, <i>C. sinensis</i>).	(Lee et al. 2006)
<i>E. granulosus</i>	EgFABP1 (ADN)	-	No se han realizado ensayos, sólo reportan la construcción de la vacuna.	(Hao et al. 2007)

¹Reducción se refiere a la diferencia porcentual en el número de parásitos encontrados al final del experimento en los animales vacunados con respecto a los controles. Protección se refiere al porcentaje de animales vacunados que no presentaron ningún parásito al final del experimento.

²Resultados de experimentos independientes.

* S: Subunitaria. r: recombinante. n: nativa. ADN: vacuna de ADN.

**PAL: Extracto de *Polypodium leucotomos* (inmunomodulador), parte del sistema ADAD. Sj26GST: Glutación-s-transferasa de *S. japonicum*.

Algunas de las vacunas desarrolladas contra *T. solium* han alcanzado niveles de protección cercana o mayor al 90%, entendiendo esta protección como el porcentaje de individuos que resistieron la infección después de recibir la vacuna, y reducciones en la carga parasitaria promedio aún mayores (**Tabla 1**). Aun así, ninguna de las vacunas ha sido comercializada.

A pesar de que las FABPs de parásitos son consideradas candidatos vacunales, no se había desarrollado ensayos en céstodos para evaluarlas. Además, estas proteínas presentan una alta reactividad cruzada en parásitos (**Tabla 2**), por la relativamente alta conservación de su secuencia aminoacídica (Tendler et al. 1996; Lee y Yong 2004; Rabia Aly et al. 2012), lo que podría favorecer el desarrollo de una vacuna que proteja contra distintas especies de parásitos a la vez.

4 Localización de FABPs en parásitos.

En vertebrados, se tiene claro que la distribución de las distintas FABPs en un organismo es dependiente del tejido. En el caso de algunos parásitos como la *T.*

solium, esto cambia por tratarse de un sincicio, pues todos los tejidos y estructuras están conectadas de manera íntima. A pesar de ello, la localización de estas proteínas en distintas estructuras parasitarias ha ayudado a fundamentar distintas propuestas sobre su funcionamiento.

En el caso de *S. mansoni*, la Sm14 fue localizada por inmunofluorescencia en la lámina basal del tegumento y el epitelio del intestino, y se detectó la expresión de su mensajero tanto en adultos, como en esquistosómulas y huevos usando RT-PCR (Brito et al. 2002).

En *F. gigantica*, *C. sinensis* y *Mesocestoides vogae* la presencia de FgFABP, CsFABP y MvFABPa y MvFABPb respectivamente, fue determinada en el tegumento, con mayor intensidad en la lámina basal; y en la parénquima, con mayor intensidad en las células alrededor de órganos como el intestino, ovarios, testículos y vejiga, o los corpúsculos calcáreos. Además fue localizada en las ventosas orales y ventrales del primero, y las glándulas vitelinas, huevos y vesículas seminales del segundo (Pankao et al. 2006; Alvite et al. 2008; Chunchob et al. 2010; Huang et al. 2012). La TmFABP de *Taenia multiceps* fue localizada en el cuello de los proglótidos, y entre el tegumento y la parénquima (Nie et al. 2013).

En *Ascaris suum* y *S. japonicum*, las proteínas As-p18 y SjFABPc fueron localizadas en el saco perivitelino de los huevos, y probablemente estén relacionadas con el desarrollo de los mismo (Mei et al. 1997), en el caso del parásito helminto, también se localizó a la proteína confinada en gotas subtegumentarias de material lipídico (Gobert et al. 1997).

II PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las proteínas de unión a ácidos grasos están ampliamente distribuidas en el reino animal y son considerados antígenos candidatos para el desarrollo de vacunas contra infecciones por gusanos planos, aunque han sido escasamente caracterizadas. La caracterización de la proteína de unión a ácidos grasos de la *Taenia solium* ayudará a profundizar el conocimiento existente sobre estas proteínas y a esclarecer sus funciones en parásitos relacionados, así como a determinar su potencial como vacuna.

III OBJETIVOS

1 Objetivo general.

- Caracterizar la proteína de unión a ácidos grasos de la *Taenia solium*, TsFABP1.

2 Objetivos particulares.

- Clonar la secuencia codificante completa de las dos proteínas de unión a ácidos grasos de *Taenia solium* identificadas (TsFABP1 y 2).
- Expresar la TsFABP1 recombinante en bacterias y desarrollar un método para su purificación.
- Caracterizar funcionalmente a la proteína mediante ensayos de unión a ácidos grasos.
- Determinar la ubicación de la proteína en los tejidos de *T. solium* por medio de ensayos de inmunolocalización, así como en otras especies cercanas de taénidos.
- Determinar su potencial como vacuna en el modelo murino de cisticercosis por *T. crassiceps*.

IV MATERIALES Y MÉTODOS

1 Análisis de la secuencias nucleotídicas y aminoacídicas de las proteínas TsFABP1 y 2.

La estructura primaria de la TsFABP1 fue analizada utilizando diversos tipos de software. Primero, se realizó un análisis de su secuencia de aminoácidos para determinar sus características físicas y químicas utilizando el programa ProtParam (Gasteiger J 2006). En segundo término se realizaron análisis con BLAST (herramienta básica de búsqueda de alineamientos en bases públicas de datos: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), tanto con la secuencia de la proteína (blastp) como con la del RNA mensajero (blast n), con el fin de buscar secuencias

con alta similitud reportadas en las bases de datos de la NCBI (Centro Nacional para la Información en Biotecnología) de Estados Unidos.

Con las secuencias proteicas reportadas de otras FABPs parasitarias, así como con los resultados obtenidos en el análisis con BLAST, se realizó un alineamiento para determinar su similitud con la TsFABP1 y con la TsFABP2, para buscar probables sitios conservados dentro de la secuencia. También, y para confirmar que ambas proteínas forman la estructura terciaria característica de las FABPs, se utilizó el programa Phyre (Kelley y Sternberg 2009).

Posteriormente, se hicieron alineamientos con las secuencias nucleotídicas del mensajero y del gen correspondiente de TsFABP1, ambas obtenidas a partir del proyecto de secuenciación del genoma de *T. solium* (Tsai et al. 2013), y con otras FABPs de parásitos, utilizando la herramienta de alineamiento del programa BLAST (bl2seq). Esto para determinar similitudes entre las secuencias, así como coincidencias o diferencias en la posición y la longitud de intrones.

2 Expresión recombinante de la TsFABP1.

La proteína fue expresada en forma recombinante para realizar estudios funcionales. Un fragmento que contenía la secuencia codificante para TsFABP1 fue obtenido de la biblioteca de cDNA del proyecto de secuenciación del genoma de *T. solium*. La secuencia codificante fue subclonada en el vector plasmídico pET23a (NOVAGEN EMD4Biosciences, Merck, Darmstadt, Alemania) usando sitios de corte para endonucleasas de restricción incluidos en los extremos de la secuencia. Las secuencias de los primers utilizados (INVITROGEN, Carlsbad California) fueron 5'-GAT TGG ATC CAT GGA GCC ATT CAT CGG-3' y 5'-GCG ACT CGA GCG CTG CCT TAA CGT AGG-3'.

Con la construcción anterior, se transformaron bacterias *E. coli* BL21-pLys, que fueron seleccionadas por resistencia a ampicilina y a partir de las cuales se purificó plásmido por lisis alcalina con SDS (Purelink Quick Plasmid Miniprep, Invitrogen, Carlsbad, California). La correcta inserción de la secuencia codificante para la TsFABP1 en el plásmido pET23a, así como el marco abierto de lectura en la construcción, que incluye la secuencia codificante para una cola de poli-Hys en el extremo carboxilo terminal, fueron confirmados por secuenciación capilar (ABI Prism 310, Perkin Elmer, Massachusetts).

La expresión de la proteína fue inducida con IPTG 1mM en medio LB líquido, las células fueron colectadas por centrifugación (2040 g, 3 min) y lisadas por

sonicación. Luego de centrifugar por segunda vez, el pellet obtenido fue lavado exhaustivamente con el buffer A (Tris-HCl 50mM, NaCl 100mM, EDTA 1mM, deoxicolato 0.1 %, tritón X-100 0.5%, pH=8.0) y solubilizado en el buffer B (HCl-Gua 5 M, glicina 5 mM, H₃PO₄ 25 mM, pH=3.5). La solución proteica obtenida fue purificada en columnas cromatográficas HiTrap IMAC FF (GE Healthcare, Suecia) por afinidad con Ni²⁺, y la proteína pura fue finalmente dializada contra el buffer C (K₂HPO₄ 5mM, KH₂PO₄ 5mM, KCl 150mM, pH 7.3). La concentración y la pureza de la proteína obtenida (rTsFABP1) fueron determinadas por ensayo Bradford y por densitometría en geles de poliacrilamida teñidos con plata, de manera respectiva.

3 Ensayos de unión a ácidos grasos.

Para los ensayos de determinación de afinidad se utilizó ADIFAB (**Anexo 2**), la rTsFABP y seis sales sódicas de ácidos grasos (Nu Chek Prep, Elysian, Minnesota): palmítico (C16:0), esteárico (C18:0), oleico (C18:1), linoleico (C18:2), linolénico (C18:3) y araquidónico (C20:4). Las sales de ácidos grasos se solubilizaron en una solución antioxidante (butilhidroxitolueno 25 μM, pH=9), en concentraciones de 0.5 a 1 mM; estas soluciones fueron inyectadas con gas nitrógeno (N₂) por 3 minutos para disminuir la cantidad de oxígeno disuelto y almacenadas a -70° C hasta su uso.

El ADIFAB (FFA Sciences LLC, San Diego, California) fue disuelto en HEPES 20mM, NaCl 150mM, KCl 5mM, Na₂HPO₄ 1mM, pH=7.4; que fue utilizado como medio para las determinaciones. Las mediciones fueron realizadas en un espectrofluorómetro (DMX 800 SLM, Holis), con celdas de metacrilato y a temperatura ambiente (25 ± 1° C). Se determinó que las longitudes de emisión del ADIFAB al ser estimulado con un haz de luz a 390 nm y con las condiciones experimentales descritas, eran de 434 nm cuando se encontraba libre y de 506 nm al unirse a un ácido graso, todas las mediciones posteriores se realizaron a estas longitudes.

3.1 Ensayos en ausencia de rTsFABP1.

Se realizaron ensayos para determinar la constante de disociación (K_D) del ADIFAB con los distintos ácidos grasos en las condiciones experimentales. En estos ensayos se hicieron determinaciones de la intensidad de luz emitida a las longitudes antes descritas, en presencia del ADIFAB y una concentración creciente de ácido graso (0 a 43 μM). Los datos obtenidos se substituyeron en las siguientes fórmulas para calcular la K_D:

$$(1) \quad [AGL] = [AG] - \left[[ADIFAB] \frac{Q fR}{1 + (Q fR)} \right]$$

$$\text{Donde} \quad fR = \frac{R - R_0}{R_{\max} - R}$$

[AGL] es el ácido graso libre (no unido a ninguna proteína), [AG] y [ADIFAB] son las concentraciones totales de ácido graso y ADIFAB, R es la relación de intensidad de fluorescencia (F_{506} / F_{434}), y Q la relación (F_0 / F_{\max}) a 434 nm. R_0 y F_0 son el valor de R y la intensidad de fluorescencia en ausencia de ácido graso, mientras R_{\max} y F_{\max} corresponden a los valores cuando toda la proteína presente se encuentra unida al ácido graso. Dado que los valores de R_{\max} , F_{\max} y por tanto Q son imposibles de determinar experimentalmente por la formación de micelas, se les asignaron valores constantes en base a análisis numéricos (Ref 3 manual Invitro), $R_{\max} = 11.5$ y $Q = 19.5$.

Con la ecuación anterior se puede calcular el valor de [AGL] para cada punto de la curva, y con ello el valor de K_D , siendo éste el de la abscisa al origen para la función:

$$(2) \quad f(\text{Log [AGL]}) = \text{Log}(Q fR)$$

3.2 Ensayos en presencia de la rTsFABP1.

Para determinar la K_D de la rTsFABP1 para los 6 ácidos grasos se hicieron determinaciones de la intensidad de luz emitida en las longitudes antes descritas, en presencia del ADIFAB, de la rTsFABP1 y de una concentración creciente de ácido graso (0 a 60 μM).

Para el cálculo de la K_D de la rTsFABP se utilizó (1) para determinar [AGL] y la concentración ácido graso unido a ADIFAB ([AGu]):

$$(3) \quad [AGu] = [AG] - [AGL]$$

Con los datos anteriores, se puede graficar la siguiente ecuación:

$$(4) \quad f \left[\frac{[AGL]}{[rTsFABP1]} \right] = \frac{[AGL] [AGu]}{[rTsFABP1]}$$

Donde [rTsFABP1] es la concentración total de rTsFABP1 en el medio, y de la cual se puede obtener una ecuación para una línea recta del tipo $y = mx + b$; donde la pendiente (m) es igual al inverso multiplicativo de la K_D con signo negativo, y la abscisa al origen es igual a n, siendo n la cantidad de sitios de unión a ácido graso que presenta la rTsFABP1.

4 Sueros hiperinmunes anti-rTsFABP1.

Se produjeron dos sueros hiperinmunes contra la rTsFABP1, utilizando 3 ratones BALB/c machos y un conejo New Zelanda macho, que fueron inmunizados subcutáneamente con tres dosis de 100 y 200 μg de rTsFABP1 respectivamente, con una semana de diferencia entre una dosis y otra. La proteína se administró en conjunto con adyuvante completo de Freund en la primer administración a cada animal, y con adyuvante incompleto en el resto. Se obtuvieron muestras de suero de los animales en el día 21, una semana después de la última dosis. Para utilizar como controles, se obtuvieron sueros de animales inmunizados, bajo el mismo protocolo, con un extracto proteico de bacterias BL21pLys no transformadas. Todos los sueros fueron conservados a -70°C hasta su uso.

4.1 Extractos proteicos.

El extracto proteico de *E. coli* BL21pLys se obtuvo con un procedimiento similar al de purificación de la rTsFABP1. Se concentraron y lisaron las células por centrifugación (2040 g, 3 min) y sonicación y se centrifugó y lavó exhaustivamente el pellet obtenido con el buffer A, para luego solubilizar las proteínas en el buffer B. La concentración proteica de este extracto fue determinada por Bradford.

También se prepararon extractos a partir de cisticercos de *T. solium* obtenidos de cerdos infectados naturalmente, y cisticercos de *T. crassiceps* mantenidos en el laboratorio utilizando el modelo de cisticercosis murina. Los cisticercos fueron lavados con agitación en PBS (10 min), se eliminó el exceso de líquido por decantación y se pesó el contenido (peso húmedo). Posteriormente se agregaron 30 μl de buffer de lisis con inhibidores de proteasas (urea 7 M, tiourea 2 M, CHAPS 4%, Tris 10 mM, EDTA 12.5 mM, PMSF 1 mM, leupeptina 0.1 mM, pepstatina 1 μM) por cada 10 μg de peso húmedo, y se sonicaron las mezclas hasta homogeneizar. Las mezclas fueron centrifugadas (16,000 g, 15 min) y los extractos proteicos (sobrenadantes) se recuperaron y guardaron a -70°C hasta su uso.

4.2 Título de los sueros hiperinmunes.

El título de los sueros fue determinado por ELISA, usando placas (EIA/RIA, Costar, Corning Incorporated, New York) sensibilizadas con rTsFABP 1 µg/ml (100 µl por pozo) en buffer de carbonatos (Na₂CO₃ 0.2 M, NaHCO₃ 0.2 M, pH 9.6) toda la noche a 4°C. Luego de bloquear con leche descremada (2% en PBS), y de lavar exhaustivamente, los pozos se incubaron con diluciones crecientes de uno de los sueros hiperinmunes, desde 1:20 hasta 1: 50 000. Luego de lavar los pozos, se incubaron con los anticuerpos secundarios correspondientes en una dilución 1:3000 (albúmina 1% en PBS). Se utilizaron anticuerpos de cabra anti-IgG de ratón (Sigma, Saint Louis, Missouri) y anti-IgG de conejo (Zymed, Carlsbad, California), ambos acoplados con peroxidasa. Para revelar se utilizó un sustrato de peroxidasa comercial (TMB peroxidase EIA substrate, Bio-Rad, Hercules, California), siguiendo las instrucciones del fabricante. La absorbancia a 650 nm fue determinada por triplicado y el título se definió como el recíproco de la máxima dilución de suero con una absorbancia por encima del punto de corte. El punto de corte se definió como el promedio de absorbancia del control más 3 desviaciones estándar. En estos experimentos, y en los de especificidad, todas las incubaciones se realizaron por 2 h a 37°C, y todos los lavados por 10 min, con Tween 20 (0.05% en PBS) y por triplicado, salvo cuando sea indicado de otra manera.

4.3 Especificidad.

La especificidad de los sueros hiperinmunes y su capacidad de reconocer a la TsFABP1 y a probables FABPs homólogas en otros parásitos, fue determinada realizando electroforesis e inmunotransferencias, usando extractos proteicos de *T. solium* y *T. crassiceps*. Se hicieron electroforesis en geles de poliacrilamida al 15% con los extractos (15 µg) en condiciones reductoras. Las proteínas separadas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (Amersham, Piscataway, New Jersey) e incubadas con albúmina 3% en PBS durante toda la noche a 4° C. Posteriormente, las membranas fueron incubadas con el suero hiperinmune de ratón o de conejo (1:5000, albúmina 1% en PBS) por 2 h a T ambiente. Después de lavar las membranas con Tween 20 (0.05% en PBS), se incubaron con un anticuerpo conjugado a peroxidasa por 1 h a T ambiente. Los anticuerpos utilizados fueron anti-IgG de ratón (1:2000, albúmina 1% en PBS) y anti-IgG de conejo (1:1500, albúmina 1% en PBS), ambos hechos en cabra. Finalmente, las membranas fueron reveladas utilizando OPD, luego de lavar exhaustivamente con PBS.

5 Estudios de inmunolocalización en tejidos de parásitos.

5.1 Obtención y manejo de las muestras biológicas.

Los proglótidos de *T. solium* y *T. saginata*, obtenidos de humanos infectados naturalmente, fueron amablemente provistos por la Dra. Aline S. Aluja (FMVZ, UNAM). Los cisticercos de *T. solium* y *T. pisiformis* fueron igualmente obtenidos de cerdos y conejos infectados naturalmente, siendo los segundos donados por el Dr. I. Flores (Facultad de Ciencias Agropecuarias, UAEM). Finalmente, los cisticercos de *T. crassiceps* cepas WFU y ORF, fueron obtenidos de ratones infectados experimentalmente. Todos los tejidos fueron lavados con PBS y fijados en solución de Zamboni (formaldehído 2%, ácido pícrico 0.2%, pH 7). Luego de fijar, los tejidos fueron deshidratados y embebidos en parafina, hasta su uso.

5.2 Ensayos de inmunohistoquímica.

Se hicieron cortes de 5µm de grosor de los tejidos, que fueron transferidos a portaobjetos recubiertos con poli-L-lisina antes de ser desparafinados y rehidratados. Luego, los cortes fueron incubados con H₂O₂ 3% (con albúmina 5% y Tween 20 0.05% en PBS), lavados, posteriormente incubados con uno de los sueros hiperinmunes o controles y lavados de nuevo. Ambas incubaciones fueron por 1 h a 37°C, los sueros fueron usados en una dilución 1:5000 (con albúmina 2% y Tween 20 0.01% en PBS) y todos los lavados se hicieron con albúmina 2% y Tween 20 0.1% en PBS. Enseguida, los cortes fueron incubados con anticuerpos biotinilados anti-IgG de conejo o ratón según el caso, y luego con una solución de streptavidina marcada con peroxidasa, ambas incubaciones fueron por 30 min a 37°C. Para desarrollar color se utilizó 3-3' DAB, todos los cortes fueron teñidos con hematoxilina y eosina, y fueron fotografiados utilizando un microscopio Olympus BX51.

6 Ensayos de vacunación en el modelo de cisticercosis murina.

La cepa ORF de *T. crassiceps* fue mantenida mediante pases de los cisticercos de un ratón hembra infectado (BALB/c) hacia ratones también hembras BALB/c de entre 6 y 8 semanas de edad. Para lo anterior, se seleccionan 20 cisticercos con diámetro de 2 mm y sin gemas aparentes, y se transfirieron con jeringas (No. 21 o 27) al peritoneo de un ratón receptor. Luego de 2-3 meses, el ratón se sacrificó para recuperar los parásitos de su cavidad peritoneal y realizar un nuevo pase.

6.1 Diseño experimental y protocolo de inmunización.

Ratones BALB/c hembra de entre 6 y 8 semanas fueron divididos en 4 grupos de 5 o 6 individuos cada uno. Los grupos 1 y 2 fueron inmunizados con 50 y 100 µg de rTsFABP respectivamente, ambos en conjunto con adyuvante completo (día 0) o incompleto de Freund (días 14 y 28). El grupo 3 fue inmunizado sólo con adyuvante bajo el mismo esquema de inmunización, y el grupo 4 recibió sólo el vehículo (PBS). En el día 42, todos los ratones fueron retados intraperitonealmente con 10 cisticercos, de manera similar a los pases descritos antes. Luego de 50 días de infección, los ratones fueron sacrificados y los parásitos fueron extraídos de la cavidad peritoneal para ser contados. Se tomaron muestras de suero de todos los ratones en los días 0, 42 y 92, antes de ser inmunizados, retados y sacrificados de manera respectiva. Los sueros se mantuvieron a -70°C hasta su uso.

También se evaluó la viabilidad de los cisticercos recuperados en este experimento. Los cisticercos obtenidos de 2 ratones inmunizados con rTsFABP y elegidos al azar (uno por cada dosis utilizada) se utilizaron para infectar 4 nuevos ratones (2 nuevos ratones por cada ratón original). Cisticercos obtenidos de un ratón no inmunizado elegido al azar, fueron usados como control de infección. La infección se realizó con el mismo método usado para el mantenimiento de la cepa ORF de *T. crassiceps*, descrito anteriormente.

6.2 Evaluación de la respuesta inmune.

Se determinó la presencia de anticuerpos específicos anti-TsFABP1 en los sueros obtenidos. Para lo anterior se realizó un ELISA, similar al descrito en 4.4.2, utilizando rTsFABP1 para sensibilizar las placas (100 ng por pozo), los sueros (dilución 1:2000) como anticuerpo primario y un anticuerpo anti-IgG de ratón acoplado a peroxidasa (1:1000) como secundario. Los sueros preinmunes fueron utilizados como control.

6.3 Ensayos de proliferación celular.

Ratones BALB/c hembras de 6 semanas de edad fueron organizados en 4 grupos de 5 individuos. Dos grupos fueron inmunizados con 50 µg de rTsFABP1, de manera similar a la ya descrita arriba, mientras que otros dos recibieron sólo adyuvante. En el día 42, un grupo inmunizado con adyuvante y uno con TsFABP1 fueron retados con 10 cisticercos de *T. crassiceps*, mientras los ratones de los

otros dos grupos fueron sacrificados y sus bazos extraídos en condiciones estériles. Los grupos infectados fueron sacrificados 50 días después del reto (día 92), los bazos fueron extraídos y los parásitos contenidos en la cavidad peritoneal recuperados y contados.

Se prepararon suspensiones celulares a partir de cada bazo extraído, en 5 ml de medio RPMI (GIBCOBRL, Grand Island, New York) suplementado (L-glutamina 0.2 mM, aminoácidos no esenciales 0.01 mM, penicilina 100 U/ml, estreptomicina 100 µg/ml, suero fetal bovino 10%). Las células fueron posteriormente lavadas centrifugando a 118 g por 5 min, resuspendiendo en RPMI y centrifugando nuevamente. El pellet fue resuspendido en buffer de cloruro de amonio (NH₄Cl 150 mM, NaHCO₃ 10 mM, EDTA 0.004%, pH 7.4) e incubando por 5 min en hielo para provocar la lisis de los eritrocitos presentes en la suspensión celular. Luego de lavar exhaustivamente con RPMI, las células fueron transferidas a placas de 96 pozos en una concentración de 5x10⁵ células por pozo.

A cada pozo con células se le agregó Concanavalina A (ConA, 2 µg/pozo), o extracto proteico de *T. crassiceps* (50 o 100 µg/pozo), o TsFABP1 (10 µg/pozo), y se incubaron a 37°C con 5% de CO₂ durante 48 h. Posteriormente, se agregó metil[³H]timidina (1 µCi/pozo; Amersham, Little Chalfont, UK) y se incubó en las condiciones antes descritas por 18 h. Al término de la incubación, las células se cosecharon y la metil[³H]timidina incorporada fue determinada en un contador de centelleo (Wallac, Turku, Finlandia). Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

7 Análisis estadísticos.

Todos los análisis estadísticos fueron realizados en el programa Excel (Microsoft Office 2003, 11.8342.8341). Las comparaciones de dos grupos de datos fueron hechas con un análisis de varianzas Kruskal-Wallis, seguido de una prueba *post-hoc* de Mann-Whitney. La relación entre dos variables fue determinada por regresión y en todos los casos, valores de p<0.05 fueron considerados como significativos.

V USO Y CUIDADO DE ANIMALES PARA EXPERIMENTACIÓN.

En todos los procedimientos en los cuales se involucraron animales o tejidos, se siguieron los lineamientos establecidos en el Código Ético del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, en particular en lo referente a toma de

muestras de sangre y al sacrificio de los animales. Este código toma como referencia la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Este proyecto fue revisado y aprobado por la comisión respectiva (CICUAL).

VI RESULTADOS

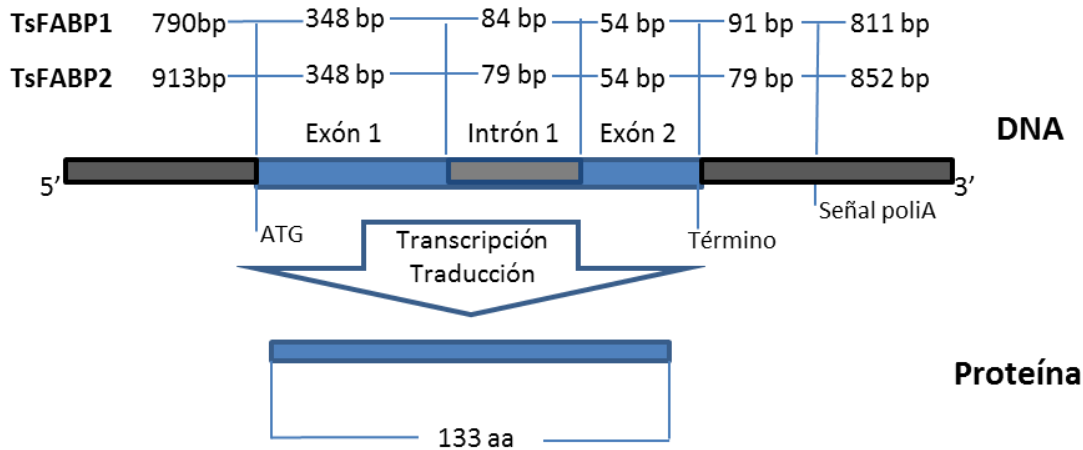
1 Análisis de la secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de las TsFABP1 y 2.

La secuencia nucleotídica de una proteína tipo FABP fue identificada y determinada *in silico*, mediante una búsqueda y análisis de secuencias ortólogas en las bibliotecas de DNA codificante y DNA genómico obtenidas del proyecto de secuenciación del genoma de *T. solium*. Se trata de una proteína de 133 aminoácidos, con un peso calculado de 15.1 kD y un punto isoeléctrico teórico de 8.6. Análisis subsecuentes sugirieron que se trataba de una secuencia ortóloga con la EgFABP1 de *E. granulosus*, por lo que se decidió designarla como TsFABP1. Posteriormente, se encontró una segunda secuencia codificante para una FABP, que resultó ortóloga de la EgFABP2, por lo que se designó como TsFABP2.

En el caso de la TsFABP1, el fragmento genómico codificante fue de 486 pares de bases (pb) y presentó un solo intrón de 84 pb de la posición 349 a la 432, que fue identificado con el programa de predicción NNSPLICE (Reese et al. 1997); la posición y longitud del intrón se confirmaron al comparar las secuencias genómica y de cDNA. El mismo fragmento genómico contenía una posible secuencia de poliadenilación (AAUACA) (Chen y Shyu 1995), 91 pb en dirección 3' a partir del codón terminal, iniciando en la posición 577 (**Figura 3**).

En el caso de la TsFABP2 el fragmento genómico codificante fue de 481 pb, presenta un solo intrón en la misma posición pero de una longitud 5 pb menor, de la posición 349 a 427, que fue identificado y confirmado de manera similar a TsFABP1. El fragmento genómico que codifica para la TsFABP2 presenta también una posible secuencia de poliadenilación, pero con una secuencia diferente (AAUAAA) (Chen y Shyu 1995) y en distinta posición, 79 pb en dirección 3' a partir del codón terminal, iniciando en la posición 560 (**Figura 3**).

3a



3b

		60
FABPTs1	<u>ATG</u> GAGCCATTCATCGGTACCTGGAGGATGGAGAAGAGTGAGGGTTTCGACAAAATCATG	
FABPTs2	A	C
		120
FABPTs1	GAACGCCTCGGAGTGGATTTTGTCACTCGCAAGATGGGCAATTTGATGAAACCCAGCTTG	
FABPTs2	G T C A T	G A
		180
FABPTs1	ATAGTCAGTGATCTGGGTGATGGCAAGTATAGCATGCGATCGGAGAGCAAGTTCAAGACC	
FABPTs2	A T C G C A C A	
		240
FABPTs1	ACTGAATTCACCTTCAAACCTGGGAGAGAAGTTTAAGGAGACCACTCCTGACTCGCGTGAA	
FABPTs2	T C A T G G C GT C G A C	
		300
FABPTs1	GTCACGTCGCTAATCACAGTGGAGAACGGAGTGATGAAGCAGGAGCAGGTTGGCAAGGGC	
FABPTs2	T AA GC G G T G C	A
		360
FABPTs1	AAGACCACCTACATTGATCGTGTAATTGAAGGCAATGAGTTAAAAACCGT AGGCGCAATT	
FABPTs2	C G G C G G	A
		418
FABPTs1	TTTAAAAGGCATAAAGCCC-<u>ACTTTTTTGTACTTTTTCT-GTCATTTAGTGTGAAATTCAT</u>	
FABPTs2	C G A A A - CTG -- A -G CA A C G	
		478
FABPTs1	TTCTTTAATTTTAG ACCGTAAAGGTTCGATGAACTGGTTTTCGCGTTCGCAACCTACGTTAAGG	
FABPTs2	C--- CA T TCGCGA	
		537
FABPTs1	CAGCGTAAAGGGAAATTCCTTATCAATTTATTT-CTTCCCTACCTCTACTCCACACC	
FABPTs2	G AT A GGC A T ATC CC C CC A TT AC GGT T	
	→	588
FABPTs1	TTTCCCTTCATCTCCATCCATGCTCCAAGATTGACGTGAAATACAAAGCG	
FABPTs2	C CT ACTCGT TT GTAC CTGA AATAAA TG TAA TCGCTCTT C	
	→	

Figura 3. Genes de la TsFABP1 y 2 **a.** Estructura de los genes de la TsFABP1 y TsFABP2. **b.** Alineamiento de las secuencias codificantes para TsFABP1 y 2 con UTRs. Los codones de inicio (ATG) y de término (TAA) se indican con un

subrayado. El único intrón se encuentra enmarcado con líneas negras. La posición de las señales de poliadenilación putativas se indican con flechas (→). La numeración corresponde a la FABPTs1.

A partir de las dos estructuras primarias (TsFABP1 y TsFABP2), se realizó un análisis de las estructuras secundarias y terciarias utilizando el programa Phyre (ver **Materiales y Métodos**), encontrándose que ambas presentan un cuerpo de “barril” formado por 10 láminas β , con una “tapa” formada por 2 hélices α . Se observó además una tercera hélice α , característica de la subfamilia iv de las iLBPs (**Figura 4**). La estructura anteriormente descrita confirmó que se trataba de proteínas tipo FABP y por tanto, de una iLBP (**Anexo 1**).

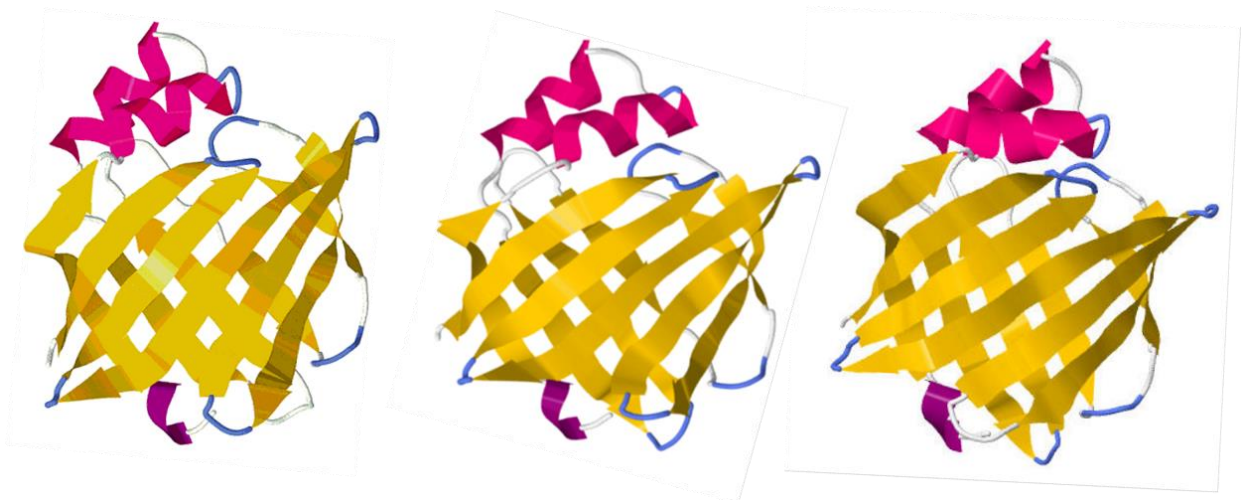


Figura 4. Estructura terciaria de las TsFABP1 y 2. TsFABP1 (izquierda), TsFABP2 (centro), FABP8 humana (derecha). Las láminas β que forman el cuerpo del barril se presentan en amarillo y las hélices α en rosa o morado, la presencia de 3 hélices α es característica de la subfamilia *iv* de las iLBPs (**Anexo 1**). (Modelado en el programa Phyre) (Kelley y Sternberg 2009).

Ambas secuencias codificantes y sus respectivas secuencias de aminoácidos deducidas: TsFABP1 y TsFABP2, fueron registradas en GenBank con los números de acceso AAK12096.1 y AAK12094.1, respectivamente (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>).

1.1 Comparación con la secuencia de otras FABPs.

Cuando se alineó la secuencia aminoacídica de la TsFABP1 deducida a partir de la secuencia codificante, con las secuencias de FABPs de otros parásitos céstodos y tremátodos usando el programa Clustal W (Thompson et al. 1994), se encontró una alta identidad de las TsFABP1 y TsFABP2 con las secuencias de las FABPs de *E. granulosus*, EgFABP1 y EgFABP2 (**Figura 5**). Como era de esperarse, TsFABP1 y 2 mostraron una similitud mucho menor con las secuencias de tremátodos y del humano (28 y 44%, respectivamente).

Tanto la TsFABP1 como la 2, presentan una serie de residuos conservados, entre los que se encuentran algunos que ha sido relacionados con la estabilización de los extremos carboxílico e hidrofóbico de los ácidos grasos dentro del barril que forma la FABP. Estos residuos son característicos de la subfamilia iv de las iLBPs, y se repiten en la mayor parte de las secuencias alineadas, lo cual sugiere que pertenecen a la misma subfamilia (**Anexo 1**) (Hanhoff et al. 2002).

Por la gran similitud en las secuencias de las dos FABPs de la *T. solium*, se decidió concentrar los esfuerzos subsecuentes en la TsFABP1, cuyo mensajero fue uno de los más abundantes que se identificaron como parte del proyecto de secuenciación del genoma del parásito (Tsai et al. 2013).

2 Expresión recombinante de TsFABP1.

La secuencia codificante para la TsFABP1, salvo por el codón de término, fue clonada en el vector de expresión pET23a. Las células BL21pLys transformadas con esta construcción presentaron altos niveles de expresión para una proteína de aproximadamente 17 kDa, que corresponde al peso molecular esperado para la proteína recombinante. La purificación de la proteína recombinante por cromatografía de afinidad a Ni²⁺ permitió alcanzar una pureza mayor a 95%, de acuerdo a lo determinado por densitometría en geles de poliacrilamida teñidos con plata. (**Figura 6**). El rendimiento de la proteína fue de 1.5 mg por cada cultivo de 50 ml de células transformantes inducidas.

	10	20	30	40	50	60
TsFABP1	ME-PFIGTWRMEKSEGF	DKIMERLGVDFVTR	TKMGNLMKPSLIV	SDLGDGKYSMRSE	SKE	KT
TsFABP2		K	YF	N I	R N	
EgFABP1	A L	K		V N T	G K	T
EgFABP2		K	YF	M N I	R N	
MvFABPa	A L S	KL KH	EV QK	G L QA K A	T C	K T N
MvFABPb	D A L S	KLS	EV RH	N IA A TL	TVTITSV	R H KL T N
FgFABP1	A D V S	KYGD	NMEAYLKK	ISSDMVDKILNA	EFTFTLE	N-QMTIKMV SL T
FgFABP3	A N V S	KL Q	NM AVLQK	INVIK LITSS	EITFTLE	N- MT KTV AL T
Fh15	A D V S	KYGH	NMEAYLKKI	SSDMVDKILNA	EFTFTLE	N- MTIKMV SL T
FASHE2	A D V S	KL H	NM GVWKA	PSDMVDKARNE	EFTFELE	N- MTIKMV SL T
FASHE3	A N V S	KL Q	NM AVLQK	INVIK LITSS	EITFTLE	N- MT KTV AL T
SbFABP	S T L K	KLSE	HNF AV SK	SWA QI TVT	TVTFTMD	- MT LT T N
Sm14	S S L K	KLSE	HNF AV SK	SWA QI TVT	TVTFTMD	- MT LT T N
SjFABPc	S S L K	KLSE	HNF AV SK	SWA QI TVT	TVTFTMD	-TMT LT T N
FABP8	SNK L	KLVS	N DY KA	GLA L A	TV I KK	-IITI T T N

	70	80	90	100	110
TsFABP1	TEFTFKLGEKFKETTP	DSDREVTSLITVEN	-GV-MKQEQVGK	GK-TTYID	RVIENELKTTV
TsFABP2	S IS R	Q V	M ML D	L D	E A
EgFABP1	CS	V	A	H DD T V	E V A
EgFABP2	S S	Q V	M ML D	L D	VY RA
MvFABPa	E	E E	G T Q T	LD- DTL V	-E TI
MvFABPb		ECD V A	G K K T	MD- ST HV	-E H E DKML
FgFABP1	KIT TF	E E A	GKTAMTTV	KDSE-SK T VTT	PEY HVV EVV DKMIA W
FgFABP3	VIS TF	E E A	G T MTTF	KDSD-SKIS V	KCPEN HVV EVT GKMIA
Fh15	KIT TF	E E E	GKK MTKV	KDSE-SK T VIK	PEC I EVV EVV DKMIA W
FASHE2	KTT TF	E DE F	N T M TV	KDSE-NKIT V K	PEH H V EVT DKMVI I
FASHE3	VIS TF	E E A	G T MTTF	KDSD-SKIS V	KCPEN HVV EVT GKMIA
SbFABP	LSC F	E E K S	G N K VVEKNSE-SKLT	T DPKN	V V EVD DTM
Sm14	LSC F	E D K S	G N K VVEKNSE-SKLT	T DPKN	V V EVD DTM
SjFABPc	LSV F	-E D K S	G S K VV	KDSE-SKITH T	KDSKN V V E V DTM
FABP8	IS	QE E	A N KTK	IV LQRG-S-LN	V RWD E - K KLVNGKMVAEC

	120	130	Identidad con	Identidad con
			TsFABP1 %	TsFABP2 %
TsFABP1	KVDELVCV	RTYVKAA		
TsFABP2	A	SRGM	. . . 80	
EgFABP1	V C	S V	. . . 82	. . . 83
EgFABP2	A C	SRGM	. . . 79	. . . 94
MvFABPa	DV ST I	I-	. . . 67	. . . 58
MvFABPb	T D SK E	TRC-	. . . 54	. . . 49
FgFABP1	T GDVKA	T LL -	. . . 28	. . . 28
FgFABP3	T GDVKA	NN H V-	. . . 33	. . . 33
Fh15	T GDVKA	T LL -	. . . 28	. . . 29
FASHE2	T GDVKA	N LR M-	. . . 32	. . . 32
FASHE3	T GDVKA	NN H V-	. . . 33	. . . 33
SbFABP	T GDVTAI	N KRLS	. . . 38	. . . 38
Sm14	T GDVTAI	N KRLS	. . . 38	. . . 36
SjFABPc	T DVTAI	N KRL-	. . . 38	. . . 35
FABP8	MKGV	T I E V-	. . . 44	. . . 44

Figura 5. Alineamiento de las TsFABP1 y 2 con otras FABPs de parásitos y una humana. En gris se marcan los residuos conservados característicos de la subfamilia iv de las iLBPs (F58, R107, R127 y Y129) (**Anexo 1**) (Hanhoff et al. 2002). Los números de acceso en GenBank de las proteínas enlistadas son:
TsFABP1: AAK12096.1, TsFABP2: AAK12094.1, EgFABP1: AAK12096.1, EgFABP2: AAK12094.1, MvFABPa: ABO93625.3, MvFABPb: ABO93626.3, FgFABP1: AAD23998.1, FgFABP3: ADJ17490.1, Fh15: Q7M4G0.3, FASHE2: Q7M4G1.2, FASHE3: Q9U1G6.1, SbFABP: AAT39384.1, Sm14: AAL15461.1, SjfFABPc: AAA64426.1, FABP8: NM_002677.3.

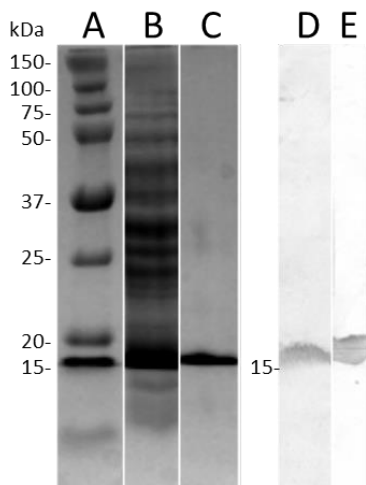


Figura 6. Expresión recombinante y reconocimiento inmune de rTsFABP1. A) Marcadores de peso molecular; B) Extracto crudo de células BL21PLys transformadas; C) rTsFABP purificada por cromatografía de afinidad a níquel; D) Inmunotransferencia de un extracto crudo de cisticercos de *T. solium* incubado con suero hiperinmune anti-rTsFABP de ratón; E) Inmunotransferencia de un extracto crudo de cisticercos de *T. crassiceps* incubado con suero hiperinmune anti-rTsFABP1 de conejo.

3 Ensayos de unión a ácidos grasos.

Una vez que se dispuso de la cantidad suficiente de TsFABP1, se realizaron ensayos espectrofluorométricos para determinar si la proteína recombinante era funcional, es decir, si era capaz de unir ácidos grasos. Además, para determinar la afinidad de la proteína hacia cada ácido graso, se llevaron a cabo ensayos de competencia. En estos ensayos se hizo competir a la proteína comercial ADIFAB contra la TsFABP1 por la unión con 6 distintos ácidos grasos con diferente longitud y nivel de insaturación. Los 6 ácidos grasos fueron seleccionados por su abundancia en los hospederos naturales de la *T. solium* (Barkia et al. 2011; Nuernberg et al. 2011; Wiecek et al. 2011).

Con el fin de determinar si el ADIFAB es capaz de unir ácidos grasos en las condiciones experimentales y por tanto validar las determinaciones posteriores, se calcularon valores de K_D correspondientes para esta proteína con cada uno de los ácidos grasos a evaluar. Esta determinación se realizó siempre antes de realizar cualquier ensayo en presencia de rTsFABP1. Los valores obtenidos se presentan en la **Tabla 3**. También se presentan los valores reportados de K_D para ADIFAB en la literatura (Richieri et al. 2000).

Tabla 3. Constantes de disociación (K_D) para ADIFAB

Sal de ácido graso	K_D experimental \pm D.E.*	K_D reportada
Palmitato (16:0)	239.3 \pm 16.1	330
Estearato (18:0)	97.7 \pm 29.4	80
Oleato (18:1)	258.7 \pm 20.7	280
Linoleato (18:2)	809.7 \pm 26	940
Linolenato (18:3)	2331.3 \pm 51.3	2500
Araquidonato (20:4)	1331.7 \pm 11.9	1630

Todos los valores en nM. *D.E.: Desviación estándar.

Una vez determinada la correcta unión del ADIFAB con los ácidos grasos, se procedió a realizar los ensayos en presencia de la rTsFABP1. Como resultado de estos ensayos se obtuvieron valores de K_D y de n para la proteína recombinante, que se reportan en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Constantes de disociación (K_D) y sitios de unión (n) para rTsFABP1.

Sal de ácido graso	K_D experimental \pm D.E.*	$n \pm$ D.E.
Palmitato (16:0)	140.3 \pm 26.3	0.73 \pm 0.12
Estearato (18:0)	515.2 \pm 23.7	0.71 \pm 0.11
Oleato (18:1)	456.1 \pm 13.7	0.65 \pm 0.04
Linoleato (18:2)	680.9 \pm 13.1	0.63 \pm 0.08
Linolenato (18:3)	289.7 \pm 43.3	0.62 \pm 0.10
Araquidonato (20:4)	14.4 \pm 6.2	0.68 \pm 0.07

Todos los valores en nM. *D.E.: Desviación estándar.

4 Sueros hiperinmunes.

Se obtuvieron sueros hiperinmunes inyectando subcutáneamente 250 ug de rTsFABP a ratones o conejos en adyuvante completo e incompleto de Freund. Los sueros hiperinmunes obtenidos presentaron títulos de 1:18,000 (conejo) y 1:14,500 (ratón), determinados por ELISA contra rTsFABP1. Ensayos de electroforesis e inmunotransferencia de extractos proteicos de *T. solium* y *T. crassiceps* demostraron que ambos sueros hiperinmunes reconocían una sola banda con peso aproximado de 17 kDA en ensayos de (**Figura 6**).

5 Localización en tejido de parásitos helmintos.

Los mismos sueros hiperinmunes fueron utilizados para llevar a cabo experimentos de inmunolocalización de la TsFABP1 en los tejidos de varias especies de larvas y adultos de Taénidos. Para ello se realizaron ensayos de inmunohistoquímica en cisticercos de *T. solium*, *T. pisiformis* y *T. crassiceps* (cepas ORF y WFU), además de proglótidos de *T. solium* y *T. saginata*.

5.1 Cisticercos de *T. solium*, *T. pisiformis* y *T. crassiceps*.

Con el fin de evitar reacciones cruzadas debidas al uso de tejidos y anticuerpos primarios provenientes de la misma especie, se utilizó el suero hiperinmune anti-rTsFABP de ratón en los cortes de *T. solium* y *T. pisiformis*, y el suero de conejo en los tejidos de *T. crassiceps*.

Se observó una reacción positiva intensa a lo largo de todo el tegumento del canal espiral en *T. solium* y *T. pisiformis*, en el primero es evidente además la tinción de los citones subtegumentarios, localizados por debajo de la membrana basal, y del tejido alrededor de los mismos, además de unas estructuras localizadas en la superficie del tegumento. A diferencia de los anteriores, en *T. crassiceps* WFU no existe reacción en el tegumento asociado al escólex o a los citones subtegumentarios, pero sí hay una fuerte reacción positiva difundida en el parénquima del primero. En ambas cepas de *T. crassiceps* se observa además una clara tinción positiva, extendida por todo el tejido conectivo del parénquima de la membrana que recubre al parásito, pero no así en su tegumento o en lo que aparentan ser corpúsculos calcáreos y conductos protonefridiales. Lo anterior contrasta con lo encontrado en *T. solium* y *T. pisiformis*, donde no se observa tinción en dicha membrana (**Figura 7**).

Figura 7 (1 de 3)

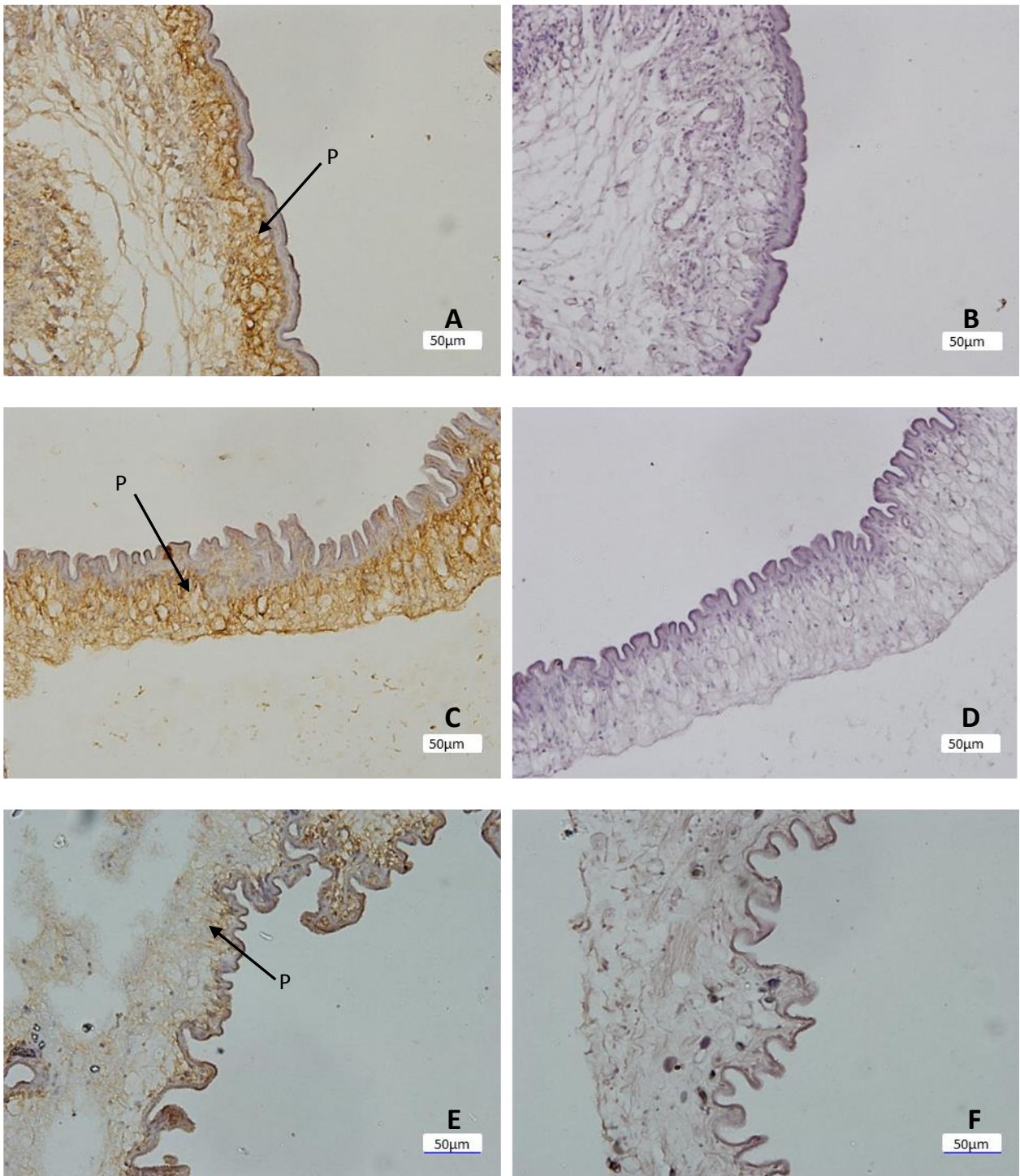


Figura 7 (1 de 3). Inmunolocalización de TsFABP1 y probables proteínas homólogas en cisticercos. Cortes de tejido de *T. crassiceps* cepa ORF (A y C) y cepa WFU (E). Controles negativos: B, D y F. Se señala la reacción positiva en la parénquima vesicular (P).

Figura 7 (2 de 3)

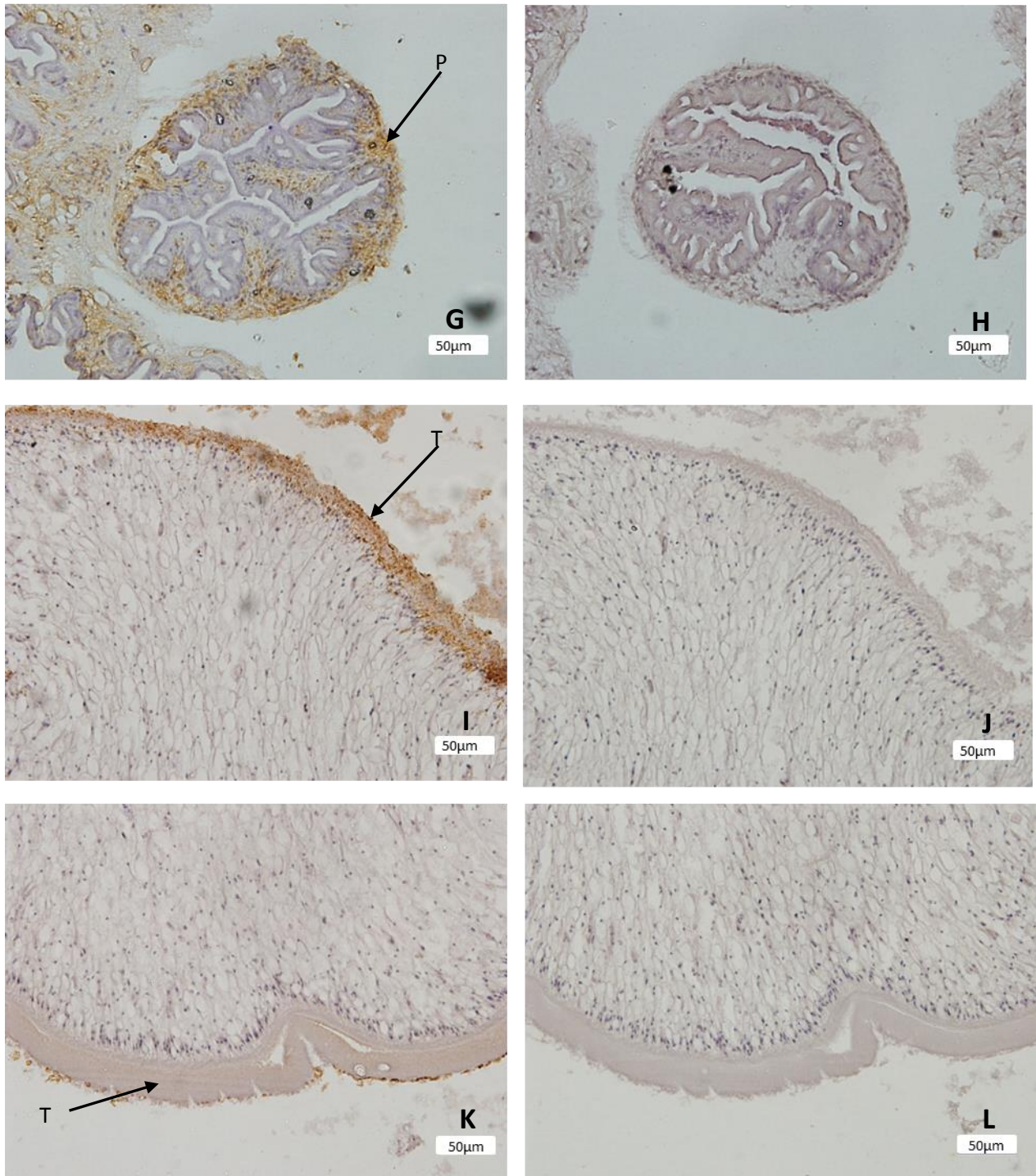


Figura 7 (2 de 3). Inmunolocalización de TsFABP1 y probables proteínas homólogas en cisticercos. Cortes de tejido de *T. crassiceps* cepa WFU (G) y *T. pisiformis* (I y K). Controles negativos: H, J y L. Se señala la reacción positiva en la parénquima asociada al scolex (P) y en el tegumento de canal espiral (T).

Figura 7 (3 de 3)

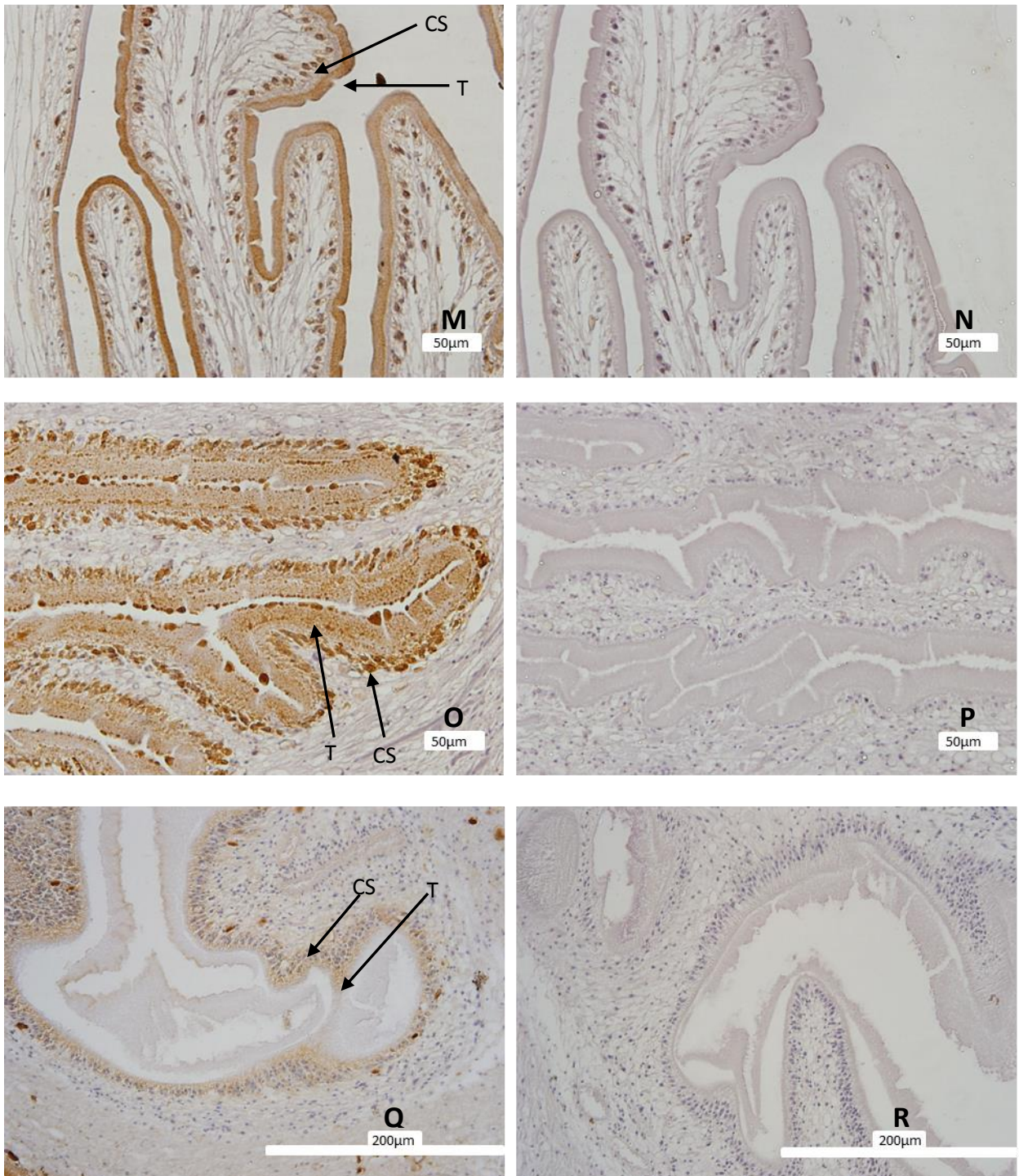


Figura 7 (3 de 3). Inmunolocalización de TsFABP1 y probables proteínas homólogas en cisticercos. Cortes de tejido de *T. solium* (M, O y Q). Controles negativos: N, P y R. Se señala la reacción positiva en el tegumento de canal espiral (T) y en citones subtegumentarios (CS).

5.2 Gusanos adultos de *T. solium* y *T. saginata*

En el caso de los gusanos adultos, las tinciones se realizaron utilizando suero hiperinmune anti-rTsFABP1 de ratón. Se detectó una reacción muy extendida en *T. saginata*, abarcando el tegumento, los citones subtegumentarios y la parte más externa del parénquima, así como en las paredes de los úteros. En *T. solium*, la tinción se limitó a la parénquima que circunda los citones subtegumentarios, estando ausente del resto de las estructuras. En los huevos de ambas especies no se localizó a la proteína, la aparente tinción del embrioforo no parece ser una reacción positiva, pues se observa también en los controles respectivos. (**Figura 8**).

6 Ensayos de vacunación.

Se utilizó el modelo de cisticercosis murina de *T. crassiceps* para determinar el potencial que la rTsFABP1 tiene como vacuna. La proteína se administró subcutáneamente en un esquema de 3 dosis en conjunto con adyuvante completo e incompleto de Freund, seguida de un reto intraperitoneal con cisticercos de *T. crassiceps* cepa ORF. Se realizaron 3 experimentos independientes con entre 5 y 6 animales por grupo.

6.1 Reducción en la carga parasitaria.

La administración de rTsFABP1 produjo una reducción aproximada de 45% en la cantidad de parásitos recuperados de los grupos inmunizados con respecto a los animales que fueron inmunizados con el adyuvante sólo. No se encontraron diferencias entre los grupos inmunizados con 50 y 100 µg de rTsFABP1. Además, 4 de los 34 animales inmunizados con rTsFABP1 fueron protegidos totalmente contra la infección.

Los cisticercos recuperados de los animales inmunizados eran indistinguibles morfológicamente de los recuperados en los grupos control, y en ningún caso se observaron cisticercos coloidales o calcificados. Todos los cisticercos recuperados fueron capaces de infectar ratones al ser administrados de la manera descrita en **Materiales y Métodos**.

Figura 8

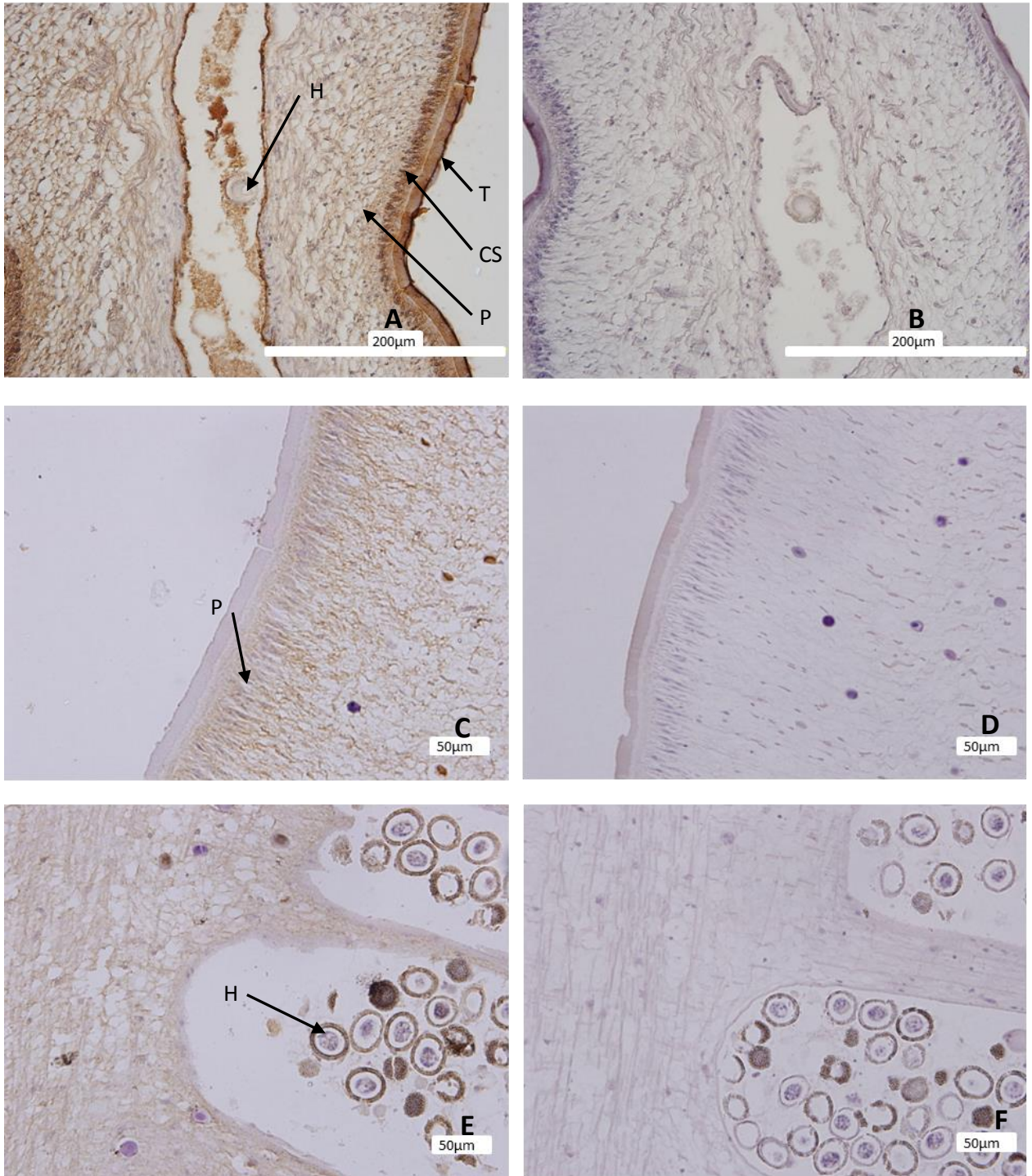


Figura 8. Inmunolocalización de TsFABP1 y una probable proteína homóloga en gusanos adultos. Cortes de tejido de *T. saginata* (A) y *T. solium* (C y E). Controles negativos: B, D y F. Se señalan los huevos (H), y la reacción positiva en citones subtegumentarios (CS), la parénquima (P) y tegumento del proglótido (T).

Tabla 5. Reducción en carga parasitaria.

Tratamiento	Infectados/total	Protegidos (%)*	Promedio parásitos (rango)	Reducción (%)**	P
Vehículo	16/16	-	768 (409-1188)	-	-
Adyuvante	14/14	-	636 (462- 798)	-	-
50 µg rTsFABP	13/16	12.5	369 (0 - 733)	41.9	0.0336
100 µg rTsFABP	17/18	5.6	328 (0 - 568)	48.4	<0.0001

p fue determinado para los grupos de animales inmunizados en comparación con el grupo al que se administró sólo adyuvante, utilizando la prueba Kruskal-Wallis con una prueba *post hoc* Mann-Whitney.

*El porcentaje de animales protegidos corresponde a aquellos que no presentaron la infección después del reto.

**El porcentaje de reducción fue calculado contra el promedio de parásitos recuperados en el grupo al que se administró sólo adyuvante.

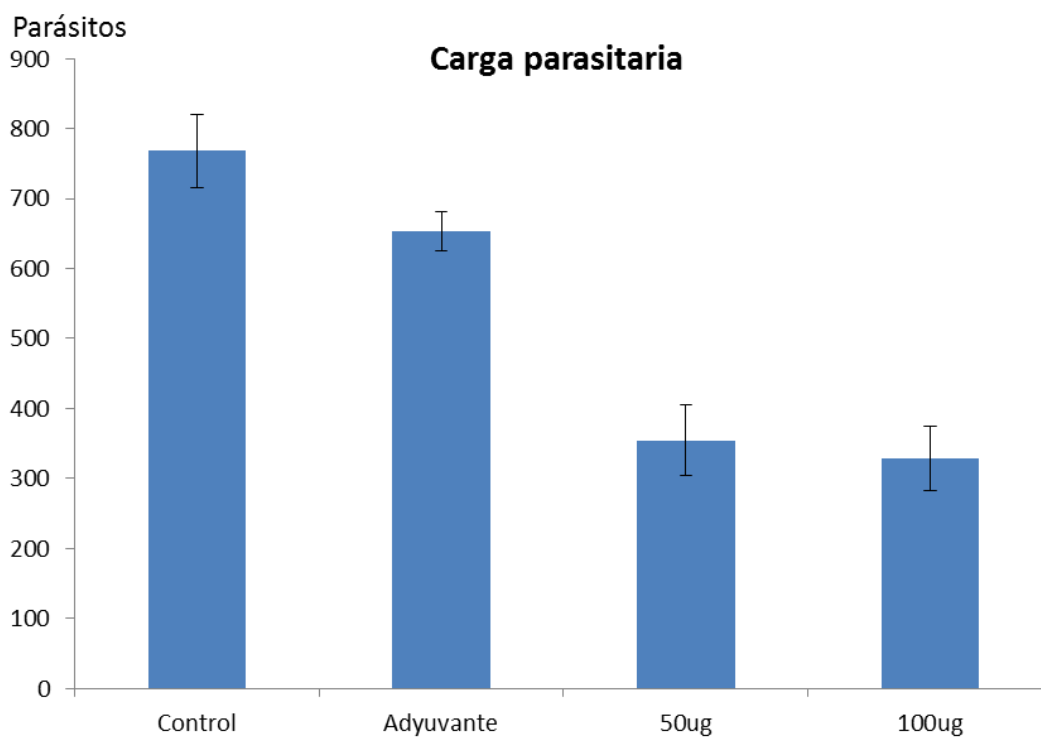


Figura 9. Reducción en la carga parasitaria de animales inmunizados. Carga parasitaria promedio por ratón. Los ratones fueron inmunizados con 50 o 100 µg

de rTsFABP1 en 3 ocasiones. Los grupos control recibieron sólo adyuvante o el vehículo.

6.2 Síntesis de anticuerpos específicos en animales inmunizados.

En el suero de los animales a los que se administró rTsFABP1 se encontraron anticuerpos IgG específicos anti-rTsFABP1 después de la primera inmunización, llegando a su máximo después de la tercer inmunización. Los sueros preinmunes, o los de los animales inyectados con adyuvante o vehículo, no presentaron IgG específicos anti-rTsFABP sino hasta después de haber sido retados con los cisticercos de *T. crassiceps*. No se encontraron diferencias en los niveles de IgG específicos anti-rTsFABP1 entre los animales inmunizados con 50 y 100 µg de proteína a ningún tiempo ($p > 0.05$).

6.3 Respuesta inmune celular.

Para determinar la respuesta celular asociada a la inmunización con rTsFABP1, se realizaron ensayos de proliferación a partir de las células del bazo de los animales inmunizados. Las células fueron re-estimuladas con extracto proteico de *T. crassiceps* o con la rTsFABP1. Los linfocitos de ratones inmunizados presentaron un índice de proliferación significativamente mayor que los controles o los que recibieron sólo adyuvante ($p < 0.05$). Los máximos índices de proliferación se obtuvieron al día 94 del experimento, es decir después del reto con *T. crassiceps* y re-estimulando con el extracto proteico o con rTsFABP1.

Tabla 6. Respuesta humoral de ratones inmunizados con rTsFABP1.

Tratamiento	Día 0	Día 14	Día 28	Día 42	Día 94
Vehículo	0.08±0.02	0.06±0.04	0.06±0.04	0.06±0.02	0.63±0.19
Adyuvante	0.07±0.02	0.05±0.04	0.11±0.03	0.19±0.05	0.64±0.14
50 µg	0.09±0.02	1.06±0.07	1.29±0.19	1.3 ±0.22	1.39±0.19
100 µg	0.07±0.01	1.1 ±0.16	1.22±0.18	1.35±0.18	1.36±0.20

Datos de densidad óptica promedio±D.E. (desviación estándar). Ambos tratamientos presentan diferencia significativa con respecto a los controles a partir del día 14 del estudio ($p < 0.05$). p fue determinado utilizando la prueba Kruskal-Wallis con una prueba *post hoc* Mann-Whitney.

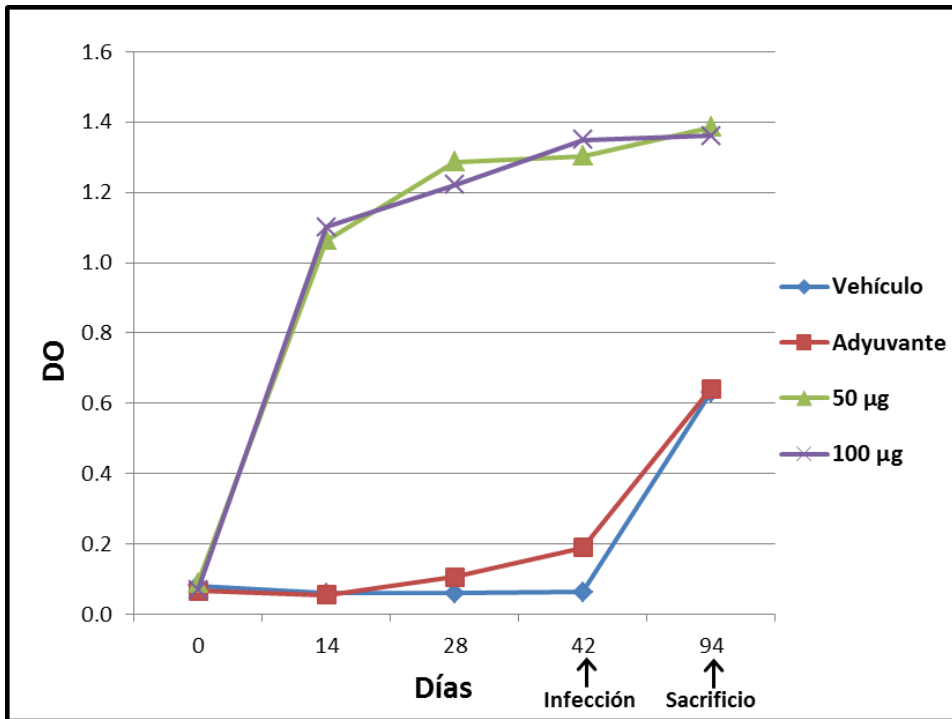


Figura 10. Respuesta humoral de ratones inmunizados con rTsFABP1. Los ratones fueron inmunizados con 50 o 100 µg de rTsFABP1 y se obtuvieron muestras de suero en los días 0, 14 y 28 del ensayo. Los animales fueron infectados con 10 cisticercos de *T. crassiceps* cepa ORF en el día 42 y sacrificados para la recolección de parásitos el día 94 del ensayo. Se realizaron 3 experimentos independientes, se muestran los resultados en conjunto.

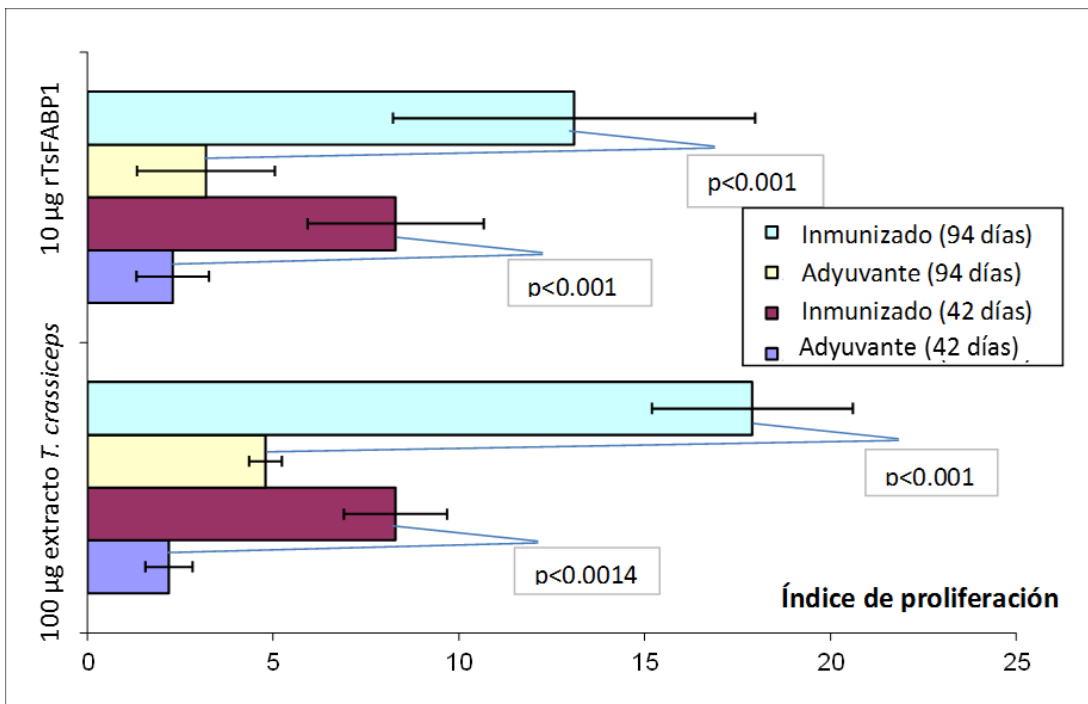


Figura 11. Ensayos de proliferación de linfocitos. Las células fueron obtenidas de

ratones que fueron inmunizados con el adyuvante o con 50 µg de rTsFABP1. No se encontraron diferencias estadísticas entre las células que fueron re-estimuladas con 10 µg rTsFABP1 o con 100 µg de extracto proteico de *T. crassiceps*.

VII DISCUSIÓN

Las FABPs se encuentran ampliamente distribuidas en el reino animal y han sido reportadas en diferentes parásitos helmintos, incluidos los cestodos. En este trabajo, se describe el análisis de la secuencia de dos FABPs de *T. solium*, y la expresión recombinante, la caracterización funcional, la localización tisular y la determinación del potencial como vacuna de una de ellas, la TsFABP1.

Como era de esperar, las secuencias aminoacídicas de las TsFABP1 y 2 mostraron mayor identidad (79-94%) con las FABPs de *E. granulosus* que con cualquier otro de los parásitos que cuentan con al menos una proteína de esta familia reportada, puesto que ambos parásitos pertenecen a la familia Taenidae. La identidad con proteínas de otros parásitos, como los tremátodos *S. mansoni*, *S. japonicum* y *Fasciola hepatica* (28-33%), o con las del ser humano, resultó mucho más baja (43% o menor). Dado que en esta familia de proteínas la secuencia está directamente ligada a la función, y más específicamente a la afinidad de unión por estructuras lipídicas, podría esperarse que las FABPs participen en procesos similares en cestodos, y que su papel dentro del metabolismo de los mismos sea cercano o equivalente. Sin embargo, hay casos en los que el cambio de un solo residuo puede derivar en una modificación radical de su afinidad y (o) de su función (Martin et al. 2013).

En la secuencia de aminoácidos se encontraron además algunos residuos que se conservan en casi todas las proteínas ortólogas reportadas en parásitos. Estos residuos conservados han sido utilizados para diferenciar entre diferentes subfamilias de iLBPs (**Anexo 1**). En el caso de todas las proteínas alineadas en la **Figura 5** los residuos conservados (F58, R107, R127 y Y129) indican su probable pertenencia a la subfamilia iv. Estos residuos han sido relacionados con la estabilización de los extremos carboxílico y alifático en el complejo ácido graso-proteína (Hanhoff et al. 2002). Cabe mencionar que no se han reportado secuencias o residuos conservados que permitan el reconocimiento de las FABPs por otras proteínas, como receptores o enzimas. Lo anterior puede deberse a que la mayor parte de las FABPs, incluida la EgFABP1 de *E. granulosus*, presentan un mecanismo de carga y descarga de ácidos grasos colisional, detallado en el **Anexo 1**.

La asociación de las TsFABP1 y 2 con la subfamilia iv de las iLBPs fue reforzada al observar su estructura terciaria predicha, en la que se observa una tercera hélice α , característica de la familia antes mencionada (**Figura 4**) (**Anexo 1**). Debe señalarse que la presencia de la tercera hélice α no se ha relacionado con la capacidad de la proteína de unir grupos lipídicos.

Al analizar las estructuras de los genes que codifican para las TsFABP1 y 2, se encontraron nuevas similitudes de las FABPs de *T. solium* y *E. granulosus*. Como la posición de un intrón único, hecho resaltable por la alta variabilidad en la longitud, número y posición de los mismos en las FABPs en general (Alvite et al. 2008). Se identificó también una señal de poliadenilación en el gen de la TsFABP1, idéntica a la encontrada en los genes que codifican para la malato deshidrogenasa de *T. solium* (Nava et al. 2011), y la SjFABPc de *S. japonicum* (Becker et al. 1994), aunque diferente a la encontrada en el gen de la TsFABP2.

Los ensayos de unión a ácidos grasos aportaron información acerca de las posibles funciones de las FABPs en *T. solium*, además de confirmar la funcionalidad de la proteína recombinante, que fue capaz de unir todos los ácidos grasos ensayados. Los resultados de los ensayos en ausencia de la rTsFABP1 sirvieron para confirmar el correcto funcionamiento del ensayo y dar validez al mismo. La K_D obtenida utilizando el ADIFAB fue cercana a lo reportado en la literatura a pesar de la variabilidad del método. También, el número de sitios de unión para la proteína (n) calculado fue en general de entre 0.6 y 0.7, lo que indica que la proteína tiene un solo sitio de unión a ácidos grasos. El valor teórico ideal para n es 1, pero este valor difícilmente se alcanza de manera experimental (Richieri et al. 1994).

En el ensayo en presencia de la rTsFABP1, los resultados muestran en general una mayor afinidad por ácidos grasos de cadena larga con insaturaciones, además de unir un solo ácido graso a la vez. Nuevamente, lo anterior permite relacionar a esta proteína con la subfamilia iv de las FABPs, caracterizada por unir ácidos grasos con una conformación en "U". También se puede descartar su pertenencia a la subfamilia ii que tienen capacidad de unir 2 ácidos grasos a la vez, y a la familia i que tiene como principales ligandos al retinol y sus derivados. Finalmente, la subfamilia iii está compuesta únicamente por la I-FABP, presenta residuos conservados diferentes a los que presentan las TsFABP1 y 2, y presenta sólo 2 hélices α (**Anexo 1**).

Los ensayos de unión mostraron además una alta afinidad por el ácido araquidónico, lo cual resalta al compararse con las determinaciones de afinidad para otras FABPs parasitarias (**Anexo 2**). En el caso de la Fh13 (*F. hepatica*) la

afinidad por el ácido araquidónico es la menor, entre otros ácidos grasos probados, mientras que en el caso de la EgFABP (*E. granulosus*) la afinidad por el mismo es la mayor, al igual que la TsFABP1. Esta preferencia parece indicar funciones diferentes para las FABPs en tremátodos y cestodos, además de una probable importancia del ácido araquidónico y su metabolismo para el parásito. Para ayudar a confirmar o refutar las anteriores hipótesis, se necesitaría comparar las afinidades de unión de la TsFABP1 con las de otras FABPs; pero esto no es posible pues el número de estudios al respecto es limitado y con resultados muy variables. En muchos casos, se han hecho determinaciones indirectas de la afinidad que resultan en valores de K_i o desplazamiento porcentual que no son comparables con los valores de K_D .

Se hicieron ensayos de inmunolocalización en distintos parásitos del género *Taenia* con el objeto de definir una posible función biológica a partir de su localización tisular. Todos los tejidos ensayados, tanto de gusanos adultos como de cisticercos presentaron una reacción positiva, lo que indica la presencia de la TsFABP1 o de una proteína ortóloga. Además, la presencia de la proteína estuvo asociada a estructuras que están en contacto con el hospedero o con el ambiente, lo que sugiere que esta familia de proteínas se relaciona con la absorción de ácidos grasos provenientes del hospedero y no sólo con el transporte intracelular. Lo anterior, puede explicarse en el contexto del sincicio celular que caracteriza a los parásitos cestodos. En una estructura donde existe un citoplasma extendido, la proteína sería capaz de transportar ácidos grasos a través de todo el tejido sincicial para distribuirlos a distintos organelos, citones y órganos.

Los resultados mostraron además diferencias notables en la localización de las reacciones positivas entre las distintas especies, así como entre la larva y el adulto. En el caso del cisticerco de *T. solium* la reacción positiva fue clara y abundante y estaba asociada al scolex; la TsFABP1 es abundante en el tegumento que se encuentra expuesto al canal espiral y en los citones subtegumentarios por debajo del mismo. Esta localización sugiere que el canal espiral puede ser utilizado por el parásito como sitio para la absorción de ácidos grasos. En contraste, la reacción en el adulto de *T. solium* fue menos abundante y se localizó en el parénquima de los proglótidos maduros, esto sugiere que la demanda por ácidos grasos es menor, puesto que dichos proglótidos están listos para ser liberados al ambiente.

La localización de la proteína en los cisticercos de *T. pisiformis* fue semejante a la de *T. solium*, lo que sugiere un manejo de ácidos grasos similar en ambas especies, en contraste con lo observado en los cisticercos de *T. crassiceps*, donde además de localizarse cerca del scolex, se observó una clara reacción positiva en el parénquima de la vesícula, posiblemente relacionada con el transporte de

ácidos grasos necesarios para el desarrollo de la misma. Las cepas de laboratorio de *T. crassiceps* son capaces de reproducirse por gemas en el peritoneo del ratón, caso distinto al de *T. pisiformis* y *T. solium* donde esta reproducción no se presenta.

Entre los adultos de las especies *T. solium* y *T. saginata* se encontraron claras diferencias en la localización de la TsFABP1. Mientras que en la primera la expresión parece ser menor y está limitada al parénquima del proglótido, en la segunda, la expresión es abundante y se encuentra tanto en el parénquima como en el tegumento y en los citones subtegumentarios. Esta diferencia puede estar relacionada con un uso diferente de las FABPs por parte de estos parásitos o con estrategias diferentes para la absorción y metabolismo de los ácidos grasos. También es necesario considerar la influencia del grado de desarrollo de los proglótidos en la heterogeneidad de los resultados.

Tanto en el caso de los cisticercos como de los adultos, la expresión pudo relacionarse con estructuras que tienen contacto directo con el hospedero, tales como los tegumentos del gusano adulto y del canal espiral del cisticerco. Esta localización puede estar relacionada con la aparente inhabilidad de los parásitos para sintetizar lípidos *de novo*, y su limitada capacidad para modificar aquellos que pudiera absorber. La obtención de los ácidos grasos y lípidos en general, necesarios para el mantenimiento, desarrollo y la producción de huevos de estos parásitos, sería entonces dependiente de la absorción a partir del hospedero. Es posible que el parásito dependa no sólo de que se absorban ácidos grasos en cantidades suficientes, sino también que sean los ácidos grasos adecuados. En este sentido, la importancia de la TsFABP1 podría no sólo radicar en su localización en contacto con el huésped, sino también en su capacidad de unir los ácidos grasos que requiere el parásito. La diferencia de afinidad hacia distintos ácidos grasos podría reflejar los requerimientos nutricionales de la *T. solium*.

Ejemplos de otros procesos fisiológicos en los que las FABPs han sido involucradas pueden encontrarse en la literatura, tales como el control de los niveles de ácidos grasos intracelulares para evitar toxicidad (Choromanska et al. 2011), la formación y regulación de la composición de microdominios de membrana (McIntosh et al. 2012), el control del ciclo de sueño y vigilia, además de la memoria en *Drosophila melanogaster* (Gerstner et al. 2011), translocación nuclear de lípidos (Kaczocha et al. 2012), actividades proinflamatorias (Xu y Vanhoutte 2012), entre otras.

Considerando la alta conservación de las FABPs en los céstodos y la baja identidad de la TsFABP1 con las FABPs humanas, se decidió evaluar su potencial

como vacuna utilizando el modelo de cisticercosis murina de *T. crassiceps*. Para ello, se compara la carga parasitaria resultante de un reto con cisticercos de *T. crassiceps* entre animales inmunizados con la rTsFABP1 y otros no inmunizados. Los resultados de estos ensayos mostraron una reducción en la carga parasitaria de 45% en promedio, además de que 12% de los animales inmunizados no presentaron ningún parásito, mientras los animales en control, incluyendo los que recibieron adyuvante, presentaron parásitos al momento del sacrificio.

No se encontraron diferencias entre los tratamientos de 50 o 100 µg de la rTsFABP1, lo que indica que la concentración menor es suficiente para inducir la máxima protección contra la infección experimental en las condiciones que se manejaron. Esta dosis (50 µg), es mayor que la reportada para otros candidatos a vacuna contra la cisticercosis en el mismo modelo como el mimótopo NC-1/BSA o la cistein proteasa de *T. solium*, que se probaron en dosis de 20 y 2 µg, respectivamente (Baig et al. 2006; Capelli-Peixoto et al. 2011), y resulta igual a la reportada para la BLS-GK-1 en un esquema con administración oral (Fragoso et al. 2011).

No se encontraron diferencias morfológicas entre los parásitos recuperados de los grupos control y de los que fueron inmunizados con la rTsFABP1, además de que todos fueron capaces de infectar otros ratones. Esto indicaría que la protección inducida por la inmunización con rTsFABP1 parece interferir mayormente con el establecimiento de la infección con una eficiencia de 12%, pero no es capaz de eliminar o dañar parásitos ya establecidos, aun cuando se establece una respuesta tanto a nivel celular como humoral. Un efecto similar de la inmunización fue observada en otros ensayos de vacuna en el modelo de cisticercosis por *T. crassiceps* (Toledo et al. 1999; Toledo et al. 2001). El control del establecimiento del parásito está evidenciado además por la ausencia de cisticercos coloidales o calcificados, lo que sugiere que la respuesta inmune protectora por parte del hospedero podría involucrar también mecanismos de inmunidad innata. La aparente protección esterilizante observada en los ensayos con rTsFABP1 podría estar relacionada con una respuesta inmune innata dirigida específicamente contra el parásito para prevenir su establecimiento.

Para caracterizar mejor la respuesta inmune relacionada con la protección, se hicieron ensayos de proliferación celular, en los que se observaron índices de proliferación más altos en los grupos inmunizados que en los controles, y más altos en los grupos inmunizados e infectados que en los sólo inmunizados. No se encontraron diferencias entre las células que fueron re-estimuladas con 50 o 100 µg de extracto proteico, o con 10µg de la rTsFABP1, incluso comparando entre grupos inmunizados pero no infectados.

Adicionalmente, los linfocitos de animales inmunizados e infectados mostraron un índice de proliferación mayor que cualquier otro grupo cuando fueron re-estimuladas con ConA. En los grupos infectados, la proliferación parece ser inversamente proporcional al número de cisticercos recuperados. Esto podría relacionarse con el efecto inmunomodulador que se ha encontrado de parte de algunas proteínas de *T. crassiceps* (Dissanayake et al. 2002) y de su capacidad para inducir una respuesta predominantemente de tipo Th2 (Reyes et al. 2011). No es claro si la inmunización con rTsFABP1 es capaz de inhibir esta actividad inmunomoduladora, aun cuando esto no se refleje en la presencia de cisticercos coloidales o calcificados, o si la capacidad de proliferar de las células depende de la cantidad de parásitos presente. Para comprobar lo anterior sería necesario caracterizar de manera más detallada la respuesta inmune celular y humoral, determinando en particular las subclases de anticuerpos, los perfiles de citocinas, así como la respuesta inmune asociada a otros estímulos.

Los ratones inmunizados en los ensayos de vacunación presentaron anticuerpos específicos anti-rTsFABP1 en el suero después de la primera inmunización, mientras que todos los animales produjeron esos anticuerpos solo después del reto. La presencia de anticuerpos específicos anti-rTsFABP1 en animales que no fueron vacunados con la proteína, pero sí fueron infectados con *T. crassiceps*, sugiere que en algún momento de la infección, proteínas ortólogas a TsFABP1 y TsFABP2 son expuestas al hospedero, lo que produciría una reacción inmune cruzada capaz de reconocer a la rTsFABP1 por la alta identidad entre las FABPs en parásitos taénidos. Esta evidencia sugiere que las FABPs pueden formar parte del conjunto de antígenos que confieren inmunidad concomitante durante la infección natural.

Se ha reportado que una FABP de *C. sinensis*, llamada CsFABP, es parte de sus productos de excreción/secreción y se encuentra presente en el tejido del hospedero de manera natural (Huang et al. 2012). Sin embargo, no se puede descartar que la exposición de la o las FABPs de *T. crassiceps* al hospedero haya sido producto del modelo, en el cual la integridad de la membrana del parásito puede verse comprometida al pasar por la aguja de la jeringa en el momento de la inoculación.

El que las FABPs de parásitos estén expuestas al hospedero, implicaría algo que no ha sido considerado hasta ahora y es que estas proteínas de parásitos podrían usarse como marcadores de infección y de sobrevivencia del parásito, tales marcadores podrían ser antígenos diagnósticos útiles en casos de infecciones en lugares de difícil acceso como el SNC. Usos semejantes ya han sido reportados

para distintas FABPs. El hecho de que exista una expresión de FABPs particular para cada tejido, el no ser secretadas en condiciones normales y la variación en su nivel de expresión en algunos procesos patológicos, hace a esta familia de proteínas marcadores clínicos especialmente útiles. Han sido utilizadas en casos de preeclamsia (Scifres et al. 2012), daño al miocardio (Kagawa et al. 2013), enfermedades neurodegenerativas (Teunissen et al. 2011) y función renal (Przybylowski et al. 2011).

La localización específica de la TsFABP1 de *T. solium* en estructuras en contacto con el hospedero, su aparente exposición al sistema inmune del mismo, su abundante expresión y presencia en distintos estadios de desarrollo, indican que la proteína es importante para la relación hospedero-parásito. Si además tomamos en cuenta la afinidad de la proteína por distintos ácidos grasos y la incapacidad de *T. solium* de sintetizar los ácidos grasos necesarios para su propio desarrollo, y su naturaleza sincicial, podemos suponer que forma parte de la maquinaria con la cual el parásito incorpora, transporta y metaboliza ácidos grasos. También, la presencia de ortólogos de esta proteína en otros taénidos y la alta similitud de su secuencia aminoacídica con los mismos, sugiere una estrategia común, o por lo menos papeles semejantes de las FABPs en estos parásitos.

Se han reportado otras funciones para las FABPs en otros organismos, tales como el mantenimiento de dominios membranales, regulación de la expresión de algunos genes o la protección contra moléculas lipídicas tóxicas (Schug et al. 2007; Huang et al. 2012; McIntosh et al. 2012). Cabe señalar que ninguna de estas funciones se contrapone con la señalada anteriormente.

En esta tesis, se reporta por primera vez la caracterización de una FABP de *T. solium*, específicamente de la TsFABP1. Se demuestra su capacidad de unión con varios ácidos grasos aunque su mayor afinidad es por los ácidos grasos saturados. La localización de la TsFABP1, o de sus ortólogos, en los tejidos de distintos parásitos taénidos parece relacionarse con la función primaria de las FABPs: el transporte de ácidos grasos. La respuesta resultante de la inmunización de ratones con esta proteína indujo una protección parcial ante la infección, reduciendo la carga parasitaria en algunos ratones y evitando la infección en otros.

Las FABPs están ampliamente distribuidas en el reino animal y han demostrado cumplir papeles importantes y diversos. En el caso de *T. solium*, su papel parece involucrar la absorción, el transporte y el metabolismo de ácidos grasos esenciales a partir del huésped. Su interés reside no sólo en su potencial como blanco de vacuna o tratamiento, sino como parte esencial de la relación hospedero-parásito.

VIII CONCLUSIONES

- Este es el primer estudio detallado sobre una FABP de *Taenia solium*.
- Se clonó la secuencia codificante completa de una de las dos proteínas de unión a ácidos grasos de *Taenia solium*, la TsFABP1.
- La TsFABP1 se expresó en bacterias y se aisló a un alto grado de pureza por cromatografía de unión a metales divalentes.
- La TsFABP1 se une preferentemente a los ácidos grasos de cadena larga y con insaturaciones.
- La TsFABP1 forma parte de la subfamilia iv de las iLBPs.
- Existe una expresión diferencial de FABPs en distintas estructuras de céstodos y en distintos estadios de desarrollo.
- Las TsFABP1 parecen involucrarse con la absorción y el metabolismo de ácidos grasos a partir del hospedero.
- El potencial de la rTsFABP1 como agente vacunal contra la cisticercosis es limitado, al menos en el modelo de cisticercosis murina por *T. crassiceps*.

IX ANEXOS

1 Artículo publicado



Molecular characterization, functional expression, tissue localization and protective potential of a *Taenia solium* fatty acid-binding protein

Oscar Illescas^a, Julio C. Carrero^a, Raúl J. Bobes^a, Ana Flisser^b, Gabriela Rosas^c, Juan P. Laclette^{a,*}

^a Department of Immunology, Biomedical Research Institute, Universidad Nacional Autónoma de México, D.F., Mexico

^b Department of Microbiology and Parasitology, School of Medicine, Universidad Nacional Autónoma de México, D.F., Mexico

^c School of Medicine, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Mexico

article info

Article history:

Received 14 April 2012

Received in revised form 6 October 2012

Accepted 9 October 2012

Available online 18 October 2012

Keywords:

Taenia solium

T. crassiceps

Cysticercosis

Fatty acid binding protein

Protection

abstract

The fatty acid-binding proteins (FABPs) comprise a family of proteins that are widely expressed in animal cells and perform a variety of vital functions. Here, we report the identification, characterization, recombinant expression, tissue localization and protective potential of a *Taenia solium* FABP (TsFABP1). The TsFABP1 primary structure showed all the conserved residues characteristic of the subfamily iv of the intracellular Lipid-Binding Proteins (iLBPs), including those involved in the binding stabilization of the fatty acid molecule. Through a competitive binding assay we found that TsFABP1 is able to bind at least six different fatty acids with preference toward palmitic and stearic acid, suggesting that TsFABP1 is a member of the iLBP subfamily iv. Immunolocalization assays carried out on larval and adult tissues of four species of taeniids using anti-TsFABP1 hyperimmune sera produced in mice and rabbit, showed intense labeling in the tegument of the spiral canal and in subtegumental cytons of the larvae. These findings suggest that the spiral canal might be a major place for FA uptake in the developing scolex. In contrast, only subtegumental cytons in the adult worms stained positive. We propose that TsFABP1 is involved in the mechanism to mobilize fatty acids between compartments in the extensive syncytial tissue of taeniids. Protection assays carried out in a murine model of cysticercosis showed that subcutaneous immunization with TsFABP1 resulted in about 45% reduction of parasite load against an intraperitoneal challenge with *Taenia crassiceps* cysts. This reduction in parasite load correlated with the level of cellular and humoral immune responses against TsFABP1, as determined in spleen lymphocyte proliferation and ELISA testing.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Cysticercosis caused by *Taenia solium* is still a public health problem in developing countries. Humans are the only definitive hosts for the adult tapeworm, whereas pigs are the usual intermediate ones. Humans can accidentally be infected with eggs and acquire cysticercosis. The infestation of the human central nervous system by the larval stage, or neurocysticercosis, is an important cause of epilepsy and other neurological manifestations. Poor sanitation and inadequate pig-production practices, lack of hygiene and socio-cultural factors enable transmission [1]. Parasite control efforts such as education, mass treatment or identification and treatment of infected individuals, tend to have limited impact in endemic areas [2]. Recent reports demonstrate that the infection

is even spreading to new areas [1] although it is being controlled in others [3]. Several highly protective vaccine candidates against the porcine infection have been described: TSOL18 [4–6], S3Pvac [7] and a vaccine based on the oncospherical stage-specific protein family 45W [8]. As promising as these vaccine candidates might appear, they are only available for research purposes, and thus, identification of new vaccine candidates is still a goal.

In spite of the importance of neurocysticercosis in human public health and animal production, some basic aspects on the metabolism and physiology of *T. solium* are unknown, for example, the contribution of the fatty acid (FA) metabolism to the fulfillment of the worm's energy expenditures.

FABPs constitute a family of low-molecular weight proteins present in a wide variety of mammals, birds, batrachians, fish, and invertebrates including helminth parasites [9]. Most FABPs are members of the subfamily iv, characterized by the binding of a single ligand in an U-shaped conformation; other FABPs that are capable of binding one or two different FAs with a different bending, or even retinoid ligands, are included in subfamilies i, ii and iii [10]. The expression of two FABP isoforms have been reported for

* Corresponding author at: Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Cd. Universitaria, 04510 México, D.F., Mexico.
Tel.: +52 55 5622 8955; fax: +52 55 5622 8955.

E-mail address: laclette@biomedicas.unam.mx (J.P. Laclette).

the trematodes *Fasciola hepatica* [11] and *Fasciola gigantica* [12], as well as for the cestodes *Echinococcus granulosus* [13], *Mesocestoides vogae* [9] and *Taenia pisiformis* [14], whereas only one was found in several schistosome species [15–17] and *Clonorchis sinensis* [18]. FABPs are involved in the storage and transport of lipids in *E. granulosus* [19]. Immunolocalization studies in *M. vogae* demonstrated a high expression of the two FABPs (MvFABPa and MvFABPb) in the tegument, suggesting a role in FA uptake [9].

Here we report the characterization, recombinant functional expression, tissue immunolocalization and protective potential of a *T. solium* FABP (TsFABP1). Our data indicate that TsFABP1 binds preferentially C16 and C18 saturated FAs and is located in the tegument and subtegumental cytons, directly in contact with host fluids, suggesting a role in FAs uptake. The protective potential of TsFABP1 was limited to 45% reduction of the parasite load, when mice were challenged with *Taenia crassiceps* in the murine model of cysticercosis.

2. Materials and methods

2.1. Recombinant expression of TsFABP1

The *Tsfabp1* coding and genomic sequences were obtained from the database of the *T. solium* genome sequencing project [20]. The coding sequence was amplified from a cDNA library of *cysticerci* by PCR using primers 5'-GATTGGATCCATGGAGCCATTCATCGG-3' and 5'-GCGACTCGAGCGCTGCCTTAACGTAGG-3', containing BamHI and XhoI restriction sites. The amplified product was subcloned within the corresponding restriction sites into pET23a (NOVAGEN, Darmstadt, Germany). The plasmid construct was amplified by transforming *E. coli* BL21-pLys cells and purified from cultures using PureLink Quick plasmid miniprep (Invitrogen, Carlsbad, California). The coding sequence and the ORF containing the downstream 6× His-tag were confirmed by automatic sequencing (ABI Prism 310, PerkinElmer, Massachusetts).

Cultures of transformed bacteria selected by ampicillin resistance were induced to express the TsFABP1 by incubation with 1 mM IPTG at 37 °C for 6 h. Cells were collected by centrifugation, lysed by sonication and centrifuged at 2000 × g. The pellet obtained was exhaustively washed with buffer A (50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.1% deoxycholate, 0.5% triton X-100, pH 8.0) and the protein fraction solubilized in buffer B (5 M HCl-Guanidine, 5 mM glycine, 25 mM phosphoric acid, pH 3.5). The recombinant protein was purified by affinity chromatography to nickel using HiTrap columns (GE Healthcare, Sweden). Finally, the eluted protein was dialyzed against buffer C (5 mM K₂HPO₄, 5 mM KH₂PO₄, 150 mM KCl, pH 7.3). Protein concentration determined by Bradford assay (Invitrogen) and its purity analyzed by densitometry (ImageJ, NIH, USA) on silver-stained polyacrylamide gels.

2.2. Hyperimmune anti-TsFABP1 sera

Two hyperimmune anti-TsFABP1 sera were produced. Three mice and one rabbit were immunized s.c. with three doses of 100 µg or 200 µg TsFABP1 respectively, administered with Freund's complete adjuvant on day 0, and Freund's incomplete adjuvant on days 7 and 14. Sera were collected on day 21. Control sera were obtained from animals inoculated with a non-transformed bacterial extract following the same protocol. All sera were stored at -70 °C until use.

Antibody specificity of both sera was determined by Western blot using crude protein extracts from *T. solium* and *T. crassiceps* *cysticerci* prepared as described previously [21]. After SDS-PAGE in 15% gels under reducing conditions, resolved proteins were transferred to nitrocellulose membranes (Amersham, Biosciences,

Piscataway, New Jersey) and incubated with 3% BSA-PBS overnight at 4 °C. Hyperimmune mice or rabbit sera (1:5000 dilution in 1% BSA-PBS) were added and incubated for 2 h at room temperature. Membranes were then washed with 0.05% Tween 20-PBS and incubated with a HRP-conjugated goat anti-mouse IgG (1:2000 dilution in PBS; Sigma, Saint Louis, Missouri) or a goat anti-rabbit IgG (1:1500 dilution in PBS; Zymed, Carlsbad, California) antibodies for 1 h. After extensive washing with PBS, OPD was used as developer.

Sera antibody titer was determined by ELISA using EIA/RIA high binding stripwell plates (Costar, Corning Incorporated, New York) sensitized with 1 µg/ml TsFABP1 (100 l/well) in carbonate buffer (0.2 M Na₂CO₃, 0.2 M NaHCO₃, pH 9.6) overnight at 4 °C. After blocking with 2% skim milk for 2 h at 37 °C and washing three times with 0.05% Tween 20-PBS, plates were incubated as above with increasing dilutions of mice or rabbit anti-TsFABP1 sera (1:20 to 1:50,000) and washed again three times. HRP-conjugated goat anti-mouse IgG or goat anti-rabbit IgG antibodies were used as secondary antibodies (1:3,000 dilution for both) for 2 h at 37 °C. TMB peroxidase EIA substrate kit (Bio-Rad, Hercules, California) was used as developer following the manufacturer's instructions. Absorbance at 650 nm was determined in triplicate wells. Antibody titer was defined as the reciprocal of the highest sample dilution with an OD value above cut-off. Cut-off was determined as controls mean OD + 3 standard deviations.

2.3. Fatty acid binding assays

FA binding affinities to TsFABP1 were measured in a ligand-binding assay using the fluorescent probe ADIFAB as competitor (FFA Sciences LLC, San Diego, California) [22,23]. This spectrofluorometric assay was used to determine the binding affinities of TsFABP1 to six FAs (stearic C16:0, palmitic C18:0, oleic C18:1, linoleic C18:2, linolenic C18:3 and arachidonic C20:4) normally present in human, mice and swine sera [24–26]. Briefly, the assay consisted in the titration of a solution containing ADIFAB (0.4–0.6 µM) and TsFABP1 (2.1–2.6 µM) by adding a solution of FA sodium salts (Nu Chek Prep, Elysian, Minnesota) in a measuring buffer (20 mM HEPES, 150 mM NaCl, 5 mM KCl and 1 mM Na₂HPO₄, pH 7.4). Stocks of FA salts (0.5–1.0 mM) were prepared in water with 25 mM butylated hydroxytoluene at pH ≥ 9.0 and stored under gaseous nitrogen at -70 °C until use. Reactions for each FA salt were carried out at room temperature during 5 min, and the fluorescent emission at 432 and 505 nm was determined in a spectrofluorometer (DMX 800 SLM, Holis) using methacrylate cuvettes (Turner Biosystems). Measurements were performed 5 min after every titration step with the excitation wavelength set at 390 nm and constant agitation. The results are reported as dissociation constants (K_d) for TsFABP1, determined as indicated by the ADIFAB manufacturer.

2.4. Tissue localization assays

T. solium and *Taenia saginata* proglotids obtained from naturally infected human hosts were kindly provided by A. Aluja (School of Veterinary Medicine, UNAM, México). *T. pisiformis* *cysticerci* were provided by I. Flores (School of Agropecuary Sciences, UAEM, México) and also obtained from naturally infected rabbits. *T. solium* *cysticerci* were collected from naturally infected pigs, whereas *T. crassiceps* *cysticerci*, ORF and WFU strains, were obtained from experimentally infected BALB/c mice. All tissues were extensively washed in PBS and fixed in Zamboni solution (2.0% formaldehyde, 0.2% picric acid, pH 7.0). After fixation, the tissues were dehydrated and embedded in paraffin.

Tissue sections of 5 µm were transferred to poly-L-Lysine (Sigma) coated slides before being deparaffinized and rehydrated.

Thereafter, sections were incubated with 3% hydrogen peroxide and with 5% albumin with 0.05% Tween 20-PBS. After treatment, tissue sections were incubated at 37 °C during 1 h, with either the mice or rabbit anti-TsFABP1 hyperimmune sera or the preimmune sera. All sera were diluted 1:5000 in 2% albumin, 0.01% Tween 20-PBS. After stringent washing with 2% albumin in 0.1% Tween 20-PBS, tissues were incubated with a biotinylated anti-mouse and rabbit IgG secondary antibody followed by HRP-labeled streptavidin solution, both at 37 °C for 30 min, and developed with 3-3' DAB (DAKO, Carpinteria, California). All slides were counterstained with hematoxylin-eosin and photographed using an Olympus BX51 microscope.

2.5. Protection assays in the Murine model of cysticercosis

The fast-growing ORF strain of *T. crassiceps*, was maintained by mouse to mouse passage in 6–8 weeks old BALB/cAnN female mice. After selection of cysts with a similar vesicular diameter of about 2 mm, 20 larvae were transferred to the peritoneum of a receptor mouse, using syringes with 27 or 21-gauge needles.

Healthy 6–8 weeks old BALB/cAnN female mice were divided in 4 groups of 5–6 mice each. Group 1 and 2 were immunized with 50 or 100 µg TsFABP1 respectively. TsFABP1 was injected subcutaneously with Freund's complete adjuvant on day 0 and Freund's incomplete adjuvant on days 14 and 28. Group 3 was similarly injected with adjuvant alone. Group 4 did not receive any treatment. Two weeks after the last immunization, mice in all groups were i.p. challenged with 10 cysticerci. After 50 days of infection, mice were euthanized and the peritoneal cavity was dissected in order to recover the parasites. Sera samples were taken from the tail vein of mice before being immunized, challenged and sacrificed. All sera were kept at –20 °C until use.

2.6. Evaluation of the immune response of mice

Determinations of specific anti-TsFABP1 antibodies in the sera samples of mice were performed by ELISA as described above. The sera (1:2000 dilution) and a HRP-conjugated goat anti-mouse IgG antibody (1:1000) were used as primary and secondary antibodies, respectively. Preimmune sera were used as control.

For proliferation assays, 6 weeks old mice were divided in 4 groups of 5 mice each. Two groups were immunized as above with 50 µg of TsFABP1 whereas the other two received only adjuvant. Two weeks after the last immunization (day 42), the mice of one immunized and one adjuvant group were challenged with 10 *T. crassiceps* cysticerci, whereas mice in the other two groups were euthanized and the spleens dissected under sterile conditions. The groups of infected mice were similarly euthanized 50 days after challenge (day 92), in order to recover the parasites and spleens.

Cell suspensions for each mouse spleen were initially prepared in 5 ml of RPMI (GIBCOBRL, Grand Island, New York) supplemented medium (0.2 mM l-glutamine, 0.01 mM non-essential amino acids, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, and 10% fetal bovine serum). Cells were later centrifuged and the pellet was resuspended in RPMI. In order to eliminate red blood cells present in the suspension, after a second centrifugation, the pellet was resuspended and incubated for 5 min in ammonium chloride buffer (150 mM NH₄Cl, 10 mM NaHCO₃, 0.004% EDTA, pH 7.4). After extensive washes with supplemented RPMI, cells were divided in 96-well plates at 5 × 10⁵ cells/well, added either with Concanavalin A (ConA) at 2 µg/well, *T. crassiceps* total antigen (50 µg or 100 µg/well), or purified TsFABP1 (10 µg/well) and cultured at 37 °C and 5% CO₂ during 48 h. The cultured cells were pulsed with methyl[³H]thymidine (1 Ci/well; Amersham, Little Chalfont, UK) and incubated for additional 18 h. Cells were then harvested and the incorporated thymidine was measured in a β -plate scintillation counter (Wallac, Turku, Finland).

All assays were performed in triplicates. All procedures involving tissues and laboratory animals were in accordance to the guidelines established by the Institutional Ethics Committee.

2.7. Statistical analysis

Statistical analyzes were performed using Microsoft Office Excel statistical analysis (2003, 11.8342.8341). Two group data comparisons were performed using the post hoc Mann-Whitney test after a Kruskal–Wallis variance analysis. Relation between two variables was determined by regression. P values <0.05 were considered significant.

3. Results

3.1. Tsfabp1 genomic and predicted amino acid sequences

During characterization of about 60,000 ESTs for the *T. solium* genome project [20], one of the highly expressed mRNA fractions in the adult worm was a transcript encoding a protein with homology to FABPs. After analysis of all related cDNA and genomic sequences within this project's database, a single fatty acid binding protein of *T. solium* (TsFABP1) was identified and characterized. The corresponding gene was designated *Tsfabp1*. The sequence obtained from a full-length cDNA library showed that the transcript contained a 402 bp ORF followed by a 176 bp 3' UTR (Fig. 1A). In the genomic DNA sequence, the coding fragment of 486 bp showed one 84 bp intron between positions 348 and 421, identified with the splice predictor software NNSPLICE [27]. Genomic and cDNA sequences were deposited in the GenBank under accession number JQ929049.

Alignment of the TsFABP1 deduced amino acid sequence with homologous sequences obtained from public databases showed that the highest similarity was with *Echinococcus granulosus* FABP sequences (identities of 81% EgFABP1 and 79% EgFABP2). In consequence, we decided to designate the first identified protein as TsFABP1. Although a comprehensive search in the *T. solium* genome database had failed to detect the sequence of another FABP, recent updates of the project gene list allowed finding a second (Fig. 1B) *T. solium* protein with homology to FABPs (TsFABP2) (GenBank accession number JX470484). Lower similarities were found with trematode or human FABP sequences (Fig. 1B). Comparison indicated that TsFABP1 also showed the residues that are specifically conserved in many FABPs, including those that have been suggested to play a role in the stabilization of the carboxyl and hydrophobic ends of the bound FA inside the protein pocket [10]. These sequence traits suggested that TsFABP1 belongs to the iLBP subfamily iv [10].

3.2. Expression and purification of recombinant TsFABP1

The open reading frame encoding for TsFABP1 was amplified by PCR excluding the stop codon and cloned into the expression vector pET23a. Induction of transformed BL21 (DE3) pLys cells resulted in high levels of expression for the expected 17 kDa protein, corresponding to the recombinant His-tagged TsFABP1 (Fig. 2). After nickel-affinity chromatography, more than 95% purity was achieved for the recombinant protein, as judged by densitometry of silver stained SDS-PAGE. Recombinant TsFABP1 was used to immunize rabbits and mice in order to produce hyperimmune sera. Both hyperimmune sera recognized only a 17 kDa band when tested in Western Blot assays using crude protein extracts of *T. crassiceps* or *T. solium* cysticerci (Fig. 2). Rabbit and mice hyperimmune sera showed minimum titers for detection in our ELISA of 1:18,000 and 1:14,500 against TsFABP1, respectively.

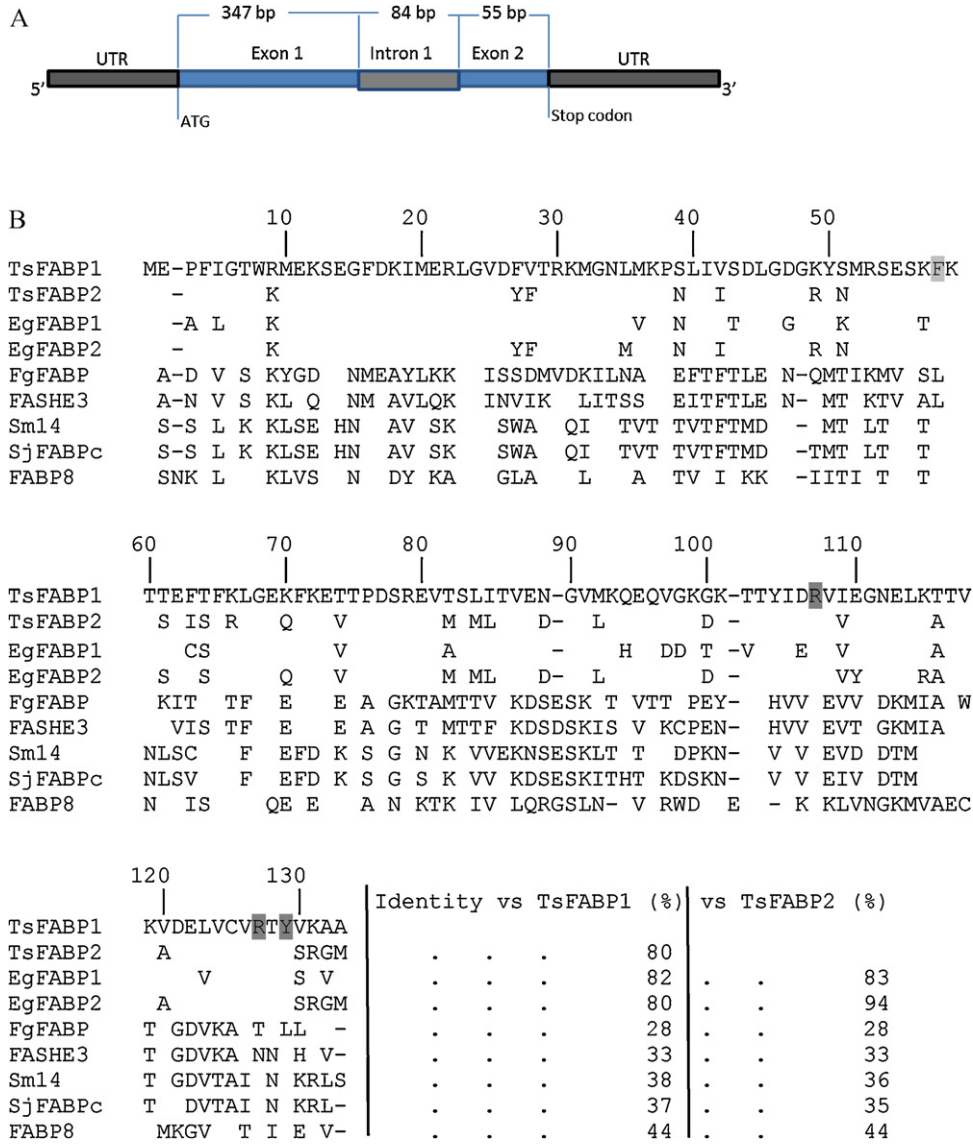


Fig. 1. Molecular characterization of TsFABP1. (A) Gene structure of *Tsfabp1*. The 402 bp coding sequence in mRNA is translated into the 133 amino acid residues (~15 KDa) product; (B) Alignment of selected FABPs amino acid sequences. Abbreviations (GenBank accession numbers): *T. solium* TsFABP1 (JQ929049), TsFABP2 (JX470484), *E. granulosus* EgFABP1 (AAK12096) and EgFABP2 (AAK12094), *F. gigantica* FgFABP (AAD23998), *F. hepatica* FASHE3 (Q9U1G6), *S. mansoni* Sm14 (AAT39384), *S. japonicum* SjFABPc (AAA64425), human FABP8 (NP_002668). In the sequence alignment, identities with TsFABP1 are shown as blank and gaps are shown as dashes. Residues involved in the stabilization of the ligand carboxyl and hydrophobic termini, are shown in dark and light gray, respectively.

3.2.1. Binding of TsFABP1 to fatty acids

The binding specificity of TsFABP1 was determined through competition assays with the fluorescent probe ADIFAB, using six different FAs of 16–20 carbon atoms and 0–4 unsaturations. Results demonstrated that TsFABP1 was able to bind all six FAs albeit with different affinities (Table 1). Higher affinities were found for saturated FAs. The highest affinity was found with stearic acid and the

lowest with linolenic acid (Table 1). The range of affinities observed for TsFABP1 was similar to those reported for other FABPs, including ADIFAB [15,28,29].

3.3. Tissue immunolocalization assays

An immunohistochemical assay was carried out on tissue sections from larval and adult *T. solium*, *T. saginata*, *T. crassiceps* and *T. pisiformis* (Fig. 3). Selection of developmental stages and tapeworm species was based on specimen availability. In order to reduce unspecific binding due to cross-reactivity with host immunoglobulins, the rabbit hyperimmune anti-TsFABP1 serum was used on tissue sections of *T. crassiceps* cysticerci grown in mice, whereas the mice anti-TsFABP1 serum was used for tissue sections of *T. solium*, *T. saginata* and *T. pisiformis* specimens obtained from naturally infected humans, pigs and rabbits, respectively. Cross-reactivity of our anti-TsFABP1 sera with TsFABP2 cannot be excluded at this point because of the high similarity between the two isoforms.

Table 1
TsFABP1 binding affinities.

Fatty acid	^a K _d TsFABP1
Arachidonic (C20:4)	1605 ± 120
Stearic (C18:0)	359 ± 11
Oleic (C18:1)	2021 ± 214
Linoleic (C18:2)	6192 ± 26
Linolenic (C18:3)	9515 ± 488
Palmitic (C16:0)	430 ± 13

^a K_d values in nM, reported as an average of 3 experiments ± SD.

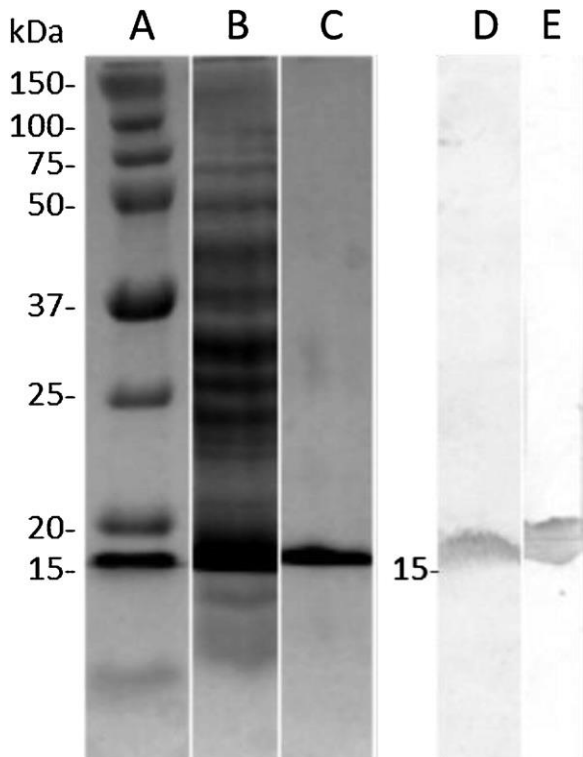


Fig. 2. Recombinant expression and immune recognition of TsFABP1. Lanes (A–C): SDS-PAGE of (A) molecular weight markers, (B) crude extract of BL21PLys transformed cells and (C) purified TsFABP1 after nickel affinity chromatography; lanes D and E: Western blots of (D) crude antigenic extract (15 µg) of *T. solium* cysticerci reacted with a hyperimmune anti-TsFABP1 mice serum and (E) crude antigenic extract (15 µg) of *T. crassiceps* cysticerci reacted against a hyperimmune anti-TsFABP1 rabbit serum. Horseradish peroxidase-goat anti-mice IgG or anti-rabbit IgG were used as second antibodies. 4-Chloro-1-Naphtol was used as developer.

In tissue sections of *T. solium* and *T. pisiformis* cysticerci, strong reactivity was observed in the tegument of the spiral canal, in the vicinity of the scolex (Fig. 3A and B). Also in *T. solium*, strong positive staining was also found in the cytoplasm of subtegumental cytons, underneath the basement membrane, as well as in patches on the surface of tegument, in contact with the lumen of the spiral canal (Fig. 3A). In contrast, positive staining was widely distributed in the parenchyma of the bladder wall in the cysticerci of both strains of *T. crassiceps*: WFU and ORF (Fig. 3C and G), whereas no staining appeared in the tegument of the spiral canal in WFU (Fig. 3G). It is worth mentioning that cysticerci of the ORF strain are no longer able to produce protoescoleces.

Regarding adult worms, only available for *T. saginata* and *T. solium*, positive reaction was detected in the parenchyma and subtegumental cytons of both, whereas only the tegument of *T. saginata* resulted stained (Fig. 3H and I). Finally, no staining was observed on eggs within the uterus of both species (Fig. 3H, *T. solium* is not shown).

3.4. Protection against murine cysticercosis by immunization with TsFABP1

A murine *T. crassiceps* cysticercosis model was used to investigate the protective potential of TsFABP1 after subcutaneous immunization of mice, followed by an intraperitoneal challenge with cysts. Three protection assays were carried out using at least 5 mice per group. Immunization with TsFABP1 resulted in a reduction of the parasite load in all immunized mice, with no clear differences between those immunized with 50 or 100 µg of TsFABP1. After subtracting the protective effect of the adjuvant used, the average reduction in the three experiments was 45%. Interestingly, 4 out of 34 immunized animals showed total protection (Table 2).

Immunized mice developed specific anti-TsFABP1 IgG antibodies in serum (Fig. 4), detectable after the first immunization and reaching a maximum level after the third immunization (day 42, just before challenge). As expected, pre-immune sera and the sera from animals injected with the adjuvant alone or with saline buffer, did not show specific anti-TsFABP1 IgG antibodies before challenge (Fig. 4). No differences were found between the 50 and 100 µg immunized groups regarding the anti-TsFABP1 IgG antibody levels ($p > 0.05$).

In order to make a general evaluation of the cellular immune response, proliferation assays were carried out with the mice spleen lymphocytes through stimulations with a parasite crude antigenic extract or TsFABP1. Lymphocytes from immunized mice showed significantly higher proliferation indexes in response to the crude antigenic extract and TsFABP1 when compared with those from mice that received only adjuvant ($p < 0.05$). Maximum proliferation responses were obtained at day 94 in response to stimulation with both, the crude protein extract and the recombinant protein (Fig. 5).

4. Discussion

Most FABPs are members of the subfamily iv, characterized by the binding of a single FA in U-shaped conformation [10]. TsFABP1 contains all the conserved residues present in the majority of FABPs of this iLBP subfamily, including residues F58, R107, R127 and Y129, which are involved in the stabilization of the carboxylic and aliphatic ends of FAs during binding [10]. Additionally, although the recombinant protein showed capacity to bind all six FAs assayed, the highest affinities were observed toward saturated C16:0 and C18:0. Finally, according to our Scatchard plots analysis TsFABP1 only binds one FA (data not shown). These results allowed us to classify TsFABP1 as a member of the iLBP subfamily iv.

The TsFABP1 amino acid sequence was highly similar to those of other flatworm FABPs: about 80% to *E. granulosus* EgFABP1 and EgFABP2 and 67 and 55% to *M. vogae* MvFABPa and MvFABPb, respectively. The similarity to fluke's FABPs was comparatively low; 33% to *F. hepatica* FASHE3 and 38% to both *Schistosoma japonicum* SjFABPc and *Schistosoma mansoni* Sm14. In spite of the high amino acid sequence similarity, the binding specificities of TsFABP1 and EgFABP1 were different. For example, although EgFABP1 shows higher affinity for palmitic acid (C16:0) than for stearic acid (C18:0),

Table 2
Protection studies in the murine model of *T. crassiceps*.

Group	Infected/total**	Sterilizing protection (%)	Parasite load mean (range)	Parasite load reduction (%)	p*
Vehicle	16/16	–	768 (409–1188)	–	
Adjuvant	15/15	–	637 (462–798)	–	
TsFABP1 50 µg	13/16	18.8	369 (0–733)	41.9	0.0336
TsFABP1 100 µg	17/18	5.6	328 (0–568)	48.4	<0.0001

* p was determined for the immunized mice by comparing with the adjuvant-only group. ** Results from 3 independent experiments.

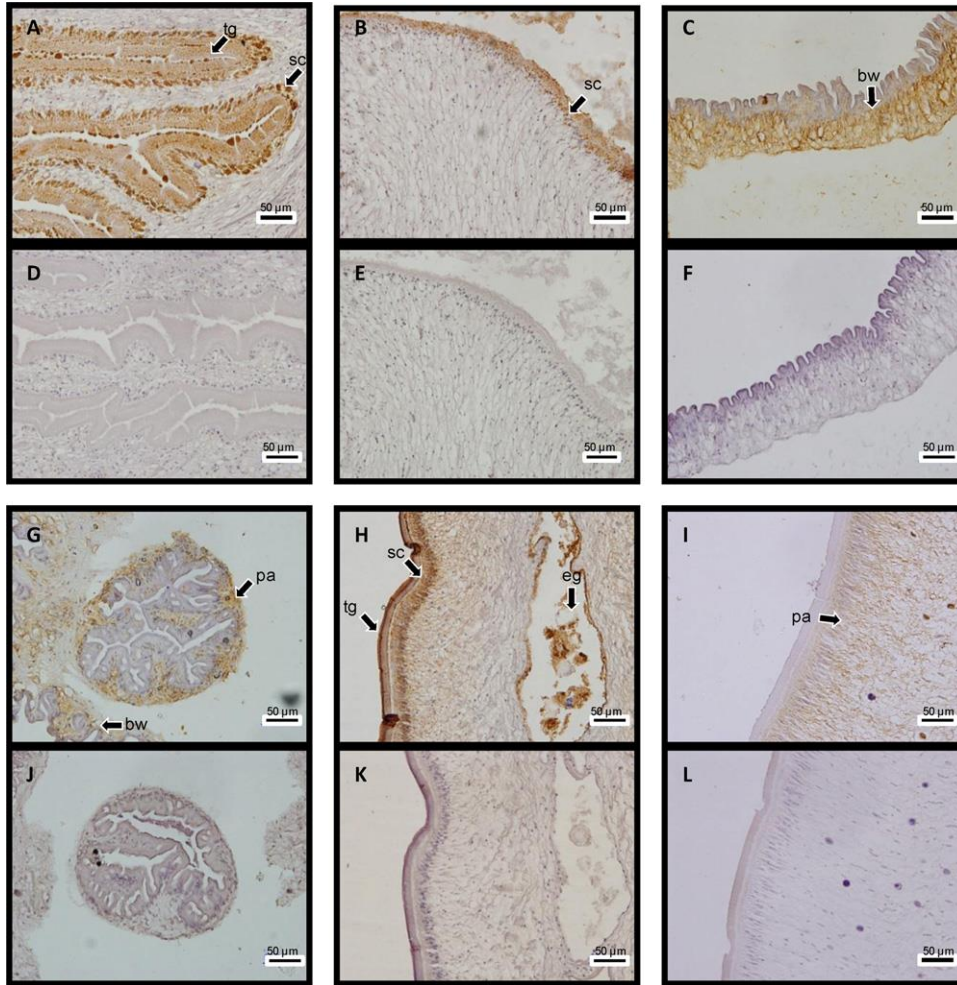


Fig. 3. Tissue immunolocalization of TsFABP1. Tissue sections from cysticerci of *T. solium* (A, D), *T. pisiformis* (B, E), *T. crassiceps* ORF (C, F) and WFU (G, J) strains, and adult worms of *T. saginata* (H, K) and *T. solium* (I, L). In A, B, C, G, H and I, the tissue sections were reacted with anti-TsFABP1 hyperimmune sera, whereas in D, E, F, J, K and L, were treated with preimmune sera. The corresponding second antibody was conjugated to horseradish peroxidase. Abbreviations: subtegumental cytons (sc), tegument (tg), bladder wall (bw), parenchyma (pa) and eggs (eg) are indicated by arrows. Reactions were developed with diaminobenzidine. All sections were counterstained with hematoxylin and eosin.

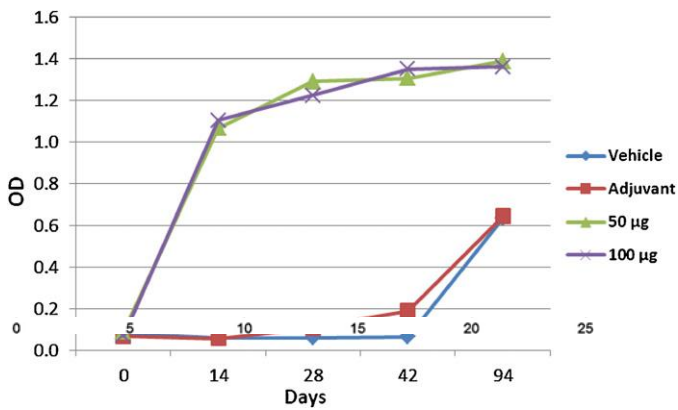


Fig. 4. Humoral immune response of mice after immunization with TsFABP1. Mice were immunized with 50 or 100 μg of TsFABP1, and bled at days 0, 14 and 28. At day 42, mice were challenged by intraperitoneal injection of 10 *T. crassiceps* cysts and sacrificed at day 94. Results from three independent experiments.

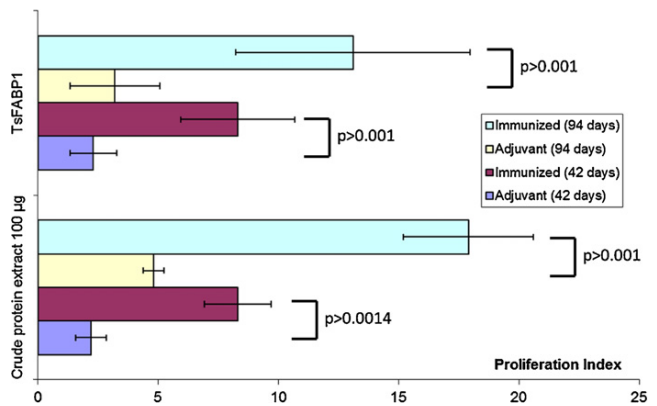


Fig. 5. Proliferation assays of mice spleen lymphocytes after immunization with TsFABP1. Groups of mice were injected with 50 μg of TsFABP1 (immunized) or adjuvant alone (Adjuvant). One group of Adjuvant and one group of immunized mice were challenged with 10 cysts at day 42 and sacrificed at day 94. The other two groups were just sacrificed at day 42. Spleen lymphocytes were obtained after sacrifice and stimulated with TsFABP1 or with a *T. crassiceps* crude antigenic extract. No significant differences were found when comparing groups 100 μg vs TsFABP1 ($p > 0.05$).

similar to TsFABP1, it binds better unsaturated than saturated FAs [30]. Moreover, EgFABP1 seems capable to bind two or even three FAs. In spite of the fact that methodology used for the characterization of FA binding in *E. granulosus* was different to the method that we used, both are competition fluorometric assays that should yield comparable results. Therefore, these differences suggested that TsFABP1 and EgFABP1 may fulfill different functions, even when they share the residues that are involved in the ligand stabilization, characteristic of the iLBP subfamily iv. In the case of *S. mansoni* Sm14 the proteins shows a clear preference toward longer FAs [16].

An intriguing finding was that TsFABP1 showed a high affinity toward arachidonic acid. This FA is used by *Taenia taeniaeformis* for the synthesis of the eicosanoids, thromboxane A2 and prostaglandin E2 [31,32]. It has also been reported that *S. mansoni* can synthesize a variety of eicosanoids after incorporation of linoleic acid [33]. Eicosanoids like TXA2 and PGE2, can modulate the immune response, thereby influencing some pathophysiological features of the parasite infection [34,35]. The possible relation between TsFABP1 specificity and the synthesis of eicosanoids in *T. solium* deserves investigation.

FABPs have been described as intracellular carriers of FAs [36]. It has been suggested that FABPs bind FAs that have been translocated by particular receptors through the lipid bilayer to the cytosolic side. Once bound, FAs are moved to the cellular compartment where they are going to be used [36]. Thus, the ability to bind different FAs suggested that TsFABP1 is involved in the transport of several fatty acids required for *T. solium* nourishment. Immunolocalization studies on larval and adult worm tissue sections, showed the presence of TsFABP in the tegumental compartment, suggesting that TsFABP1 could be involved in the mechanism by which FAs are mobilized from the translocation site on the tegument membrane, to other cellular compartments in the syncytium of this organism. Our results also evidenced diversity in the tissue localization of the TsFABP1 homologues in four species included in this study. In *T. solium* cysticerci, TsFABP1 was strongly associated with the scolex, being abundantly expressed in the tegument that is directly in contact with the spiral canal fluid, as well as in the associated subtegumental cytons. This localization suggested that the spiral canal might be a major place for FA uptake in the developing scolex. Because tapeworms lack a digestive tract and the total uptake of nutrients from their host occurs through the tegument, it is conceivable that the spiral canal plays a gut's "substitute" role, at least for the acquisition of FAs. The similar localization pattern observed in *T. pisiformis* cysticerci indicated an equivalent FA management in both species. In contrast, *T. crassiceps* WFU cysticerci did not show positive staining on the tegument of the spiral canal, however, there was an intense reaction associated to the parenchyma of the scolex, suggesting that a different route for the mobilization of FAs can be used by this species. On the other hand, the discrete staining of *T. solium* adult worm sections, in contrast to the fact that TsFABP1 is a highly expressed protein in the adult worm (see above), suggested that demand on FAs is lower for the mature proglotids that are close to being shed into the environment.

Several *in vivo* roles have been proposed for FABPs, including control of fatty acids intracellular levels to avoid toxicity [37], regulation of membrane microdomain composition [38], control of sleep and memory formation in fruit flies [39], nuclear translocation of some lipids [40], and even pro-inflammatory properties [41], among others. Recent reports on a related parasite, the trematode *C. sinensis*, showed that CsFABP is part of this parasite's excretion/secretion products [29]. Thus the participation of TsFABP1 in the mechanism of FA mobilization between compartments in an extensive syncytial tissue could constitute a novel role of this

multifaceted protein family, a role that may be essential for *T. solium*, considering its apparent impairment to synthesize long chain fatty acids [42].

In the lack of feasible conditions to carry out protection studies in pigs, because of the extreme difficulty to obtain *T. solium* eggs, we used the *T. crassiceps* cysticercosis model in mice, to determine the potential of TsFABP1 as a vaccine candidate. This model has been widely used for the evaluation of other vaccine candidates [43]. Vaccination assays in mice showed that immunization with TsFABP1 produced a 45% reduction in parasite load, irrespective of the dose used for immunization (50 or 100 g). This dose is higher than those used for other *T. solium* vaccine candidates in the same model: 2 g for the NC-1/BSA mimotope [44] and 20 g for the cysteine protease [45], and equal to the dose used for BLS-GK-1 in an oral immunization scheme [46].

Since the larvae recovered from immunized mice were morphologically undistinguishable from those recovered from control mice and were as capable to infect other mice as those from control mice (data not shown), the protective immune response induced by TsFABP1 immunization seems to interfere mostly on the parasite's establishment. Recovered cysts were vesicular and translucent, with no colloidal or caseous appearance, suggesting that the host protective response against surviving cysts was minimal and may depend on innate immunity mechanisms [47,48]. The complete protection in 12% of the mice (see above), is also in agreement with the concept of establishment impairing. This finding has been observed in other vaccine trials using the murine model of *T. crassiceps* cysticercosis [47,48].

FABPs of other flatworm parasites have also been tested as vaccine candidates. Immunization with FABP (rFH15) increased 50% the survival rates of mice challenged with *F. hepatica* and reduced hepatic lesions when administered using the adjuvant-immunomodulator system ADAD [49]. Moreover, immunization of mice with 100 g of *F. gigantica* FABP, reduced the mean worm burden (72.3%), the liver and intestinal egg counts (81.3% and 80.8%, respectively), and the hepatic granuloma counts (42%), after challenge with *S. mansoni* cercaria [50]. Also, vaccination with recombinant pseudorabies virus expressing both *S. japonicum* SjFABP and Sj26GST, produced 39.3% and 45.5% reductions in the number of worms and hepatic eggs (48.5% and 51.2%) in mice and sheep, respectively [51]. In the only report for a cestode FABP vaccine candidate (*E. granulosus* EgDf1) data are available for the cellular and humoral responses, but not for protection [52]. Thus, the present study is the first to provide data on protection against infection after immunization with a cestode FABP.

In our protection assays the presence of serum anti-TsFABP1 IgG antibodies was detected little after the first immunization. All mice produced specific antibodies after the challenge infection, although immunized mice presented higher titers. The production of anti TsFABP1 IgG antibodies in control groups should be noticed because these animals were never exposed to the recombinant protein, suggesting that the native TsFABP1 is exposed to the immune system within the course of the infection in this animal model of cysticercosis. This could also be explained if the TsFABP1 were part of the excretion/secretion products of the parasite, as described for *C. sinensis* CsFABP [29].

Recent reports on tapeworm's FABPs bring a new light on the importance of lipid mobilization and metabolism for these parasites. Tapeworms are among the most complex extensively syncytial organisms. In the context of a syncytial tissue, the intracellular mobilization of fatty acids carried out by TsFABP1, acquires a new dimension as a mechanism of energy supply to the whole organism.

Acknowledgements

This paper was supported in part by grants from Conacyt 61334 (JPL) and PAPIIT-UNAM IN 213711 (JPL). OI is a PhD student within the Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM; and was supported by a PhD fellowship from Conacyt. We thank P. de la Torre for helping the sequencing of plasmid constructs for TsFABP1; N. Sánchez and M. Calahorra for helping the spectrofluorometric assays; N. Villalobos and A. Jiménez for providing *T. solium* cysticerci and *T. crassiceps* WFU strain, respectively; and B. Hernández-Tellez and R Guerrero-Alquicira for supporting the immunochemistry assays.

References

- Thompson RC, Conlan JV. Emerging issues and parasite zoonoses in the SE Asian and Australasian region. *Veterinary Parasitology* 2011;181(1):69–73.
- Willingham 3rd AL, Wu HW, Conlan J, Satrija F. Combating *Taenia solium* cysticercosis in Southeast Asia: an opportunity for improving human health and livestock production. *Advances in Parasitology* 2010;72:235–66.
- Flisser A, Correa D. Neurocysticercosis may no longer be a public health problem in Mexico. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2010;4(12):e831.
- Flisser A, Gauci CG, Zoli A, Martínez-Ocaña J, Garza-Rodríguez A, Dominguez-Alpizar JL, et al. Infection and Immunity 2004;72:5292–7.
- Gonzalez AE, Gauci CG, Barber D, Gilman RH, Tsang VC, Garcia HH, et al. Vaccination of pigs to control human neurocysticercosis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2005;72:837–9.
- Assana E, Kyngdon CT, Gauci CG, Geerts S, Dorny P, De Deken R, et al. Elimination of *Taenia solium* transmission to pigs in a field trial of the TSOL18 vaccine in Cameroon. *International Journal of Parasitology* 2010;40:515–9.
- Morales J, Martínez JJ, Manoutcharian K, Hernández M, Fleury A, Gevorkian G, et al. Inexpensive anti-cysticercosis vaccine: S3Pvac expressed in heat inactivated M13 filamentous phage proves effective against naturally acquired *Taenia solium* porcine cysticercosis. *Vaccine* 2008;26(23):2899–905.
- Luo X, Zheng Y, Hou J, Zhang S, Cai X. Protection against Asiatic *Taenia solium* induced by a recombinant 45W-4B protein. *Clinical and Vaccine Immunology* 2009;16(2):230–2.
- Alvite G, Canclini L, Corvo I, Esteves A. Two novel Mesocostoides vogae fatty acid binding proteins – functional and evolutionary implications. *FEBS Journal* 2008;275(1):107–16.
- Hanhoff T, Lücke C, Spener F. Insights into binding of fatty acids by fatty acid binding proteins. *Molecular and Cellular Biochemistry* 2002;239(1–2):45–54.
- Rodríguez-Pérez J, Rodríguez-Medina JR, García-Blanco MA, Hillyer GV. Fasciola hepatica: molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of a gene encoding a polypeptide homologous to a Schistosoma mansoni fatty acid-binding protein. *Experimental Parasitology* 1992;74(4):400–7.
- Chunchob S, Grams R, Viyanant V, Smooker PM, Vichasri-Grams S. Comparative analysis of two fatty acid binding proteins from Fasciola gigantica. *Parasitology* 2010;137(12):1805–17.
- Esteves A, Portillo V, Ehrlich R. Genomic structure and expression of a gene coding for a new fatty acid binding protein from Echinococcus granulosus. *Biochimica et Biophysica Acta* 2003;1631(1):26–34.
- Yang D, Fu Y, Wu X, Xie Y, Nie H, Chen L, et al. Annotation of the transcriptome from *Taenia pisiformis* and its comparative analysis with three taeniidae species. *PLoS One* 2012;7(4):e32283.
- Kennedy MW, Scott JC, Lo S, Beauchamp J, McManus DP. Sj-FABPc fatty-acid-binding protein of the human blood fluke *Schistosoma japonicum*: structural and functional characterization and unusual solvent exposure of a portal-proximal tryptophan residue. *Biochemical Journal* 2000;349(Pt 1):377–84.
- Angelucci F, Johnson KA, Baiocco P, Miele AE, Brunori M, Valle C, et al. Schistosoma mansoni fatty acid binding protein: specificity and functional control as revealed by crystallographic structure. *Biochemistry* 2004;43(41):13000–11.
- Mutapi F, Bourke C, Harcus Y, Midzi N, Mduluzi T, Turner CM, et al. Differential recognition patterns of Schistosoma haematobium adult worm antigens by the human antibodies IgA, IgE1G1 and IgG4. *Parasite Immunology* 2011;33(3):181–92.
- Lee JS, Lee J, Park SJ, Yong TS. Analysis of the genes expressed in Clonorchis sinensis adults using the expressed sequence tag approach. *Parasitology Research* 2003;91(4):283–9.
- Jakobsson E, Alvite G, Bergfors T, Esteves A, Kleywegt GJ. The crystal structure of Echinococcus granulosus fatty-acid-binding protein 1. *Biochimica et Biophysica Acta* 2003;1649(1):40–50.
- Aguilar-Díaz H, Bobes RJ, Carrero JC, Camacho-Carranza R, Cervantes C, Cevallos MA, et al. The genome project of *Taenia solium*. *Parasitology International* 2006;55(Suppl):S127–30.
- Laclette JP, Shoemaker CB, Richter D, Arcos L, Pante N, Cohen C, et al. Paramyosin inhibits complement C1. *The Journal of Immunology* 1992;148(1):124–8.
- Richieri GV, Ogata RT, Kleinfeld AM. The measurement of free fatty acid concentration with the fluorescent probe ADIFAB: a practical guide for the use of the ADIFAB probe. *Molecular and Cellular Biochemistry* 1999;192(1–2):87–94.
- Richieri GV, Ogata RT, Zimmerman AW, Veerkamp JH, Kleinfeld AM. Fatty acid binding proteins from different tissues show distinct patterns of fatty acid interactions. *Biochemistry* 2000;39(24):7197–204.
- Barkia A, Mohamed K, Smaoui M, Zouari N, Hammami M, Nasri M. Change of diet, plasma lipids, lipoproteins, and fatty acids during Ramadan: a controversial association of the considered Ramadan model with atherosclerosis risk. *Journal of Health, Population and Nutrition* 2011;29(5):486–93.
- Nuernberg K, Breier BH, Jayasinghe SN, Bergmann H, Thompson N, Nuernberg G, et al. Metabolic responses to high-fat diets rich in n-3 or n-6 long-chain polyunsaturated fatty acids in mice selected for either high body weight or leanness explain different health outcomes. *Nutrition & Metabolism (London)* 2011;8(1):56.
- Więcek J, Rekiel A, Batorska M, Skomial J. Effect of restricted feeding and re-implantation periods on pork quality and fatty acid profile of *M. longissimus thoracis*. *Meat Science* 2011;87(3):244–9.
- Reese MG, Eeckman FH, Kulp D, Haussler D. Improved splice site detection in Genie. *Journal of Computational Biology* 1997;4(3):311–23.
- Richieri GV, Ogata RT, Kleinfeld AM. A fluorescently labeled intestinal fatty acid binding protein. Interactions with fatty acids and its use in monitoring free fatty acids. *The Journal of Biological Chemistry* 1992;267(33):23495–501.
- Huang L, Hu Y, Huang Y, Fang H, Li R, Hu D, et al. Gene/protein expression level, immunolocalization and binding characteristics of fatty acid binding protein from Clonorchis sinensis (CsFABP). *Molecular and Cell Biochemistry* 2012;363(1–2):367–76.
- Alvite G, Di Pietro SM, Santomé JA, Ehrlich R, Esteves A. Binding properties of Echinococcus granulosus fatty acid binding protein. *Biochimica et Biophysica Acta* 2001;1533(3):293–302.
- Leid RW, McConnell LA. Thromboxane A2 generation by the larval cestode *Taenia taeniaeformis*. *Clinical Immunology and Immunopathology* 1983;28(1):67–76.
- Leid RW, McConnell LA. PGE2 generation and release by the larval stage of the cestode *Taenia taeniaeformis*. Prostaglandins, Leukotrienes, and Medicine 1983;11(3 (July)):317–23.
- Fusco AC, Salafsky B, Kevin MB. Schistosoma mansoni: eicosanoid production by cercariae. *Experimental Parasitology* 1985 Feb;59(1):44–50.
- Ashton AW, Mukherjee S, Nagajyothi FN, Huang H, Braunstein VL, Desruis-seaux MS, et al. Thromboxane A2 is a key regulator of pathogenesis during Trypanosoma cruzi infection. *Journal of Experimental Medicine* 2007;204(4):929–40.
- Kristensson K, Nygård M, Bertini G, Bentivoglio M. African trypanosome infections of the nervous system: parasite entry and effects on sleep and synaptic functions. *Progress in Neurobiology* 2010;91(2):152–71.
- Doege H, Stahl A. Protein-mediated fatty acid uptake: novel insights from in vivo models. *Physiology (Bethesda)* 2006;21:259–68.
- Choromańska B, Myśliwiec P, Dadan J, Hady HR, Chabowski A. [The clinical significance of fatty acid binding proteins]. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej (Online)* 2011;65:759–63 [in Polish].
- McIntosh AL, Atshaves BP, Storey SM, Landrock KK, Landrock D, Martin GG, et al. Loss of liver fatty acid binding protein significantly alters hepatocyte plasma membrane microdomains. *Journal of Lipid Research* 2012;53(3):467–80.
- Gerstner JR, Vanderheyden WM, Shaw PJ, Landry CF, Yin JC. Cytoplasmic to nuclear localization of fatty-acid binding protein correlates with specific forms of long-term memory in Drosophila. *Communicative & Integrative Biology* 2011;4(5):623–6.
- Kaczocha M, Vivicca S, Sun J, Glaser ST, Deutsch DG. Fatty acid binding proteins transport N-acyl ethanolamines to nuclear receptors and are targets of endocannabinoid transport inhibitors. *Journal of Biological Chemistry* 2012;287(5):3415–24.
- Xu A, Vanhoutte PM. Adiponectin and adipocyte fatty acid binding protein in the pathogenesis of cardiovascular disease. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 2012;302(6):H1231–40.
- Tsai JJ, Zarowiecki M, Holroyd N, Sanchez-Flores A, Brooks K, Tracey A, et al. The genomes of four tapeworm species reveal extreme adaptations to parasitism, unpublished.
- Willms K, Zurabian R. *Taenia crassiceps*: in vivo and in vitro models. *Parasitology* 2010;137(3):335–46.
- Capelli-Peixoto J, Chávez-Olórtegui C, Chaves-Moreira D, Minozzo João C, Gabardo J, Nayara Teixeira K, et al. Evaluation of the protective potential of a *Taenia solium* cysticercosis mimotope on murine cysticercosis. *Vaccine* 2011;29(51):9473–9.
- Baig S, Damian RT, Morales-Montor J, Ghaleb A, Baghdadi A, White Jr AC. Protection from murine cysticercosis by immunization with a parasite cysteine protease. *Microbes and Infection* 2006;8(12–13):2733–5.
- Fragoso G, Esquivel-Guadarrama F, Santana MA, Bobes RJ, Hernández B, Cervantes J, et al. Heterologous prime-boost oral immunization with GK-1 peptide from *Taenia crassiceps* cysticerci induces protective immunity. *Clinical and Vaccine Immunology* 2011;18(7):1067–76.
- Toledo A, Fragoso G, Rosas G, Hernández M, Gevorkian G, López-Casillas F, et al. Two epitopes shared by *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* confer protection against murine *T. crassiceps* cysticercosis along with a prominent T1 response. *Infection and Immunity* 2001;69(3):1766–73.
- Toledo A, Larralde C, Fragoso G, Gevorkian G, Manoutcharian K, Hernández M, et al. Towards a *Taenia solium* cysticercosis vaccine: an epitope shared by *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* protects mice against experimental cysticercosis. *Infection and Immunity* 1999;67(5):2522–30.
- López-Abán J, Esteban A, Vicente B, Rojas-Caraballo J, Olmo ED, Martínez-Fernández AR, Hillyer GV, Muro A. Adaptive immune stimulation is required to obtain high protection with fatty acid binding protein vaccine candidate against Fasciola hepatica in Balb/C mice. *Journal of Parasitology* 2012;98(3):527–35.

- [50] Rabia Aly I, Diab M, El-Amir AM, Hendawy M, Kadry S. Fasciola gigantica fatty acid binding protein (FABP) as a prophylactic agent against Schistosoma mansoni infection in CD1 mice. *The Korean Journal of Parasitology* 2012;50(1):37–43.
- [51] Wei F, Zhai Y, Jin H, Shang L, Men J, Lin J, Fu Z, Shi Y, Zhu XQ, Liu Q, Gao H. Development and immunogenicity of a recombinant pseudorabies virus expressing Sj26GST and SjFABP from Schistosoma japonicum. *Vaccine* 2010;28(32):5161–6.
- [52] Chabalgoity JA, Moreno M, Carol H, Dougan G, Hormaeche CE. Salmonella typhimurium as a basis for a live oral Echinococcus granulosus vaccine. *Vaccine* 2000;19(4–5):460–9.

2 Las proteínas intracelulares de unión a lípidos (iLBPs).

Las FABPs son ubicadas junto con las proteínas celulares de unión a ácido retinoico (CRABP) o retinol (CRBP), y las proteínas acarreadoras de esteroides, dentro del grupo de las proteínas intracelulares de unión a lípidos (iLBPs) (Chytil y Ong 1987; Pastuszyn et al. 1987; Jones et al. 1988; Thompson et al. 1999), que se clasifican como calicinas de acuerdo con su estructura, junto con las lipocalinas y avidinas (Flower 1993). Las FABPs son las proteínas más numerosas dentro de las iLBPs, que se encuentran ampliamente distribuidas en los animales vertebrados, además representan normalmente entre 2 y 5% de las proteínas totales del citosol de las células en las que son expresadas (Esteves et al. 1997).

En mamíferos es normal encontrar que se expresan distintas FABPs y otras iLBPs en un solo individuo, de manera diferenciada de acuerdo al tejido. Aunque son capaces de unir una gran cantidad de ligandos, en general unen con mayor afinidad ácidos grasos de entre 16 y 20 carbonos, u otras moléculas hidrofóbicas de tamaño similar. Entre los no vertebrados, se ha reportado su presencia en acáridos como *Blomia tropicalis*, *Lepidoglyphus destructor* y *Acarus Siro*, crustáceos como *Metapenaeus ensis* y *Eriocheir sinensis*, insectos como *Schistocerca gregaria*, *Locusta migratoria*, *Anopheles gambiae*, *Dipetalogaster maximus*, *Manduca sexta*, *Apis mellifera*, *Drosophila melanogaster* y *Luciola cerata* (Esteves y Ehrlich 2006; Gerstner et al. 2011; Goh y Li 2011; Cheng et al. 2013).

2.1 Estructura terciaria de iLBPs.

La estructura terciaria de las iLBPs está formada por 10 láminas β -plegadas antiparalelas que forman un cilindro, y dos hélices α que se ubican perpendiculares a las láminas, en una posición semejante a la de una tapa, dando forma a una estructura de barril (barril β). Dentro de éste, queda delimitado un espacio donde puede ubicarse el ligando (**Figura 4**). Esta estructura está altamente conservada en estas proteínas sin importar el organismo en el que se hayan aislado, e independientemente del grado de identidad o semejanza que pueda existir entre las secuencias aminoacídicas de distintas proteínas.

Se ha reportado que las iLBPs de nemátodos como *Caenorhabditis elegans*, presentan en su extremo amino terminal un péptido señal putativo que les permitiría ser secretadas (Nilsen 1993), sin embargo esta característica no ha sido encontrada en ninguna otra iLBP, y en general son consideradas intracelulares. A pesar de ello, existen reportes en *S. mansoni* y *E. granulosus* de la presencia de

iLBPs parasitarios como productos de excreción-secreción (Cass et al. 2007; Virginio et al. 2012).

Ninguna iLBP presenta una señal de localización nuclear en su secuencia aminoacídica, aunque su presencia en el núcleo, necesaria para algunas de sus funciones, ha sido reportada (Hostetler et al. 2009). Estudios en la CRABP-II y la A-FABP demuestran que tres residuos básicos localizados en la región hélice-giro-hélice de estas proteínas, K21, R29 y K30 en el caso de CRABP II y K21, R30, R31 en la A-FABP, forman una señal de localización nuclear funcional al unirse a determinados ligandos, y sin aparente relación con sus afinidades de unión por los mismos (Sessler y Noy 2005; Ayers et al. 2007).

2.2 Clasificación.

Para su estudio, las iLBPs pueden dividirse en 4 subgrupos de acuerdo con la cantidad de ligandos hidrofóbicos que son capaces de unir, la homología de su secuencia y la forma en que los ligandos se acomodan dentro de la bolsa (Hanhoff et al. 2002):

i) Incluye a las proteínas con una alta afinidad por el ácido retinoico y sus derivados, es decir CRBP y CRABP. Unen un solo ligando, cuyo grupo funcional se encuentra orientado hacia dentro de la cavidad al unirse, mientras la cola isoprenoide y el anillo se ubican cerca de las hélices α .

ii) Incluye proteínas con la capacidad de unir ligandos de mayor tamaño, como ácidos biliares o eicosanoides, gracias a que presenta una bolsa con mayor espacio. Además son capaces de unir 2 ligandos en lugar de 1, el primero se ubica curvado dentro de la bolsa, con su grupo carboxilato interaccionando con un residuo de arginina, y el segundo sin curvar y con el extremo carboxilato fuera de la bolsa. Ejemplos de este grupo son la L-FABP y la proteína de unión a ácido biliar intestinal (I-BABP).

iii) El único miembro es la I-FABP, que se caracteriza por unir 1 ligando ligeramente curvado, con el grupo carboxilato dentro de la bolsa, donde interacciona con el residuo R106 y orientando la cola alifática hacia las hélices α , donde interacciona con F55.

iv) La mayor parte de las FABPs se encuentra en este grupo, caracterizado por una tercer hélice α localizada en el extremo amino, y por unir un solo ligando en una conformación en "U", donde el grupo carboxilato se encuentra dentro del barril, interaccionando con los residuos R106, R126 y

Y128, mientras el extremo alifático se encuentra orientado hacia el conjunto hélice-giro-hélice, donde interacciona con F57 o L60.

2.3 Mecanismo de acción intracelular.

La principal acción de las iLBPs es el transporte de ácidos grasos entre membranas, siendo para ello necesario un mecanismo por el cual cargue y descargue su ligando hidrofóbico desde o hacia una membrana. Existen al menos dos tipos de mecanismos para ello, el primero es difusional, en el que la proteína se libera al medio acuoso y no es afectada por la relación de cargas en la superficie de la membrana, como ocurre con la L-FABP y la CRABP-II. El segundo mecanismo es colisional, en el que ocurre una interacción directa membrana-proteína sin pasar por el medio acuoso, la composición de la membrana y sus cargas superficiales son determinantes, y se presenta en todas las iLBPs de mamíferos, salvo las mencionadas anteriormente, además de la SjFABPc de *S. japonicum* y la EgFABP1 de *E. granulosus*. Aún con la diferencias entre uno y otro, ambos mecanismos dependen para su funcionamiento de la fuerza iónica del medio, y en ambos casos se considera que existe algún tipo de interacción de la proteína con la membrana (Hsu y Storch 1996; McDermott et al. 2002; Storch et al. 2002; Porfido et al. 2012).

2.4 Localización tisular y funciones en vertebrados.

Además de la división de las iLBPs en subfamilias existen otras clasificaciones para las proteínas en esta familia. Cuando las FABPs comenzaron a ser identificadas en animales, se hizo evidente que eran expresadas preferentemente por un tejido u otro, lo que llevó a clasificarlas de acuerdo al tejido en el que eran predominantes o en el que fueron descubiertas. Conforme se fueron identificando nuevas proteínas, se observó que podían estar presentes de manera importante en más de un tejido, lo que llevó a clasificarlas numéricamente (**Tabla 7**).

Tabla 7. FABPs en vertebrados, nomenclatura y funciones principales (1 de 2).

FABP	Letra/nombre (tejido)	Función	Referencia
1	L (hígado)	Necesario para la β -oxidación y metabolismo de ácidos grasos de cadena larga, regulación de proliferación celular, y para la generación de quilomicrones.	(Binas y Erol 2007; Hostetler et al. 2009; Neeli et al. 2009).

Tabla 7. FABPs en vertebrados, nomenclatura y funciones principales (2 de 2).

FABP	Letra/nombre (tejido)	Función	Referencia
2	I (intestino)	Necesario para la síntesis de triglicéridos, su ausencia genera diversos desórdenes relacionados al metabolismo de lípidos.	(Agellon et al. 2007; Lagakos et al. 2011).
3	H (corazón)	Predominante en cerebro adulto y músculo estriado, participa en la diferenciación del cardiomiocito y su proliferación. Homeostasis de ácidos grasos en cerebro. Necesario para β -oxidación y metabolismo de ácidos grasos.	(Tang et al. 2004; Murphy et al. 2005; Binas y Erol 2007).
4	A (tejido adiposo)	Modula la respuesta inflamatoria en macrófagos y es necesaria para la producción de citocinas vía JNK. Lipólisis y almacenaje de triglicéridos en tejido adiposo, regulación de proliferación celular en queratinocitos.	(Coe et al. 1999; Schug et al. 2007; Erbay et al. 2009; Hui et al. 2010).
5	K (keratinocito) E (epidermis)	Mismas funciones que A-FABP en tejido adiposo. Desarrollo embrionario de sistema nervioso. Regulación de proliferación celular en queratinocitos.	(Hertzel y Bernlohr 2000; Shaughnessy et al. 2000; Schug et al. 2007; Owada 2008).
6	I-LBP (íleon)	Responsable del transporte de ácidos biliares en enterocitos. Parece estar relacionada con algunos tipos de carcinogénesis.	(Ohmachi et al. 2006; Praslickova et al. 2012).
7	B (cerebro)	Desarrollo embrionario de sistema nervioso. Incorporación y metabolismo del ácido docosahexanoico (DHA).	(Owada 2008).
8	PMP2* (mielinocitos)	Predominante en sistema nervioso periférico durante su desarrollo.	(Trapp et al. 1984).
9	T (testículos)	Involucrado en espermatogénesis y en apoptosis de líneas germinales.	(Kido y Namiki 2000).
10	Lb (básica de hígado)	No se expresa en mamíferos. Transporte de ácidos biliares.	(Murai et al. 2009).
11		No se expresa en mamíferos. Vitelogénesis.	(Agulleiro et al. 2007).
12		No se expresa en mamíferos. Reportada en testículos y retina.	(Liu et al. 2008).

*Proteína de mielina periférica 2.

En un principio, se consideró que las iLBPs tenían como función general la solubilización y protección de su ligando, así como facilitar su transporte a través del citosol (Coe y Bernlohr 1998), sin embargo, dicha actividad es poco específica y puede ser realizada por otras proteínas como la albúmina (Luxon y Milliano 1997). De manera más reciente, y en función de sus mecanismos de carga y descarga de ligando, se postuló que las proteínas con mecanismo colisional están orientadas al transporte de lípidos, mientras las de mecanismo difusional están relacionadas con regulación y almacenaje (Porfido et al. 2012).

Avances en el estudio de las iLBPs, centrados principalmente en vertebrados, y más específicamente en mamíferos como el humano o el ratón, han hecho evidente que estas proteínas participan en un gran número de procesos biológicos como la regulación de proliferación celular, desarrollo embrionario, diferenciación celular, β -oxidación, síntesis de eicosanoides, regulación de biosíntesis lipídica, supresión tumoral por inducción de apoptosis, entre otras (Tan et al. 2002; Manor et al. 2003). También hay indicios de que la presencia de iLBPs favorece la absorción de medicamentos hidrofóbicos, y aunque esta no sea su función biológica primordial, hace evidente la importancia de estas proteínas en la absorción de nutrientes (Velkov et al. 2007; Velkov et al. 2009).

2.5 iLBPs reportadas en helmintos.

Distintas iLBPs han sido identificadas en parásitos como *S. mansoni*, *S. japonicum*, *F. hepatica*, *F. gigantica*, *C. sinensis*, *M. vogae*, *E. granulosus*, *Moniezia expansa*, *T. multiceps* y *A. suum*. (Moser et al. 1991; Rodriguez-Perez et al. 1992; Becker et al. 1994; Janssen y Barrett 1995; Estuningsih et al. 1997; Mei et al. 1997; Michalski et al. 2002; Alvite et al. 2008; Huang et al. 2012; Nie et al. 2013). Cabe mencionar que también ha sido reportada la probable presencia de FABPs en filarias como *Loa loa*, *Brugia malayi*, *Onchocerca volvulus* y *Wuchereria bancrofti* (Desjardins et al. 2013), así como en *T. pisiformis* (Yang et al. 2012). Esta amplia distribución hace pensar que la presencia de estas proteínas está generalizada tanto en nemátodos, como en cestodos y tremátodos.

De las anteriores, el caso de la iLBP de *F. hepatica* merece mención aparte por tratarse de un complejo de al menos 8 proteínas con puntos isoeléctricos diferentes y el mismo peso molecular en el caso de la proteína nativa (nFh12), a diferencia de la forma recombinante (Fh15) que tiene distinto peso, punto isoeléctrico e incluso es inmunogénicamente diferente (Espino et al. 2001). Incluso se ha reportado la presencia de otra iLBP nativa de distinto peso molecular (Fh13), y que aparentemente presentaría afinidades de unión por ácidos grasos diferentes

(Timanova-Atanasova et al. 2004). Algo más que caracteriza a las iLBPs de parásitos es la alta conservación de su secuencia, lo que lleva a un fenómeno de inmunoreactividad cruzada, que se ha comprobado en parásitos como *C. sinensis*, *S. mansoni* y *F. hepatica* (Tendler et al. 1996; Lee y Yong 2004; Rabia Aly et al. 2012), esta reactividad cruzada ha permitido incluso realizar ensayos para desarrollar vacunas contra objetivos múltiples (Tendler et al. 1996; Abane et al. 2000; Almeida et al. 2003; Rabia Aly et al. 2012).

2.6 Funciones de las iLBPs en helmintos.

Dada la aparente incapacidad de los helmintos para sintetizar ácidos grasos, las distintas FABPs han sido relacionadas principalmente con la obtención de los mismos, así como de otras moléculas lipídicas a partir del hospedero. Tal es el caso de *S. mansoni* y *S. japonicum*, donde se ha detectado que la expresión de iLBP es mayor en los estadios parasitarios que en los acuáticos, y además se considera que su presencia es importante para la formación de membranas, la maduración sexual y la producción de huevos (Han et al. 2009). Otras posibilidades son que participe en el proceso de β -oxidación, pues *T. crassiceps* parece utilizarla como fuente de energía bajo estrés (Vinaud et al. 2009), y para obtener precursores para la formación de prostaglandinas como el ácido araquidónico. También se ha propuesto que ayude a proteger al parásito de concentraciones tóxicas de derivados lipídicos, tales como las sales biliares y el ácido araquidónico, que actúa activando la esfingomielinasa parasitaria asociada a membrana, lo que induce la hidrólisis de esta última (El Ridi et al. 2012), o bien de fármacos antihelmínticos (Timanova-Atanasova et al. 2004).

3. Determinación de afinidades de unión.

3.1 Métodos reportados para la determinación de afinidades de unión.

Existen distintos tipos de ensayos que pueden ser utilizados para determinar la afinidad de unión de una proteína por un ligando en estado acuoso, uno de ellos es el ensayo de desdoblamiento térmico, el cual se basa en el hecho de que una proteína sin ligando se desdobla, perdiendo su estructura terciaria, a una temperatura menor que una proteína unida a ligando, la diferencia entre estas dos temperaturas puede usarse para calcular la afinidad por el ligando (Velkov et al. 2009).

Entre los ensayos fluorométricos, uno de los más utilizados es el de ADIFAB, consiste en la competencia entre ésta y una proteína a probar, por unir un determinado ácido graso. ADIFAB, es una forma recombinante y acrilodada de la I-FABP de rata (*Rattus norvegicus*), cuya secuencia ha sido modificada para incluir un fluoróforo sin modificar su capacidad de formar la característica estructura terciaria de barril, y por tanto reteniendo su capacidad de unir ácidos grasos. En su forma libre (sin ligando), el ADIFAB fluoresce emitiendo luz a una longitud de diferente que cuando se encuentra unido a un ácido graso. El cambio en la longitud de emisión del ADIFAB permite determinar la cantidad del mismo que se encuentra libre o unido a ligando, y durante un ensayo de competencia con una proteína a probar, permite calcular la cantidad de dicha proteína libre o unida a ligando. A partir de estos datos se puede obtener la afinidad de unión por el ligando que se haya utilizado (Richieri et al. 1994).

Otros ensayos fluorométricos para determinar afinidades de unión son los del ácido 11-(5-dimetilaminonaftaleno-1-sulfonilamino)-undecanoico (DAUDA), el ácido cis-parinámico (AcP) o el ácido trans-parinámico (AtP), todos fluorescentes y con longitudes diferenciales al encontrarse libres o unidos a una proteína. Esto permite realizar ensayos donde se determina qué cantidad del DAUDA, AcP o AtP es desplazada por el ligando a probar, determinando a partir de ello la afinidad de unión (Brunaldi et al. 2007).

3.2 Afinidades de unión de iLBPs parasitarias.

Existen muy pocos estudios acerca de las afinidades de unión de iLBPs de parásitos (**Tabla 7**), y pueden encontrarse reportadas con valores de constante de disociación (K_D), constante de inhibición (K_i) o desplazamiento porcentual. La K_i es una constante que indica de manera relativa la afinidad de la proteína ensayada por el lípido en cuestión, pues se calcula en base a la reducción en la intensidad de emisión del ligando fluoróforo al ser desplazado por dicho lípido, mientras que la K_D se calcula en base a la cantidad del lípido que se encuentra unido a la proteína, en ambos casos el valor de la constante es inversamente proporcional a la afinidad. El desplazamiento porcentual es también una medida relativa, indica el porcentaje del fluoróforo que fue desplazado por el lípido ensayado a una concentración determinada, de modo su valor es directamente proporcional a la afinidad.

Tabla 8. Afinidades de iLBPs parasitarios por distintos lípidos.

iLBP (Parásito)	Técnica	Lípidos	K _D	K _i	D%	Referencia
CsFABP (<i>C. sinensis</i>)	DAUDA	DAUDA C10:0* C12:0 C14:0 C16:0 C18:0 C18:1 C18:2	1.58	2.10 1.10 0.93 0.74 0.73 0.24 0.59		(Huang et al. 2012).
Fh13 (<i>F. hepatica</i>)	DAUDA	C16:0 C18:1 C20:4 A. retinoico	4.1 2.5 6.8 2.8			(Timanova-Atanasova et al. 2004).
SjFABPc (<i>S. japonicum</i>)	AcP	AcP C18:1	2.5	0.08		(Kennedy et al. 2000).
EgFABP (<i>E. granulosus</i>)	AtP AcP	AtP AcP C16:0 C16:1 C18:0 C18:1 C18:2 C18:3 C20:0 C20:4 A. retinoico Retinol	0.03 0.36		76 75 59 88 82 79 29 93 7 1	(Alvite et al. 2001).

K_D: constante de disociación, K_i: constante de inhibición, D%: Desplazamiento porcentual, DAUDA: ácido 11-(5-dimetilaminonaftaleno-1-sulfonilamino)-undeacanoico, AcP: Ácido cis-parinámico, AtP: Ácido trans-parinámico. *: Ácido decanoico (10:0), láurico (12:0), mirístico (14:0), palmítico (16:0), palmitoleico (16:1), esteárico (18:0), oleico (18:1), linoleico (18:2), linolénico (18:3), araquídico (20:0), araquidónico (20:4). Todos los valores de K_D y K_i en μM.

4. Gráficas para la determinación de K_D y n .

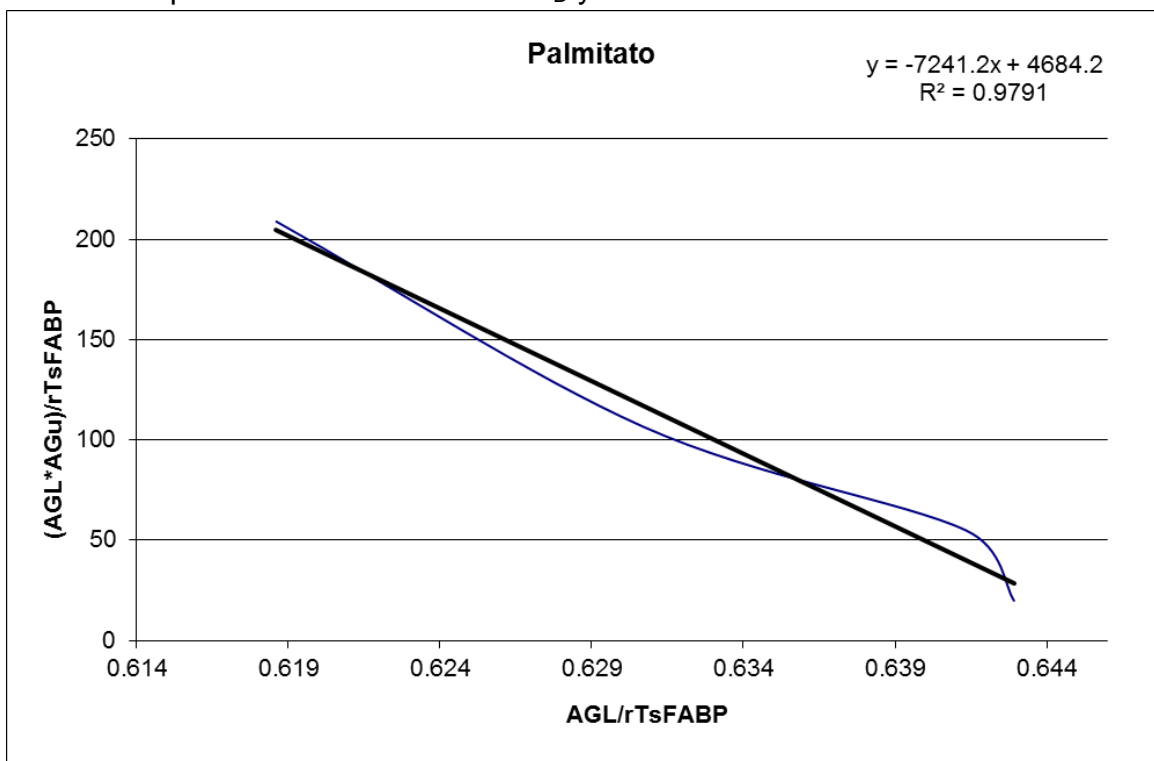


Figura 12. Gráfica de Scatchard para palmitato.

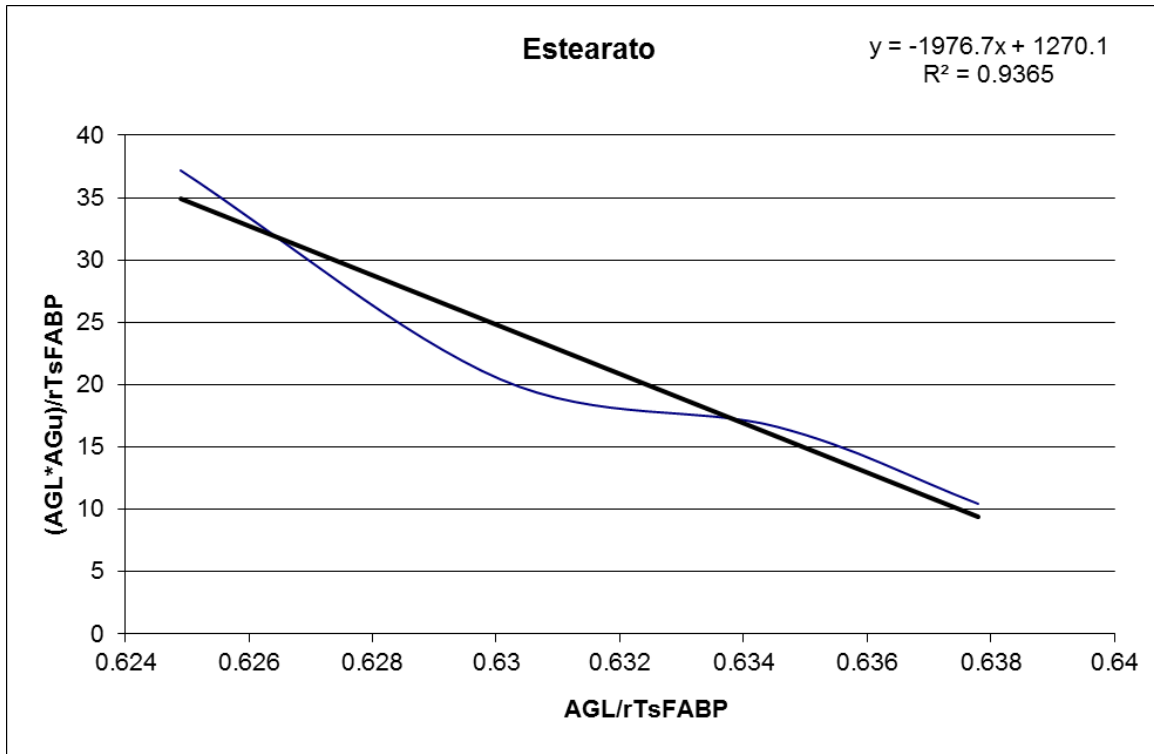


Figura 13. Gráfica de Scatchard para estearato.

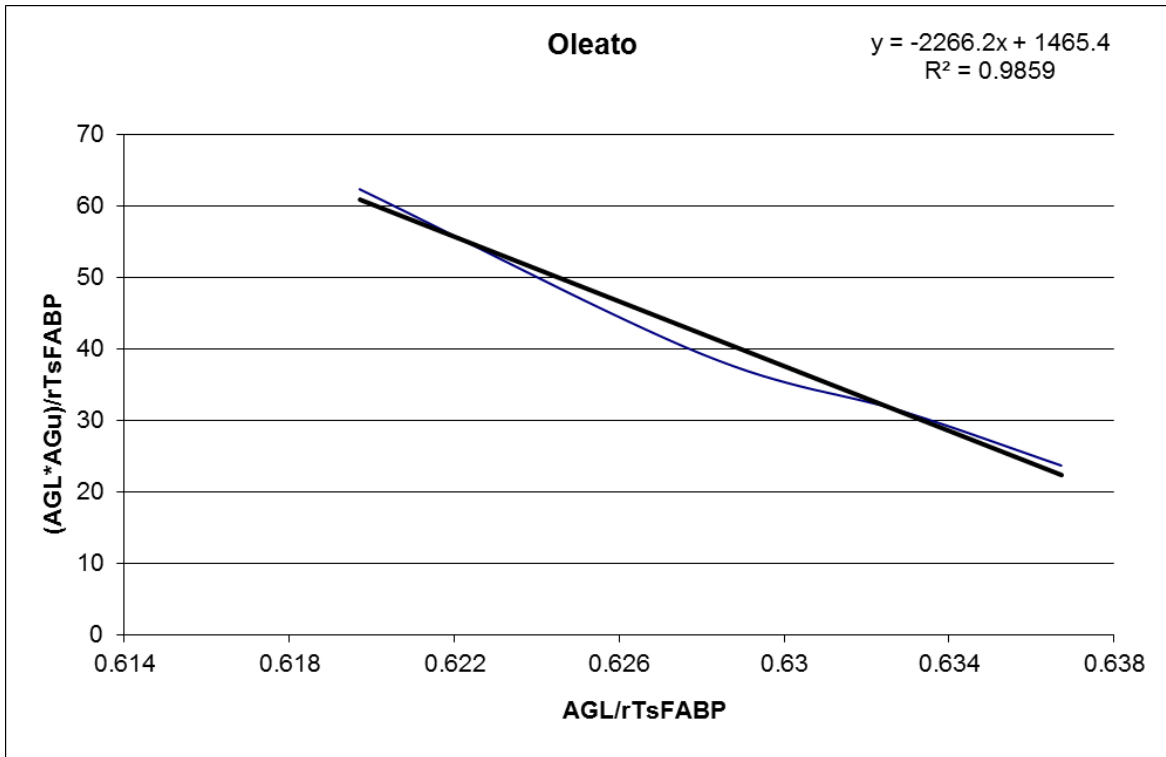


Figura 14. Gráfica de Scatchard para oleato.

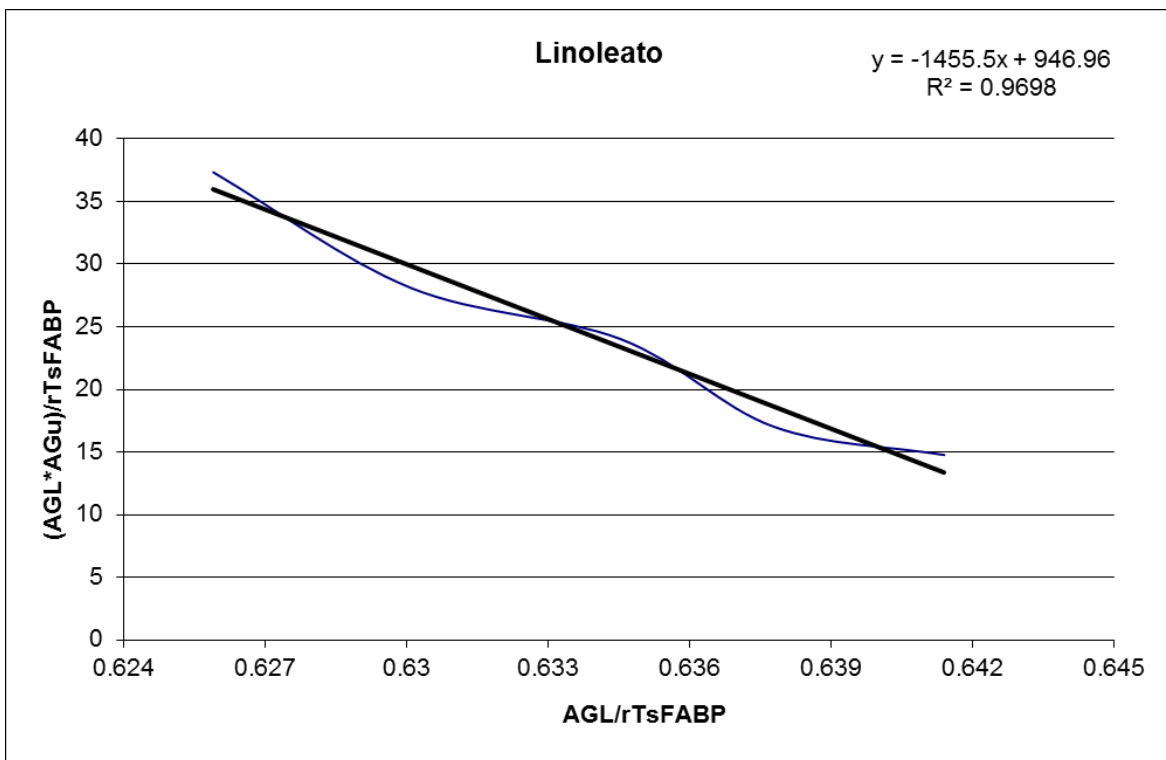


Figura 15. Gráfica de Scatchard para linoleato.

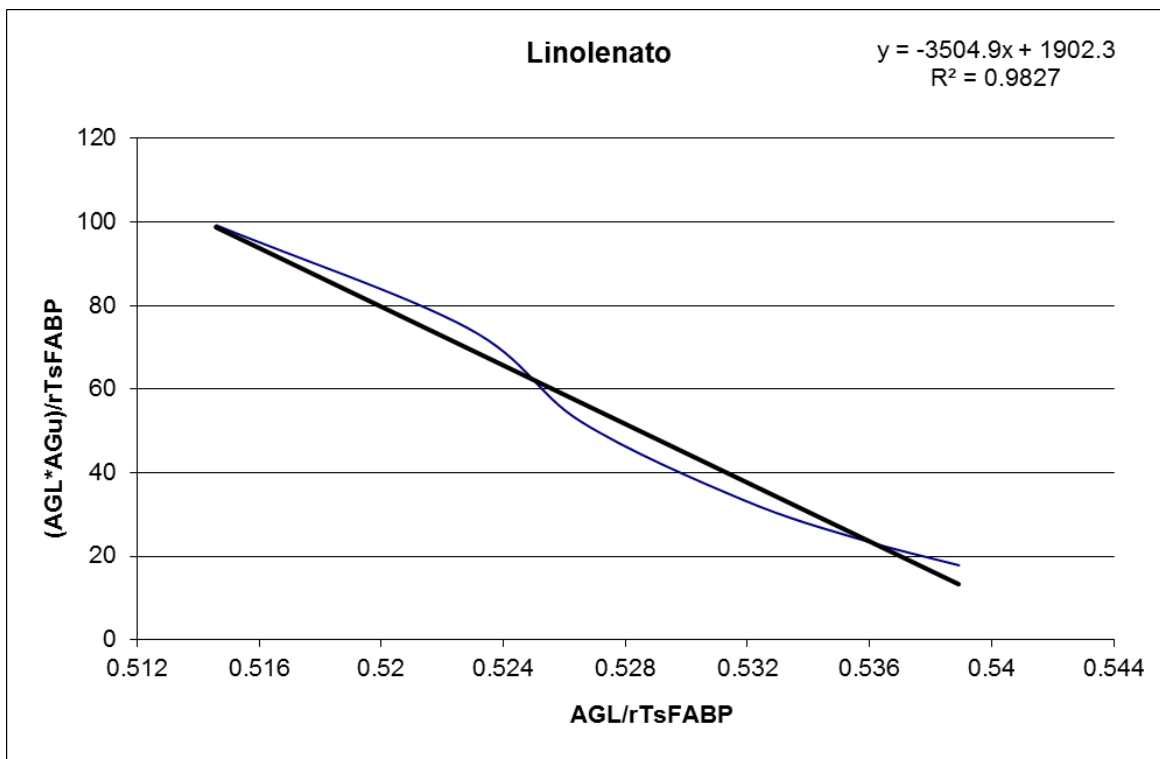


Figura 16. Gráfica de Scatchard para linolenato.

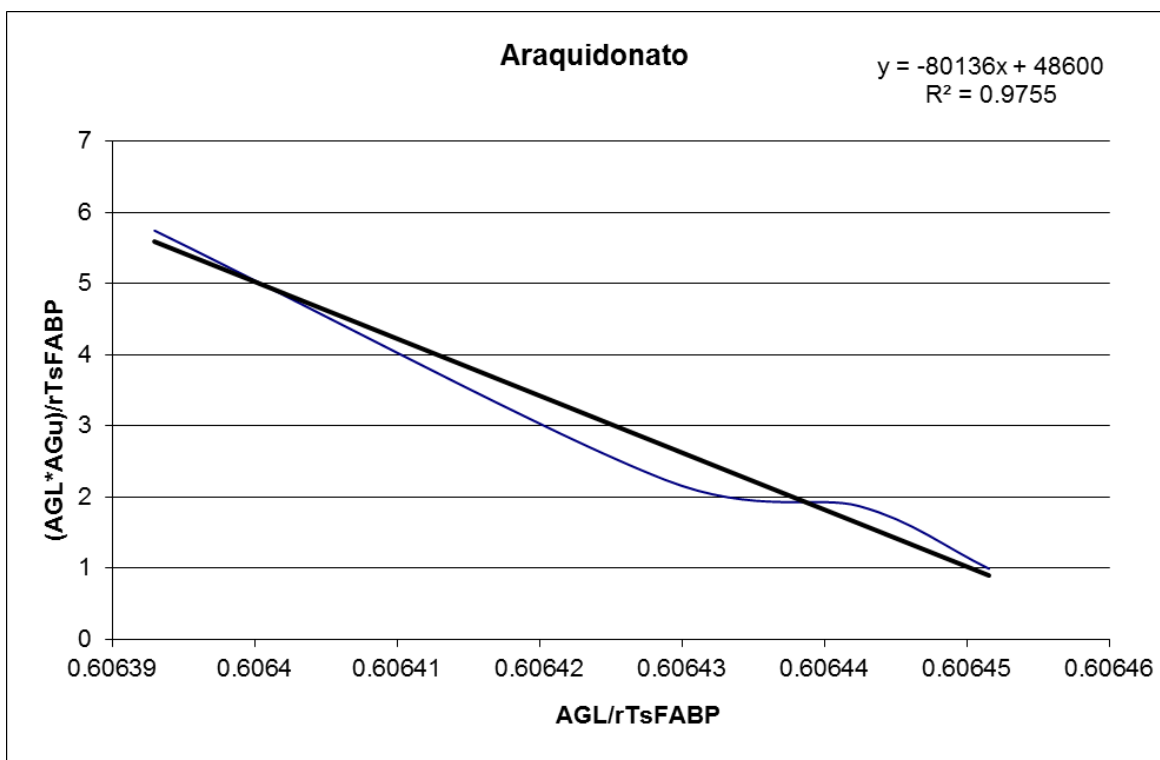


Figura 17. Gráfica de Scatchard para araquidonato.

La ecuación graficada (4) se encuentra indicada en la sección de **Materiales y Métodos**, en el punto 3.2.

X Referencias

- Aban, J. L., V. Ramajo, J. L. Arellano, A. Oleaga, G. V. Hillyer y A. Muro (1999). "A fatty acid binding protein from *Fasciola hepatica* induced protection in C57/BL mice from challenge infection with *Schistosoma bovis*." *Vet Parasitol* **83**(2): 107-121.
- Abane, J. L., A. Oleaga, V. Ramajo, P. Casanueva, J. L. Arellano, G. V. Hillyer y A. Muro (2000). "Vaccination of mice against *Schistosoma bovis* with a recombinant fatty acid binding protein from *Fasciola hepatica*." *Vet Parasitol* **91**(1-2): 33-42.
- Aceves-Ramos, A., R. A. Valdez, B. Gaona, K. Willms y M. C. Romano (2013). "Steroid synthesis by *Taenia crassiceps* WFU *cysticerci* is regulated by enzyme inhibitors." *Gen Comp Endocrinol* **188**: 212-217.
- Agellon, L. B., L. Drozdowski, L. Li, C. Iordache, L. Luong, M. T. Clandinin, R. R. Uwiera, M. J. Toth y A. B. Thomson (2007). "Loss of intestinal fatty acid binding protein increases the susceptibility of male mice to high fat diet-induced fatty liver." *Biochim Biophys Acta* **1771**(10): 1283-1288.
- Aguilar-Díaz, H., R. J. Bobes, J. C. Carrero, R. Camacho-Carranza, C. Cervantes, M. A. Cevallos, G. Davila, M. Rodríguez-Dorantes, G. Escobedo, J. L. Fernández, G. Fragoso, P. Gaytan, A. Garciarubio, V. M. González, L. González, M. V. José, L. Jiménez, J. P. Lacleste, A. Landa, C. Larralde, J. Morales-Montor, E. Morett, P. Ostoa-Saloma, E. Sciutto, R. I. Santamaria, X. Soberon, P. de la Torre, V. Valdes y J. Yanez (2006). "The genome project of *Taenia solium*." *Parasitol Int* **55 Suppl**: S127-130.
- Agulleiro, M. J., M. Andre, S. Morais, J. Cerda y P. J. Babin (2007). "High transcript level of fatty acid-binding protein 11 but not of very low-density lipoprotein receptor is correlated to ovarian follicle atresia in a teleost fish (*Solea senegalensis*)." *Biol Reprod* **77**(3): 504-516.
- Almeida, M. S., H. Torloni, P. Lee-Ho, M. M. Vilar, N. Thaumaturgo, A. J. Simpson y M. Tendler (2003). "Vaccination against *Fasciola hepatica* infection using a *Schistosoma mansoni* defined recombinant antigen, Sm14." *Parasite Immunol* **25**(3): 135-137.
- Alvite, G., L. Canclini, I. Corvo y A. Esteves (2008). "Two novel Mesocestoides

vogae fatty acid binding proteins--functional and evolutionary implications." FEBS J **275**(1): 107-116.

- Alvite, G., S. M. Di Pietro, J. A. Santome, R. Ehrlich y A. Esteves (2001). "Binding properties of Echinococcus granulosus fatty acid binding protein." Biochim Biophys Acta **1533**(3): 293-302.

- Avila, G., L. Aguilar, M. Romero-Valdovinos, F. Garcia-Vazquez y A. Flisser (2008). "Cytokine response in the intestinal mucosa of hamsters infected with Taenia solium." Ann N Y Acad Sci **1149**: 170-173.

- Ayers, S. D., K. L. Nedrow, R. E. Gillilan y N. Noy (2007). "Continuous nucleocytoplasmic shuttling underlies transcriptional activation of PPARgamma by FABP4." Biochemistry **46**(23): 6744-6752.

- Baig, S., R. T. Damian, J. Morales-Montor, A. Ghaleb, A. Baghdadi y A. C. White, Jr. (2006). "Protection from murine cysticercosis by immunization with a parasite cysteine protease." Microbes Infect **8**(12-13): 2733-2735.

- Barkia, A., K. Mohamed, M. Smaoui, N. Zouari, M. Hammami y M. Nasri (2011). "Change of diet, plasma lipids, lipoproteins, and fatty acids during Ramadan: a controversial association of the considered Ramadan model with atherosclerosis risk." J Health Popul Nutr **29**(5): 486-493.

- Becker, M. M., B. H. Kalinna, G. J. Waine y D. P. McManus (1994). "Gene cloning, overproduction and purification of a functionally active cytoplasmic fatty acid-binding protein (Sj-FABPC) from the human blood fluke Schistosoma japonicum." Gene **148**(2): 321-325.

- Bergquist, N. R. y D. G. Colley (1998). "Schistosomiasis vaccine: research to development." Parasitol Today **14**(3): 99-104.

- Berriman, M., B. J. Haas, P. T. LoVerde, R. A. Wilson, G. P. Dillon, G. C. Cerqueira, S. T. Mashiyama, B. Al-Lazikani, L. F. Andrade, P. D. Ashton, M. A. Aslett, D. C. Bartholomeu, G. Blandin, C. R. Caffrey, A. Coghlan, R. Coulson, T. A. Day, A. Delcher, R. DeMarco, A. Djikeng, T. Eyre, J. A. Gamble, E. Ghedin, Y. Gu, C. Hertz-Fowler, H. Hirai, Y. Hirai, R. Houston, A. Ivens, D. A. Johnston, D. Lacerda, C. D. Macedo, P. McVeigh, Z. Ning, G. Oliveira, J. P. Overington, J. Parkhill, M. Perteira, R. J. Pierce, A. V. Protasio, M. A. Quail, M. A. Rajandream, J. Rogers, M. Sajid, S. L. Salzberg, M. Stanke, A. R. Tivey, O. White, D. L. Williams, J. Wortman, W. Wu, M. Zamanian, A. Zerlotini, C. M. Fraser-Liggett, B. G. Barrell y N. M. El-Sayed (2009). "The genome of the blood fluke Schistosoma mansoni." Nature **460**(7253): 352-358.

- Betancourt, M. A., A. S. de Aluja, E. Sciutto, M. Hernandez, R. J. Bobes, G. Rosas, B. Hernandez, G. Fragoso, C. Hallal-Calleros, L. Aguilar y I. Flores-Perez (2012). "Effective protection induced by three different versions of the porcine

S3Pvac anticysticercosis vaccine against rabbit experimental *Taenia pisiformis* cysticercosis." Vaccine **30**(17): 2760-2767.

- Binas, B. y E. Erol (2007). "FABPs as determinants of myocellular and hepatic fuel metabolism." Mol Cell Biochem **299**(1-2): 75-84.

- Bobes, R. J., G. Fragoso, A. Fleury, M. Garcia-Varela, E. Sciutto, C. Larralde y J. P. Laclette (2014). "Evolution, molecular epidemiology and perspectives on the research of taeniid parasites with special emphasis on *Taenia solium*." Infect Genet Evol.

- Brattig, N. W., A. Schwohl, R. Rickert y D. W. Buttner (2006). "The filarial parasite *Onchocerca volvulus* generates the lipid mediator prostaglandin E(2)." Microbes Infect **8**(3): 873-879.

- Brito, C. F., G. C. Oliveira, S. C. Oliveira, M. Street, S. Riengrojpitak, R. A. Wilson, A. J. Simpson y R. Correa-Oliveira (2002). "Sm14 gene expression in different stages of the *Schistosoma mansoni* life cycle and immunolocalization of the Sm14 protein within the adult worm." Braz J Med Biol Res **35**(3): 377-381.

- Brouwers, J. F., I. M. Smeenk, L. M. van Golde y A. G. Tielens (1997). "The incorporation, modification and turnover of fatty acids in adult *Schistosoma mansoni*." Mol Biochem Parasitol **88**(1-2): 175-185.

- Brunaldi, K., J. R. Simard, F. Kamp, C. Rewal, T. Asawakarn, P. O'Shea y J. A. Hamilton (2007). "Fluorescence assays for measuring fatty acid binding and transport through membranes." Methods Mol Biol **400**: 237-255.

- Caffrey, C. R. (2012). Parasitic Helminths: Targets, Screens, Drugs and Vaccines. Capelli-Peixoto, J., C. Chavez-Olortegui, D. Chaves-Moreira, J. C. Minozzo, J. Gabardo, K. N. Teixeira, V. Thomaz-Soccol, L. M. Alvarenga y J. de Moura (2011). "Evaluation of the protective potential of a *Taenia solium* cysticercus mimotope on murine cysticercosis." Vaccine **29**(51): 9473-9479.

- Casanueva, R., G. V. Hillyer, V. Ramajo, A. Oleaga, E. Y. Espinoza y A. Muro (2001). "Immunoprophylaxis against *Fasciola hepatica* in rabbits using a recombinant Fh15 fatty acid-binding protein." J Parasitol **87**(3): 697-700.

- Cass, C. L., J. R. Johnson, L. L. Califf, T. Xu, H. J. Hernandez, M. J. Stadecker, J. R. Yates, 3rd y D. L. Williams (2007). "Proteomic analysis of *Schistosoma mansoni* egg secretions." Mol Biochem Parasitol **155**(2): 84-93.

- Coe, N. R. y D. A. Bernlohr (1998). "Physiological properties and functions of intracellular fatty acid-binding proteins." Biochim Biophys Acta **1391**(3): 287-306.

- Coe, N. R., M. A. Simpson y D. A. Bernlohr (1999). "Targeted disruption of the adipocyte lipid-binding protein (aP2 protein) gene impairs fat cell lipolysis and increases cellular fatty acid levels." J Lipid Res **40**(5): 967-972.

- Cruz-Revilla, C., A. Toledo, G. Rosas, M. Huerta, I. Flores-Perez, N. Pena, J. Morales, J. Cisneros-Quinones, G. Meneses, A. Diaz-Orea, N. Anciant, F. Goldbaum, A. Aluja, C. Larralde, G. Frago y E. Sciutto (2006). "Effective protection against experimental *Taenia solium* tapeworm infection in hamsters by primo-infection and by vaccination with recombinant or synthetic heterologous antigens." J Parasitol **92**(4): 864-867.
- Cui, S. J., L. L. Xu, T. Zhang, M. Xu, J. Yao, C. Y. Fang, Z. Feng, P. Y. Yang, W. Hu y F. Liu (2013). "Proteomic characterization of larval and adult developmental stages in *Echinococcus granulosus* reveals novel insight into host-parasite interactions." J Proteomics **84**: 158-175.
- Chen, C. Y. y A. B. Shyu (1995). "AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation." Trends Biochem Sci **20**(11): 465-470.
- Cheng, L., X. K. Jin, W. W. Li, S. Li, X. N. Guo, J. Wang, Y. N. Gong, L. He y Q. Wang (2013). "Fatty acid binding proteins FABP9 and FABP10 participate in antibacterial responses in Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*." PLoS One **8**(1): e54053.
- Choromanska, B., P. Mysliwiec, J. Dadan, H. R. Hady y A. Chabowski (2011). "[The clinical significance of fatty acid binding proteins]." Postepy Hig Med Dosw (Online) **65**: 759-763.
- Chunchob, S., R. Grams, V. Viyanant, P. M. Smooker y S. Vichasri-Grams (2010). "Comparative analysis of two fatty acid binding proteins from *Fasciola gigantica*." Parasitology **137**(12): 1805-1817.
- Chytil, F. y D. E. Ong (1987). "Intracellular vitamin A-binding proteins." Annu Rev Nutr **7**: 321-335.
- de Aluja, A. S., A. N. Villalobos, A. Plancarte, L. F. Rodarte, M. Hernandez y E. Sciutto (1996). "Experimental *Taenia solium* cysticercosis in pigs: characteristics of the infection and antibody response." Vet Parasitol **61**(1-2): 49-59.
- Del Brutto, O. H. (2012). "Neurocysticercosis." Continuum (Minneap Minn) **18**(6 Infectious Disease): 1392-1416.
- Desjardins, C. A., G. C. Cerqueira, J. M. Goldberg, J. C. Dunning Hotopp, B. J. Haas, J. Zucker, J. M. Ribeiro, S. Saif, J. Z. Levin, L. Fan, Q. Zeng, C. Russ, J. R. Wortman, D. L. Fink, B. W. Birren y T. B. Nutman (2013). "Genomics of *Loa loa*, a Wolbachia-free filarial parasite of humans." Nat Genet **45**(5): 495-500.
- Dinguirard, N. y T. P. Yoshino (2006). "Potential role of a CD36-like class B scavenger receptor in the binding of modified low-density lipoprotein (acLDL) to the

tegumental surface of *Schistosoma mansoni* sporocysts." Mol Biochem Parasitol **146**(2): 219-230.

- Dissanayake, S., N. Khan, A. Shahin, S. Wijesinghe y M. Lukic (2002). "Induction of immunoglobulin G1, interleukin-6 and interleukin-10 by *Taenia crassiceps* metacestode carbohydrates." Immunology **107**(4): 411-419.

- El Ridi, R., H. Tallima, M. Salah, M. Aboueldahab, O. M. Fahmy, M. F. Al-Halbosiy y S. S. Mahmoud (2012). "Efficacy and mechanism of action of arachidonic acid in the treatment of hamsters infected with *Schistosoma mansoni* or *Schistosoma haematobium*." Int J Antimicrob Agents **39**(3): 232-239.

- Erbay, E., V. R. Babaev, J. R. Mayers, L. Makowski, K. N. Charles, M. E. Snitow, S. Fazio, M. M. Wiest, S. M. Watkins, M. F. Linton y G. S. Hotamisligil (2009). "Reducing endoplasmic reticulum stress through a macrophage lipid chaperone alleviates atherosclerosis." Nat Med **15**(12): 1383-1391.

- Espino, A. M., J. R. Rodriguez Medina y G. V. Hillyer (2001). "Isolation and immunological characterization of fatty acid binding protein isoforms from *Fasciola hepatica*." J Parasitol **87**(5): 1028-1033.

- Esteves, A. y R. Ehrlich (2006). "Invertebrate intracellular fatty acid binding proteins." Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol **142**(3-4): 262-274.

- Esteves, A., L. Joseph, M. Paulino y R. Ehrlich (1997). "Remarks on the phylogeny and structure of fatty acid binding proteins from parasitic platyhelminths." Int J Parasitol **27**(9): 1013-1023.

- Estuningsih, S. E., P. M. Smooker, E. Wiedosari, S. Widjajanti, S. Vaiano, S. Partoutomo y T. W. Spithill (1997). "Evaluation of antigens of *Fasciola gigantica* as vaccines against tropical fasciolosis in cattle." Int J Parasitol **27**(11): 1419-1428.

- Fairfax, K. C., J. J. Vermeire, L. M. Harrison, R. D. Bungiro, W. Grant, S. Z. Husain y M. Cappello (2009). "Characterisation of a fatty acid and retinol binding protein orthologue from the hookworm *Ancylostoma ceylanicum*." Int J Parasitol **39**(14): 1561-1571.

- Flower, D. R. (1993). "Structural relationship of streptavidin to the calycin protein superfamily." FEBS Lett **333**(1-2): 99-102.

- Fragoso, G., F. Esquivel-Guadarrama, M. A. Santana, R. J. Bobes, B. Hernandez, J. Cervantes, R. Segura, F. A. Goldbaum, E. Sciutto y G. Rosas (2011). "Heterologous prime-boost oral immunization with GK-1 peptide from *Taenia crassiceps* cysticerci induces protective immunity." Clin Vaccine Immunol **18**(7): 1067-1076.

- Fragoso, G., G. Meneses, E. Sciutto, A. Fleury y C. Larralde (2008). "Preferential

growth of *Taenia crassiceps cysticerci* in female mice holds across several laboratory mice strains and parasite lines." J Parasitol **94**(2): 551-553.

- Fusco, A. C., B. Salafsky y K. Delbrook (1986). "Schistosoma mansoni: production of cercarial eicosanoids as correlates of penetration and transformation." J Parasitol **72**(3): 397-404.

- Gasteiger, J. (2006). "Cheminformatics: a new field with a long tradition." Anal Bioanal Chem **384**(1): 57-64.

- Gerstner, J. R., W. M. Vanderheyden, P. J. Shaw, C. F. Landry y J. C. Yin (2011). "Fatty-acid binding proteins modulate sleep and enhance long-term memory consolidation in *Drosophila*." PLoS One **6**(1): e15890.

- Gobert, G. N., D. J. Stenzel, M. K. Jones y D. P. McManus (1997). "Immunolocalization of the fatty acid-binding protein Sj-FABPc within adult *Schistosoma japonicum*." Parasitology **115** (Pt 1): 33-39.

- Goh, K. S. y C. W. Li (2011). "A photocytes-associated fatty acid-binding protein from the light organ of adult Taiwanese firefly, *Luciola cerata*." PLoS One **6**(12): e29576.

- Guo, A., Z. Jin, Y. Zheng, G. Hai, G. Yuan, H. Li y X. Cai (2007). "Induction of protection against porcine cysticercosis in growing pigs by DNA vaccination." Vaccine **25**(1): 170-175.

- Han, Z. G., P. J. Brindley, S. Y. Wang y Z. Chen (2009). "Schistosoma genomics: new perspectives on schistosome biology and host-parasite interaction." Annu Rev Genomics Hum Genet **10**: 211-240.

- Hanhoff, T., C. Lucke y F. Spener (2002). "Insights into binding of fatty acids by fatty acid binding proteins." Mol Cell Biochem **239**(1-2): 45-54.

- Hao, H. F., Z. G. Wang y Z. W. Li (2007). "[Cloning and construction of nucleic acid vaccine of FABP gene cDNA from *Echinococcus granulosus*]." Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi **25**(4): 352-354.

- Hertzler, A. V. y D. A. Bernlohr (2000). "The mammalian fatty acid-binding protein multigene family: molecular and genetic insights into function." Trends Endocrinol Metab **11**(5): 175-180.

- Hostetler, H. A., A. L. McIntosh, B. P. Atshaves, S. M. Storey, H. R. Payne, A. B. Kier y F. Schroeder (2009). "L-FABP directly interacts with PPARalpha in cultured primary hepatocytes." J Lipid Res **50**(8): 1663-1675.

- Hotez, P. J., P. J. Brindley, J. M. Bethony, C. H. King, E. J. Pearce y J. Jacobson

(2008). "Helminth infections: the great neglected tropical diseases." J Clin Invest **118**(4): 1311-1321.

- Hsu, K. T. y J. Storch (1996). "Fatty acid transfer from liver and intestinal fatty acid-binding proteins to membranes occurs by different mechanisms." J Biol Chem **271**(23): 13317-13323.

- http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/#, O. (2014). "Neglected tropical diseases." from http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/#.

- Huang, L., Y. Hu, Y. Huang, H. Fang, R. Li, D. Hu, W. Li, X. Li, C. Liang y X. Yu (2012). "Gene/protein expression level, immunolocalization and binding characteristics of fatty acid binding protein from *Clonorchis sinensis* (CsFABP)." Mol Cell Biochem **363**(1-2): 367-376.

- Hui, X., H. Li, Z. Zhou, K. S. Lam, Y. Xiao, D. Wu, K. Ding, Y. Wang, P. M. Vanhoutte y A. Xu (2010). "Adipocyte fatty acid-binding protein modulates inflammatory responses in macrophages through a positive feedback loop involving c-Jun NH2-terminal kinases and activator protein-1." J Biol Chem **285**(14): 10273-10280.

- Ito, A., M. I. Putra, R. Subahar, M. O. Sato, M. Okamoto, Y. Sako, M. Nakao, H. Yamasaki, K. Nakaya, P. S. Craig y S. S. Margono (2002). "Dogs as alternative intermediate hosts of *Taenia solium* in Papua (Irian Jaya), Indonesia confirmed by highly specific ELISA and immunoblot using native and recombinant antigens and mitochondrial DNA analysis." J Helminthol **76**(4): 311-314.

- Janssen, D. y J. Barrett (1995). "A novel lipid-binding protein from the cestode *Moniezia expansa*." Biochem J **311** (Pt 1): 49-57.

- Jayashi, C. M., C. T. Kyngdon, C. G. Gauci, A. E. Gonzalez y M. W. Lightowers (2012). "Successful immunization of naturally reared pigs against porcine cysticercosis with a recombinant oncosphere antigen vaccine." Vet Parasitol **188**(3-4): 261-267.

- Jones, T. A., T. Bergfors, J. Sedzik y T. Unge (1988). "The three-dimensional structure of P2 myelin protein." EMBO J **7**(6): 1597-1604.

- Kaczocha, M., S. Vivieca, J. Sun, S. T. Glaser y D. G. Deutsch (2012). "Fatty acid-binding proteins transport N-acyl ethanolamines to nuclear receptors and are targets of endocannabinoid transport inhibitors." J Biol Chem **287**(5): 3415-3424.

- Kagawa, Y., M. Toyofuku, Y. Masaoka, Y. Muraoka, T. Okimoto, M. Otsuka, H. Tamekiyo, S. Mito, T. Kawase, K. Yamane, A. Senoo, M. Amioka, N. Shiode y Y. Hayashi (2013). "Comparison of heart-type fatty acid binding protein and sensitive troponin for the diagnosis of early acute myocardial infarction." Int J Cardiol **166**(2): 347-351.

- Kelley, L. A. y M. J. Sternberg (2009). "Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server." Nat Protoc **4**(3): 363-371.
- Kennedy, M. W., J. C. Scott, S. Lo, J. Beauchamp y D. P. McManus (2000). "Sj-FABPc fatty-acid-binding protein of the human blood fluke *Schistosoma japonicum*: structural and functional characterization and unusual solvent exposure of a portal-proximal tryptophan residue." Biochem J **349**(Pt 1): 377-384.
- Kido, T. y H. Namiki (2000). "Expression of testicular fatty acid-binding protein PERF 15 during germ cell apoptosis." Dev Growth Differ **42**(4): 359-366.
- Lagakos, W. S., A. M. Gajda, L. Agellon, B. Binas, V. Choi, B. Mandap, T. Russnak, Y. X. Zhou y J. Storch (2011). "Different functions of intestinal and liver-type fatty acid-binding proteins in intestine and in whole body energy homeostasis." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **300**(5): G803-814.
- Lee, E. G., S. H. Kim, Y. A. Bae, J. Y. Chung, M. Suh, B. K. Na, T. S. Kim, I. Kang, L. Ma y Y. Kong (2007). "A hydrophobic ligand-binding protein of the *Taenia solium* metacestode mediates uptake of the host lipid: implication for the maintenance of parasitic cellular homeostasis." Proteomics **7**(21): 4016-4030.
- Lee, J. S., I. S. Kim, W. M. Sohn, J. Lee y T. S. Yong (2006). "A DNA vaccine encoding a fatty acid-binding protein of *Clonorchis sinensis* induces protective immune response in Sprague-Dawley rats." Scand J Immunol **63**(3): 169-176.
- Lee, J. S. y T. S. Yong (2004). "Expression and cross-species reactivity of fatty acid-binding protein of *Clonorchis sinensis*." Parasitol Res **93**(5): 339-343.
- Leid, R. W. y L. A. McConnell (1983 (1)). "PGE2 generation and release by the larval stage of the cestode, *taenia taeniaeformis*." Prostaglandins Leukot Med **11**(3): 317-323.
- Leid, R. W. y L. A. McConnell (1983 (2)). "Thromboxane A2 generation by the larval cestode, *Taenia taeniaeformis*." Clin Immunol Immunopathol **28**(1): 67-76.
- Leon-Cabrera, S., M. Cruz-Rivera, F. Mendlovic, G. Avila-Ramirez, J. C. Carrero, J. P. Lacleste y A. Flisser (2009). "Standardization of an experimental model of human taeniosis for oral vaccination." Methods **49**(4): 346-350.
- Liu, J. M., X. Z. Cai, J. J. Lin, Z. Q. Fu, G. Z. Yang, F. H. Shi, Y. M. Cai, W. Shen, M. G. Taylor y X. F. Wu (2004). "Gene cloning, expression and vaccine testing of *Schistosoma japonicum* SjFABP." Parasite Immunol **26**(8-9): 351-358.
- Liu, R. Z., X. Li y R. Godbout (2008). "A novel fatty acid-binding protein (FABP) gene resulting from tandem gene duplication in mammals: transcription in rat retina and testis." Genomics **92**(6): 436-445.

- Lopez-Aban, J., J. J. Nogal-Ruiz, B. Vicente, P. Morrondo, P. Diez-Banos, G. V. Hillyer, A. R. Martinez-Fernandez, A. S. Feliciano y A. Muro (2008). "The addition of a new immunomodulator with the adjuvant adaptation ADAD system using fatty acid binding proteins increases the protection against *Fasciola hepatica*." Vet Parasitol **153**(1-2): 176-181.
- Luxon, B. A. y M. T. Milliano (1997). "Cytoplasmic codiffusion of fatty acids is not specific for fatty acid binding protein." Am J Physiol **273**(3 Pt 1): C859-867.
- Manor, D., E. N. Shmidt, A. Budhu, A. Flesken-Nikitin, M. Zgola, R. Page, A. Y. Nikitin y N. Noy (2003). "Mammary carcinoma suppression by cellular retinoic acid binding protein-II." Cancer Res **63**(15): 4426-4433.
- Maravilla, P., G. Avila, V. Cabrera, L. Aguilar y A. Flisser (1998). "Comparative development of *Taenia solium* in experimental models." J Parasitol **84**(5): 882-886.
- Maravilla, P., A. Garza-Rodriguez, B. Gomez-Diaz, D. E. Jimenez-Gonzalez, E. Toral-Bastida, J. Martinez-Ocana, B. West, N. Molina, R. Garcia-Cortes, S. Kawa-Karasik, M. Romero-Valdovinos, G. Avila-Ramirez y A. Flisser (2011). "Chinchilla laniger can be used as an experimental model for *Taenia solium* taeniasis." Parasitol Int **60**(4): 364-370.
- Martin, G. G., A. L. McIntosh, H. Huang, S. Gupta, B. P. Atshaves, K. K. Landrock, D. Landrock, A. B. Kier y F. Schroeder (2013). "The human liver fatty acid binding protein T94A variant alters the structure, stability, and interaction with fibrates." Biochemistry **52**(51): 9347-9357.
- McDermott, L., M. W. Kennedy, D. P. McManus, J. E. Bradley, A. Cooper y J. Storch (2002). "How helminth lipid-binding proteins offload their ligands to membranes: differential mechanisms of fatty acid transfer by the ABA-1 polyprotein allergen and Ov-FAR-1 proteins of nematodes and Sj-FABPc of schistosomes." Biochemistry **41**(21): 6706-6713.
- McIntosh, A. L., B. P. Atshaves, S. M. Storey, K. K. Landrock, D. Landrock, G. G. Martin, A. B. Kier y F. Schroeder (2012). "Loss of liver FA binding protein significantly alters hepatocyte plasma membrane microdomains." J Lipid Res **53**(3): 467-480.
- Mei, B., M. W. Kennedy, J. Beauchamp, P. R. Komuniecki y R. Komuniecki (1997). "Secretion of a novel, developmentally regulated fatty acid-binding protein into the perivitelline fluid of the parasitic nematode, *Ascaris suum*." J Biol Chem **272**(15): 9933-9941.
- Meyer, F., H. Meyer y E. Bueding (1970). "Lipid metabolism in the parasitic and free-living flatworms, *Schistosoma mansoni* and *Dugesia dorotocephala*." Biochim Biophys Acta **210**(2): 257-266.

- Michalski, M. L., J. D. Monsey, D. P. Cistola y G. J. Weil (2002). "An embryo-associated fatty acid-binding protein in the filarial nematode *Brugia malayi*." Mol Biochem Parasitol **124**(1-2): 1-10.
 - Moser, D., M. Tendler, G. Griffiths y M. Q. Klinkert (1991). "A 14-kDa *Schistosoma mansoni* polypeptide is homologous to a gene family of fatty acid binding proteins." J Biol Chem **266**(13): 8447-8454.
 - Murai, A., M. Furuse, K. Kitaguchi, K. Kusumoto, Y. Nakanishi, M. Kobayashi y F. Horio (2009). "Characterization of critical factors influencing gene expression of two types of fatty acid-binding proteins (L-FABP and Lb-FABP) in the liver of birds." Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol **154**(2): 216-223.
 - Murphy, E. J., Y. Owada, N. Kitanaka, H. Kondo y J. F. Glatz (2005). "Brain arachidonic acid incorporation is decreased in heart fatty acid binding protein gene-ablated mice." Biochemistry **44**(16): 6350-6360.
 - Nambi, P. A., S. C. Yadav, O. K. Raina, D. Sriveny y M. Saini (2005). "Vaccination of buffaloes with *Fasciola gigantica* recombinant fatty acid binding protein." Parasitol Res **97**(2): 129-135.
 - Nava, G., J. P. Laclette, R. Bobes, J. C. Carrero, H. Reyes-Vivas, S. Enriquez-Flores, G. Mendoza-Hernandez y A. Plancarte (2011). "Cloning, sequencing and functional expression of cytosolic malate dehydrogenase from *Taenia solium*: Purification and characterization of the recombinant enzyme." Exp Parasitol **128**(3): 217-224.
 - Neeli, I., N. Dwivedi, S. Khan y M. Radic (2009). "Regulation of extracellular chromatin release from neutrophils." J Innate Immun **1**(3): 194-201.
 - Nie, H. M., Y. Xie, Y. Fu, Y. D. Yang, X. B. Gu, S. X. Wang, X. Peng, W. M. Lai, X. R. Peng y G. Y. Yang (2013). "Cloning and characterization of the fatty acid-binding protein gene from the protoscolex of *Taenia multiceps*." Parasitol Res **112**(5): 1833-1839.
 - Nilsen, T. W. (1993). "Trans-splicing of nematode premessenger RNA." Annu Rev Microbiol **47**: 413-440.
- Nuernberg, K., B. H. Breier, S. N. Jayasinghe, H. Bergmann, N. Thompson, G. Nuernberg, D. Dannenberger, F. Schneider, U. Renne, M. Langhammer y K. Huber (2011). "Metabolic responses to high-fat diets rich in n-3 or n-6 long-chain polyunsaturated fatty acids in mice selected for either high body weight or leanness explain different health outcomes." Nutr Metab (Lond) **8**(1): 56.
- Ockner, R. K., J. A. Manning, R. B. Poppenhausen y W. K. Ho (1972). "A binding

protein for fatty acids in cytosol of intestinal mucosa, liver, myocardium, and other tissues." Science **177**(4043): 56-58.

- Ohmachi, T., H. Inoue, K. Mimori, F. Tanaka, A. Sasaki, T. Kanda, H. Fujii, K. Yanaga y M. Mori (2006). "Fatty acid binding protein 6 is overexpressed in colorectal cancer." Clin Cancer Res **12**(17): 5090-5095.

- Olson, P. D., M. Zarowiecki, F. Kiss y K. Brehm (2012). "Cestode genomics - progress and prospects for advancing basic and applied aspects of flatworm biology." Parasite Immunol **34**(2-3): 130-150.

- Owada, Y. (2008). "Fatty acid binding protein: localization and functional significance in the brain." Tohoku J Exp Med **214**(3): 213-220.

- Pankao, V., A. Sirisriro, R. Grams, S. Vichasri-Grams, A. Meepool, N. Kangwanrangsang, C. Wanichanon, P. Ardseungneon, V. Viyanant, E. S. Upatham y P. Sobhon (2006). "Classification of the parenchymal cells in *Fasciola gigantica* based on ultrastructure and their expression of fatty acid binding proteins (FABPs)." Vet Parasitol **142**(3-4): 281-292.

- Pastuszyn, A., B. J. Noland, J. F. Bazan, R. J. Fletterick y T. J. Scallen (1987). "Primary sequence and structural analysis of sterol carrier protein 2 from rat liver: homology with immunoglobulins." J Biol Chem **262**(27): 13219-13227.

- Porfido, J. L., G. Alvite, V. Silva, M. W. Kennedy, A. Esteves y B. Corsico (2012). "Direct interaction between EgFABP1, a fatty acid binding protein from *Echinococcus granulosus*, and phospholipid membranes." PLoS Negl Trop Dis **6**(11): e1893.

- Praslickova, D., E. C. Torchia, M. G. Sugiyama, E. J. Magrane, B. L. Zwicker, L. Kolodzieyski y L. B. Agellon (2012). "The ileal lipid binding protein is required for efficient absorption and transport of bile acids in the distal portion of the murine small intestine." PLoS One **7**(12): e50810.

- Przybylowski, P., E. Koc-Zorawska, J. S. Malyszko, S. Kozłowska, M. Mysliwiec y J. Malyszko (2011). "Liver fatty-acid-binding protein in heart and kidney allograft recipients in relation to kidney function." Transplant Proc **43**(8): 3064-3067.

- Rabia Aly, I., M. Diab, A. M. El-Amir, M. Hendawy y S. Kadry (2012). "*Fasciola gigantica* fatty acid binding protein (FABP) as a prophylactic agent against *Schistosoma mansoni* infection in CD1 mice." Korean J Parasitol **50**(1): 37-43.

- Reese, M. G., F. H. Eeckman, D. Kulp y D. Haussler (1997). "Improved splice site detection in Genie." J Comput Biol **4**(3): 311-323.

- Reyes, J. L., M. I. Gonzalez, Y. Ledesma-Soto, A. R. Satoskar y L. I. Terrazas (2011). "TLR2 mediates immunity to experimental cysticercosis." Int J Biol Sci **7**(9): 1323-1333.

- Rickard, M. D. y P. M. Outteridge (1974). "Antibody and cell-mediated immunity in rabbits infected with the larval stages of *Taenia pisiformis*." Z Parasitenkd **44**(3): 187-201.
- Richieri, G. V., R. T. Ogata y A. M. Kleinfeld (1994). "Equilibrium constants for the binding of fatty acids with fatty acid-binding proteins from adipocyte, intestine, heart, and liver measured with the fluorescent probe ADIFAB." J Biol Chem **269**(39): 23918-23930.
- Richieri, G. V., R. T. Ogata, A. W. Zimmerman, J. H. Veerkamp y A. M. Kleinfeld (2000). "Fatty acid binding proteins from different tissues show distinct patterns of fatty acid interactions." Biochemistry **39**(24): 7197-7204.
- Robb, S. M., E. Ross y A. Sanchez Alvarado (2008). "SmedGD: the *Schmidtea mediterranea* genome database." Nucleic Acids Res **36**(Database issue): D599-606.
- Rodriguez-Perez, J., J. R. Rodriguez-Medina, M. A. Garcia-Blanco y G. V. Hillyer (1992). "*Fasciola hepatica*: molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of a gene encoding a polypeptide homologous to a *Schistosoma mansoni* fatty acid-binding protein." Exp Parasitol **74**(4): 400-407.
- Salafsky, B. y A. C. Fusco (1987). "*Schistosoma mansoni*: a comparison of secreted vs nonsecreted eicosanoids in developing schistosomulae and adults." Exp Parasitol **64**(3): 361-367.
- Santamaria, E., A. Plancarte y A. S. de Aluja (2002). "The experimental infection of pigs with different numbers of *Taenia solium* eggs: immune response and efficiency of establishment." J Parasitol **88**(1): 69-73.
- Scifres, C. M., J. M. Catov y H. Simhan (2012). "Maternal serum fatty acid binding protein 4 (FABP4) and the development of preeclampsia." J Clin Endocrinol Metab **97**(3): E349-356.
- Sciutto, E., G. Fragoso, L. Trueba, D. Lemus, R. M. Montoya, M. L. Diaz, T. Govezensky, C. Lomeli, G. Tapia y C. Larralde (1990). "Cysticercosis vaccine: cross protecting immunity with *T. solium* antigens against experimental murine *T. crassiceps* cysticercosis." Parasite Immunol **12**(6): 687-696.
- Schug, T. T., D. C. Berry, N. S. Shaw, S. N. Travis y N. Noy (2007). "Opposing effects of retinoic acid on cell growth result from alternate activation of two different nuclear receptors." Cell **129**(4): 723-733.
- Sessler, R. J. y N. Noy (2005). "A ligand-activated nuclear localization signal in cellular retinoic acid binding protein-II." Mol Cell **18**(3): 343-353.

- Shaughnessy, S., E. R. Smith, S. Kodukula, J. Storch y S. K. Fried (2000). "Adipocyte metabolism in adipocyte fatty acid binding protein knockout mice (aP2-/-) after short-term high-fat feeding: functional compensation by the keratinocyte [correction of keratinocyte] fatty acid binding protein." Diabetes **49**(6): 904-911.
- Smyth JD, M. D. (1989). Physiology and biochemistry of cestodes, Cambridge University Press.
- Solis, C. F., P. Ostoa-Saloma, V. H. Lugo-Martinez, S. A. Johnston y J. P. Lacleite (2005). "Genetic vaccination against murine cysticercosis by using a plasmid vector carrying *Taenia solium* paramyosin." Infect Immun **73**(3): 1895-1897.
- Storch, J., J. H. Veerkamp y K. T. Hsu (2002). "Similar mechanisms of fatty acid transfer from human anal rodent fatty acid-binding proteins to membranes: liver, intestine, heart muscle, and adipose tissue FABPs." Mol Cell Biochem **239**(1-2): 25-33.
- Tan, N. S., N. S. Shaw, N. Vinckenbosch, P. Liu, R. Yasmin, B. Desvergne, W. Wahli y N. Noy (2002). "Selective cooperation between fatty acid binding proteins and peroxisome proliferator-activated receptors in regulating transcription." Mol Cell Biol **22**(14): 5114-5127.
- Tang, M. K., P. M. Kindler, D. Q. Cai, P. H. Chow, M. Li y K. K. Lee (2004). "Heart-type fatty acid binding proteins are upregulated during terminal differentiation of mouse cardiomyocytes, as revealed by proteomic analysis." Cell Tissue Res **316**(3): 339-347.
- Tendler, M., C. A. Brito, M. M. Vilar, N. Serra-Freire, C. M. Diogo, M. S. Almeida, A. C. Delbem, J. F. Da Silva, W. Savino, R. C. Garratt, N. Katz y A. S. Simpson (1996). "A *Schistosoma mansoni* fatty acid-binding protein, Sm14, is the potential basis of a dual-purpose anti-helminth vaccine." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(1): 269-273.
- Teunissen, C. E., R. Veerhuis, J. De Vente, F. R. Verhey, F. Vreeling, M. P. van Bortel, J. F. Glatz y M. A. Pelsers (2011). "Brain-specific fatty acid-binding protein is elevated in serum of patients with dementia-related diseases." Eur J Neurol **18**(6): 865-871.
- Thompson, J., J. Ory, A. Reese-Wagoner y L. Banaszak (1999). "The liver fatty acid binding protein--comparison of cavity properties of intracellular lipid-binding proteins." Mol Cell Biochem **192**(1-2): 9-16.
- Timanova-Atanasova, A., R. Jordanova, G. Radoslavov, G. Deevska, I. Bankov y J. Barrett (2004). "A native 13-kDa fatty acid binding protein from the liver fluke *Fasciola hepatica*." Biochim Biophys Acta **1674**(2): 200-204.

- Toledo, A., G. Fragoso, G. Rosas, M. Hernandez, G. Gevorkian, F. Lopez-Casillas, B. Hernandez, G. Acero, M. Huerta, C. Larralde y E. Sciutto (2001). "Two epitopes shared by *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* confer protection against murine *T. crassiceps* cysticercosis along with a prominent T1 response." Infect Immun **69**(3): 1766-1773.
- Toledo, A., C. Larralde, G. Fragoso, G. Gevorkian, K. Manoutcharian, M. Hernandez, G. Acero, G. Rosas, F. Lopez-Casillas, C. K. Garfias, R. Vazquez, I. Terrazas y 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**(5): 2522-2530.
- Toral-Bastida, E., A. Garza-Rodriguez, D. E. Jimenez-Gonzalez, R. Garcia-Cortes, G. Avila-Ramirez, P. Maravilla y A. Flisser (2011). "Development of *Taenia pisiformis* in golden hamster (*Mesocricetus auratus*)." Parasit Vectors **4**: 147.
- Trapp, B. D., M. Dubois-Dalcq y R. H. Quarles (1984). "Ultrastructural localization of P2 protein in actively myelinating rat Schwann cells." J Neurochem **43**(4): 944-948.
- Tsai, I. J., M. Zarowiecki, N. Holroyd, A. Garcarrubio, A. Sanchez-Flores, K. L. Brooks, A. Tracey, R. J. Bobes, G. Fragoso, E. Sciutto, M. Aslett, H. Beasley, H. M. Bennett, J. Cai, F. Camicia, R. Clark, M. Cucher, N. De Silva, T. A. Day, P. Deplazes, K. Estrada, C. Fernandez, P. W. Holland, J. Hou, S. Hu, T. Huckvale, S. S. Hung, L. Kamenetzky, J. A. Keane, F. Kiss, U. Koziol, O. Lambert, K. Liu, X. Luo, Y. Luo, N. Macchiaroli, S. Nichol, J. Paps, J. Parkinson, N. Pouchkina-Stantcheva, N. Riddiford, M. Rosenzvit, G. Salinas, J. D. Wasmuth, M. Zamanian, Y. Zheng, C. *Taenia solium* Genome, X. Cai, X. Soberon, P. D. Olson, J. P. Lacleste, K. Brehm y M. Berriman (2013). "The genomes of four tapeworm species reveal adaptations to parasitism." Nature **496**(7443): 57-63.
- Vazquez-Talavera, J., C. F. Solis, L. I. Terrazas y J. P. Lacleste (2001). "Characterization and protective potential of the immune response to *Taenia solium* paramyosin in a murine model of cysticercosis." Infect Immun **69**(9): 5412-5416.
- Velkov, T., J. Horne, A. Laguerre, E. Jones, M. J. Scanlon y C. J. Porter (2007). "Examination of the role of intestinal fatty acid-binding protein in drug absorption using a parallel artificial membrane permeability assay." Chem Biol **14**(4): 453-465.
- Velkov, T., M. L. Lim, J. Horne, J. S. Simpson, C. J. Porter y M. J. Scanlon (2009). "Characterization of lipophilic drug binding to rat intestinal fatty acid binding protein." Mol Cell Biochem **326**(1-2): 87-95.
- Vilar, M. M., F. Barrientos, M. Almeida, N. Thaumaturgo, A. Simpson, R. Garratt

y M. Tendler (2003). "An experimental bivalent peptide vaccine against schistosomiasis and fascioliasis." Vaccine **22**(1): 137-144.

- Vinaud, M. C., C. S. Ferreira, S. Lino Junior Rde y J. C. Bezerra (2009). "Taenia crassiceps: fatty acids oxidation and alternative energy source in in vitro cysticerci exposed to anthelmintic drugs." Exp Parasitol **122**(3): 208-211.

- Virginio, V. G., K. M. Monteiro, F. Drumond, M. O. de Carvalho, D. M. Vargas, A. Zaha y H. B. Ferreira (2012). "Excretory/secretory products from in vitro-cultured Echinococcus granulosus protoscoleces." Mol Biochem Parasitol **183**(1): 15-22.

- Wei, F., Q. Liu, Y. Zhai, Z. Fu, W. Liu, L. Shang, J. Men, S. Gao, H. Lian, H. Jin, C. Chen, J. Lin, Y. Shi, Z. Xia y X. Q. Zhu (2009). "IL-18 enhances protective effect in mice immunized with a Schistosoma japonicum FABP DNA vaccine." Acta Trop **111**(3): 284-288.

- Wei, F., Y. Zhai, H. Jin, L. Shang, J. Men, J. Lin, Z. Fu, Y. Shi, X. Q. Zhu, Q. Liu y H. Gao (2010). "Development and immunogenicity of a recombinant pseudorabies virus expressing Sj26GST and SjFABP from Schistosoma japonicum." Vaccine **28**(32): 5161-5166.

- Wiecek, J., A. Rekiel, M. Batorska y J. Skomial (2011). "Effect of restricted feeding and realimentation periods on pork quality and fatty acid profile of M. longissimus thoracis." Meat Sci **87**(3): 244-249.

- Willms, K., A. M. Presas, J. A. Jiménez, A. Landa, R. Zurabián, M. E. Ugarte y L. Robert (2005). "Taeniid tapeworm responses to in vitro glucose." Parasitol Res **96**(5): 296-301.

- Willms, K., L. Robert y J. A. Caro (2003). "Ultrastructure of smooth muscle, gap junctions and glycogen distribution in Taenia solium tapeworms from experimentally infected hamsters." Parasitol Res **89**(4): 308-316.

- Willms, K., L. Vargas-Parada y J. P. Laclette (2006). Biología del Parásito. Cisticercosis guía para profesionales de la salud. d. A. A. Larralde C. México, Fondo de Cultura Económica: 19-40.

- Xu, A. y P. M. Vanhoutte (2012). "Adiponectin and adipocyte fatty acid binding protein in the pathogenesis of cardiovascular disease." Am J Physiol Heart Circ Physiol **302**(6): H1231-1240.

- Yang, D., Y. Fu, X. Wu, Y. Xie, H. Nie, L. Chen, X. Nong, X. Gu, S. Wang, X. Peng, N. Yan, R. Zhang, W. Zheng y G. Yang (2012). "Annotation of the transcriptome from Taenia pisiformis and its comparative analysis with three Taeniidae species." PLoS One **7**(4): e32283.

- Zhou, Y., H. Zheng, Y. Chen, L. Zhang, K. Wang y H. Z. Guo J, Zhang B, Huang

W, Jin K, Dou T, Hasegawa M, Wang L, Zhang Y, Zhou J, Tao L, Cao Z, Li Y, Vinar T, Brejova B, Brown D, Li M, Miller DJ, Blair D, Zhong Y, Chen Z, Liu F, Hu W, Wang ZQ, Zhang QH, Song HD, Chen S, Xu X, Xu B, Ju C, Huang Y, Brindley PJ, McManus DP, Feng Z, Han ZG, Lu G, Ren S, Wang Y, Gu W, Kang H, Chen J, Chen X, Chen S, Wang L, Yan J, Wang B, Lv X, Jin L, Wang B, Pu S, Zhang X, Zhang W, Hu Q, Zhu G, Wang J, Yu J, Wang J, Yang H, Ning Z, Beriman M, Wei CL, Ruan Y, Zhao G, Wang S, Liu F, Zhou Y, Wang ZQ, Lu G, Zheng H, Brindley PJ, McManus DP, Blair D, Zhang QH, Zhong Y, Wang S, Han ZG, Chen Z, Wang S, Han ZG, Chen Z. (2009). "The *Schistosoma japonicum* genome reveals features of host-parasite interplay." Nature **460**(7253): 345-351.