

6
290

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Unidad Académica de los Ciclos
Profesional y de Posgrado del CCH
Instituto de Investigaciones Biomédicas

Distribución de epítopes para células B de un antígeno
inmunodominante en la cisticercosis humana.

Tesis que para obtener el grado de
Licenciado en Investigación Biomédica Básica
presenta:

José Vázquez Talavera

1993

TESIS CON
FALLA DE C...



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 está 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.

Índice

I.	Resumen	1
II.	Introducción	3
1.	Resumen histórico	3
2.	La cisticercosis en México	6
3.	La biología de la <i>T. solium</i>	7
4.	Patología de la neurocisticercosis	16
5.	Epidemiología de la cisticercosis humana	18
6.	Importancia socio-económica de la cisticercosis humana	20
7.	Importancia de la cisticercosis porcina	21
8.	Diagnóstico	24
9.	Tratamiento	28
10.	Relación huésped-parásito	30
11.	Antecedentes del proyecto	33
12.	Objetivos del proyecto	44
III.	Materiales y Métodos	
1.	Materiales	46
2.	Métodos	48
IV.	Resultados	
1.	Construcciones de expresión	60
2.	Expresión de las proteínas recombinantes	64
3.	Purificación de las proteínas recombinantes	69
4.	Selección de los sueros positivos al AgB	71

5.	Distribución de epítopes reconocidos por anticuerpos humanos en las proteínas recombinantes	73
V.	Discusión	85
VI.	Apéndices	92
1.	Características de las cepas bacterianas	92
2.	Vector pRSET	96
VII.	Bibliografía	100

Resumen

La paramiosina o antígeno B de la *Taenia solium* (TPmy) es un antígeno inmunodominante en la cisticercosis humana que inhibe la cascada del complemento a través de una interacción con el Clq. Recientemente, se ha clonado y expresado el gen de esta proteína y se ha mostrado que el producto recombinante mantiene las propiedades de la proteína natural. Asimismo, por técnicas de DNA recombinante se ha mostrado que la unión con el Clq se lleva a cabo a través del extremo amino-terminal de la TPmy. En el presente trabajo de tesis se pretende responder la pregunta de si cabría esperar un bloqueo del sitio activo de la TPmy por los anticuerpos del huésped. Para ello se llevó a cabo la localización de los epítopes para células B en la molécula del antígeno B de la *Taenia solium*.

Se amplificaron tres regiones así como la secuencia codificadora total de la TPmy, por medio de PCR usando una clona de cDNA como templado. El producto de PCR VW 2-1 codifica para el tercio amino-terminal de la proteína, el producto VW 4-1 para el tercio carboxilo-terminal y el VW 3-3 para el tercio central. Los fragmentos se subclonaron en el plásmido pRSET y se expresaron en *E. coli*. Los péptidos recombinantes fueron purificados y puestos a reaccionar en Western Blot con sueros humanos positivos a la TPmy.

La proteína VW 4-1 fue reconocida por todos los sueros mientras que las proteínas VW 3-3 y VW 2-1 fueron reconocidas

sólo débilmente. Estos resultados sugieren que los anticuerpos del huésped no bloquean el extremo amino terminal de la TPmy. En este sentido son consistentes con el posible papel inmunomodulador de la TPmy en la cisticercosis ya que el extremo amino terminal podría quedar libre para interactuar con el C1q e inhibir al complemento.

II. Introducción.

La cisticercosis es un problema económico y de salud pública en algunos países de Latinoamérica, Asia y África. En México tiene gran importancia por dos razones principales: las pérdidas económicas en industrias que procesan carne de cerdo y el costo del diagnóstico, tratamiento e incapacitación de los individuos que la contraen. Además, alrededor del 1% de los mexicanos presentan niveles detectables de anticuerpos anti-cisticerco; es la principal causa de problemas neurológicos de origen parasitario y puede ocasionar cuadros clínicos muy variados y graves.

Esta enfermedad es causada por el establecimiento de la forma larvaria, también conocida como cisticerco, de la *T. solium* en los tejidos del hombre y del cerdo. La *T. solium* tiene por huésped definitivo al ser humano y como intermediario al cerdo o al hombre mismo. Por ello, la propagación de la cisticercosis depende de la relación que el hombre establece con el cerdo.

1. Resumen Histórico

Existen documentos que muestran el conocimiento de la *T. solium* desde los tiempos de Hipócrates. Moisés dictó leyes sanitarias para proteger a su pueblo de plagas de insectos y de la carne de animales infectados con "piedras". Aristófanes -en

una de sus comedias, entre los años de 380-375 A.C.- describió una estructura semejante al cisticerco así como un método para detectarlo en la lengua del cerdo (Aristófanes, 1976).

Aristóteles, en su libro "La Historia Animal", lo describe como una enfermedad padecida por los cerdos; además, también describe su distribución en el cuerpo del animal, el efecto en los músculos y un remedio para eliminarlo: el *Triticum espelta*, un tipo de trigo (Aristóteles, 1969).

El primer comunicado del parásito en el humano es de Paranoli, quien lo halló en el cuerpo calloso de un hombre. En 1558, Gessner lo encontró en la dura madre de un epiléptico (Henneberg, 1912). En 1758, Lineo clasificó la *T. solium* junto con otros ténidos; sin embargo, no se le diferenció de la *T. saginata* hasta Goeze en 1782. La relación entre el cisticerco y la solitaria al parecer fue descrita por Beneden en 1853. Sin embargo, fueron Kücknmeister en 1855 y Leuckart en 1856, quienes identificaron a los cisticercos como larvas de *T. solium* y demostraron el ciclo de vida (Henneberg, 1912). En 1933, Yoshino confirmó que los cerdos después de ingerir huevecillos de *T. solium* desarrollan la cisticercosis (Yoshino, 1933).

En 1862, el psiquiatra berlinés Griesinger, estableció cinco clasificaciones diagnósticas: 1. casos asintomáticos, 2. casos con ataques epilépticos sin otro tipo de disturbios; 3. casos con epilepsia y cambios mentales, 4. casos con desórdenes mentales crónicos y 5. casos con síntomas como irritación cerebral difusa

y torpor, pero sin desorden mental o epilepsia (Griesinger, 1872).

En Alemania, Henneberg informó una disminución de la cisticercosis durante los últimos años del siglo pasado y los primeros del actual. Aparentemente, esta disminución fue causada por el mejoramiento en la inspección de la carne y el establecimiento de criaderos higiénicos de cerdos, debido al pánico de la gente hacia la triquinosis. La cisticercosis porcina disminuyó de igual forma, siendo la reducción tan significativa que Henneberg asumió que la enfermedad se había erradicado. Es interesante hacer notar que la implementación de medidas sanitarias lograron erradicar la cisticercosis de Alemania (Henneberg, 1912).

En 1909, Weinberg intentó por primera vez diagnosticar la hidatidosis con el ensayo de fijación de complemento, utilizando un extracto de quiste hidatídico como antígeno (Henneberg, 1912). En 1911, Moses usó un extracto acuoso de cisticercos como antígeno para el diagnóstico de tres pacientes con cisticercosis cutánea y uno con cisticercosis cerebral (Moses, 1911). En 1930, se utilizó el líquido cefalorraquídeo (LCR) con buenos resultados por Pessoa e Silveira (Pessoa e Silveira, 1930), mientras que Rothfeld desarrolló una prueba de inmunoprecipitación (Rothfeld, 1935). En 1940, Lange informó buenos resultados usando LCR de 24 pacientes neurocisticercosos (Lange, 1940). En México, la primera prueba inmunológica para el diagnóstico de la

cisticercosis fue un ensayo de fijación de complemento diseñada por Nieto en 1956 (Nieto, 1956).

2. La cisticercosis en México

El primer informe de cisticercosis en México fue de José Ramos en 1888 y se trataba de un caso de cisticercosis ocular (Ramos, J. 1888). La primera descripción de neurocisticercosis fue de Gómez-Izquierdo en 1901 y se trató de una paciente con trastornos mentales que ingresó al Hospital Psiquiátrico de Orizaba, Veracruz (Gómez-Izquierdo, 1901). En 1935, Salazar Viniegra envió cerebros que provenían del Manicomio General a Ochoterena, quien realizó estudios histopatológicos en donde encontró cisticercos intracraneanos (Ochoterena, 1935). Posteriormente, otros autores: Rojo de la Vega, Ramírez Moreno y Guevara Oropeza citado por Reyes y Beltrán, informaron casos de cisticercosis encefalítica (Reyes et al., 1967).

La gravedad del problema en México se documentó a raíz de la fundación del servicio de Neurocirugía en 1937 cuando se empezó a registrar regularmente los casos de cisticercosis con cuadros de hipertensión craneana (Nieto, 1982). Entre 1938 y 1944 Robles intervino quirúrgicamente en 100 casos de supuesto tumor cerebral y encontró 25 pacientes con neurocisticercosis (Robles, 1944). En 1944, Mazzoti comunicó que de 2,000 análisis coproparasitoscópicos, 2% resulto positivo a *T. solium* (Mazzoti,

1944). De 1944 a 1946, Costero encontró que un 3.6 % de los autopsias realizadas en el Hospital General de México tenían neurocisticercosis (Costero, 1944; Costero, 1946). Cifras similares han sido informadas por varios autores entre 1958 y 1972: Macías (Macías et al., 1958), Briseño (Briseño et al., 1961), Zenteno (Zenteno-Alanis, 1966), Márquez (Márquez et al., 1969), Flores (Flores et al., 1971) y Rabiela (Rabiela et al., 1972). En 1979, se encontró cisticercosis en el 3.2 % de las autopsias llevadas a cabo en el Centro Médico Nacional (Rabiela et al., 1979). A partir de entonces el interés hacia la cisticercosis ha sido creciente, hasta llegar a la época actual en que existen al menos seis grupos de investigación básica y otros tantos de investigación clínica, involucrados en el estudio de la cisticercosis. Como se verá a continuación, las contribuciones de los investigadores mexicanos al conocimiento de la enfermedad, de la relación huésped-parásito y de la biología del cisticercosoma han sido considerables.

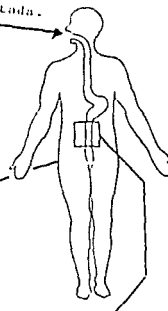
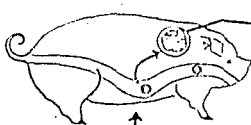
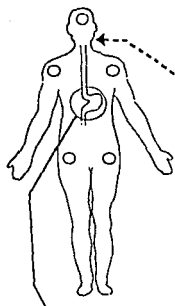
3. Biología de la *T. solium*

El ser humano es el único huésped definitivo del gusano adulto y es el responsable de la infección de los huéspedes intermediarios humano o porcino (Figura 1). El ciclo de vida de la *T. solium* se puede dividir en dos etapas; la primera ocurre en el huésped intermediario y la segunda en el definitivo.

Huésped intermediario accidental.

Huésped intermediario.

Huésped definitivo.
(y reservorio)



Carne infectada.

Ciclo de vida.

Huevoecillo.



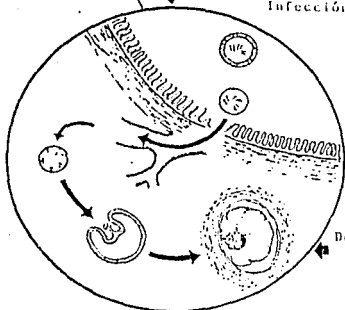
31-43 μm

Infección con la etapa adulta.

Cisticercosis humana.

Infección.

El cisticerco es liberado, el escólex evagina y se fija en el intestino delgado. Madura en tres meses. Vive hasta 25 años.



Desarrollo del cisticerco.

5 x 8-10 mm.)

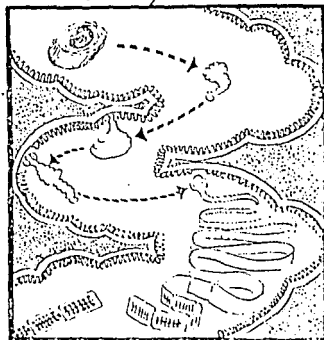
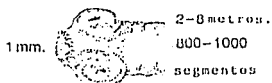


Figura mostrando un cisticerco en el cerebro humano.

Escólex.

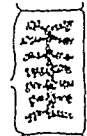


4 ventosas y un roseto con dobles hilera de ganchos.

Estróbilos.



Proglótido.



7-12 rama uterinas a cada lado.

Figura 1. Ciclo de vida de *Taenia solium* (tomado de Jeffrey et al., 1991).

Desarrollo en el huésped intermediario: La primera etapa se inicia con la ingestión de los huevecillos de *T. solium* por el huésped intermediario. Los huevecillos presentan una serie de envolturas protectoras que capacitan al embrión para sobrevivir en el medio ambiente (Laclette *et al.*, 1982). Estas envolturas han sido estudiadas por microscopía de luz o por microscopía electrónica de transmisión y barrido (Figura 2). La capa más externa, denominada vitelo, está constituida por células que el

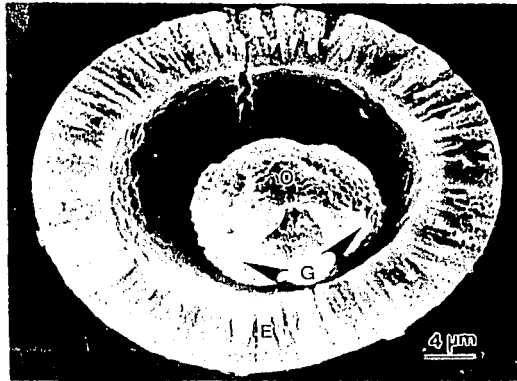


Figura 2. Micrografía electrónica de barrido de un huevecillo de *Taenia solium*. E: embrióforo, G: ganchos oncosferales, O: oncosfera (tomada de Laclette *et al.*, 1982).

gusano adulto aporta al sostenimiento del embrión. Debajo del vitelo se encuentra el embrióforo formado por bloques proteicos unidos entre sí por un material cementante. Estos bloques le dan la apariencia estriada al huevecillo y son sintetizados por una capa celular sincicial que se encuentra debajo, las células embrioforales. La siguiente envoltura es la membrana oncosferal, que recubre a la oncosfera o embrión hexacanto que cuenta con un complejo muscular que acciona los tres pares de ganchos (Gammel et al., 1982).

Una vez que el huevecillo ha sido ingerido por el huésped intermediario, las enzimas proteolíticas del estómago e intestino destruyen al embrióforo liberando al embrión (Silverman, 1954; Laclette et al., 1982), el cual se activa y penetra la pared intestinal del huésped. El embrióforo es digerido por el ácido clorhídrico, la pepsina gástrica y la tripsina intestinal. Al destruirse el embrióforo, la oncosfera queda únicamente envuelta por la membrana oncosferal. La señal que produce la activación del embrión es un cambio en la permeabilidad de la membrana oncosferal provocada por las sales biliares (Laclette et al., 1982). La oncosfera activada atraviesa la mucosa intestinal por la acción combinada de los ganchos que desgarran el tejido y de secreciones líticas que digieren la mucosa. Posteriormente, el embrión alcanza los capilares sanguíneos y linfáticos que lo llevan a diferentes órganos, en donde se desarrolla hasta convertirse en un cisticerco.

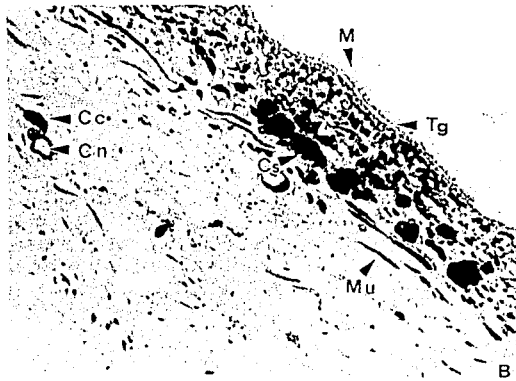
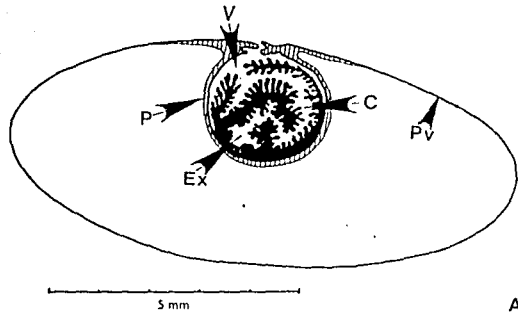


Figura 3. Morfología del cisticerco de *Taenia solium*. A) Ilustración esquemática de la larva entera y B) micrografía óptica de un corte de la pared vesicular. C: canal espiral, Cc: célula formadora de canal, Cs: citones subtegumentales, Cn: canal, Ex: escólex, M: microvellosidades, Mu: músculo, P: pared vestibular, Pv: pared vesicular, Tg: tegumento y V: espacio vestibular.

El metacéstodo o cisticerco (Figura 3) es una vesícula translúcida, ovoíde o circular, de 5 a 10 mm de diámetro con un pequeño gusano o escólex metido hacia dentro (invaginado). El escólex invaginado tiene un rostelo con una doble hilera de ganchos y cuatro ventosas, semejante al de la etapa adulta. La vesícula está llena de un fluido transparente que contiene proteínas del parásito y del huésped (Ambrosio Hernández, 1991). La pared vesicular es un tejido sincicial cuya superficie externa muestra un epitelio cubierto de microvellosidades o microtrícas (Figura 4) conocido como tegumento (Ramírez-Bon et al., 1982).

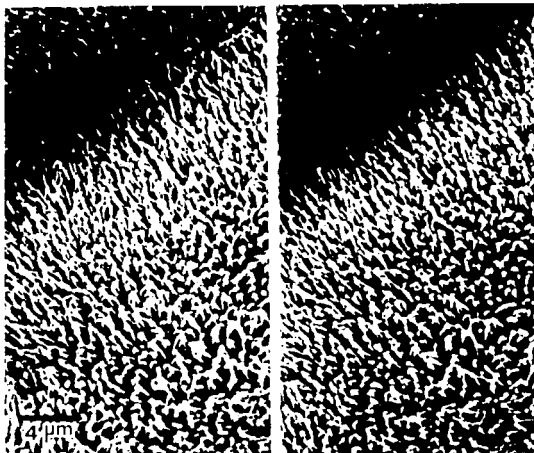


Figura 4. Superficie externa de la pared vesicular de un cisticerco de *Taenia solium* en la cual se pueden distinguir las microtrícas (tomada de Ramírez-Bon et al., 1982).

El tegumento también es llamado citoplasma distal y se conecta con los citones tegumentales a través de puentes citoplásmicos llamados procesos internunciales. Por debajo del tegumento se encuentran varias capas de músculos lisos, bolsas de almacenamiento de glucógeno y grasas así como un sistema protonefridial constituido por varios tipos celulares tales como las células flama y las células de los canales (Ramírez-Bon et al., 1982). El cisticerco puede permanecer en los tejidos del huésped intermediario durante un buen número de años (Dixon et al., 1944; Dixon et al., 1961), rodeado por una cápsula de tejido conectivo. Cabe hacer notar que el tegumento es el sitio de contacto del parásito con el huésped por lo que debe desempeñar un papel central en el mantenimiento de la relación huésped-parásito.

Desarrollo en el huésped definitivo: El ciclo de vida de la *T. solium* se continúa cuando el humano consume carne infectada de cerdo e ingiere uno o varios cisticercos viables. La masticación, las sales biliares y las proteasas digestivas destruyen la pared vesicular e inducen la salida o evaginación del escólex invaginado (Cañedo et al., 1982). Una vez evaginado, el escólex se fija en la pared del yeyuno por medio de sus ventosas y ganchos rostellares (Cañedo et al., 1982). A partir de entonces el escólex comienza a crecer y diferenciarse hasta convertirse en un gusano adulto.

La tenia adulta mide entre 1.5 y 5 m de longitud y su cuerpo está formado por el escólex, el cuello y el estróbilo (Figura 1 y 5). El escólex o cabeza presenta cuatro ventosas y un rostellum armado con una corona doble de ganchos, que posibilitan su fijación a la mucosa intestinal. A continuación del escólex se encuentra el cuello, que es la región que da origen al estróbilo y que presenta una alta actividad mitótica. Finalmente, el estróbilo es una cadena de proglótidos que se desarrollan a

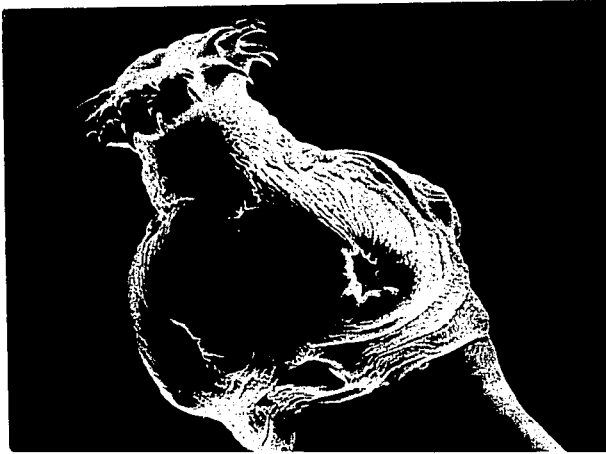


Figura 5. Micrografía electrónica de barrido del escólex de un cisticerco evaginado de *Taenia solium* (cortesía del Dr. Juan Pedro Laclette).

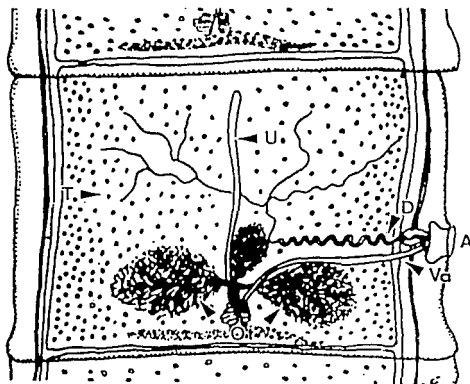


Figura 6. Representación esquemática de un proglótido de *Taenia solium*, enfatizando al aparato reproductor. A: atrio genital, D: ducto genital, Ot: ovario trilobulado, T: testículos, U: útero y Va: vagina.

partir del cuello. Cada proglótido posee genitales masculinos y femeninos y su grado de diferenciación está relacionado con la posición que ocupa en el estróbilo; los proglótidos más lejanos al cuello y al escólex son más maduros que los más cercanos. Los proglótidos maduros poseen varios cientos de testículos y un ovario trilobulado, por lo que se piensa que se autofecunda para producir hasta 50,000 huevecillos (Figura 6). Estos proglótidos grávidos se liberan del estróbilo a un ritmo de cinco por día,

descargando cantidades enormes de huevecillos potencialmente infectantes al medio ambiente. Los huevecillos pueden estar maduros o inmaduros; los inmaduros pueden madurar en el medio ambiente y permanecen viables e infectantes por semanas o meses (Aluja et al., 1987). La contaminación de aguas alimentos con los huevecillos es favorecida por el fecalismo al aire libre, el hacinamiento y la falta de higiene. En general se acepta que los huéspedes intermediarios se infectan por ingestión de los huevecillos que contaminan alimentos y agua. Recientemente, se ha encontrado que la cohabitación con un individuo teniásico aumenta el riesgo de adquirir la cisticercosis, lo que significa que la transmisión también ocurre directamente por un individuo teniásico (ver sección I.X epidemiología; Díaz-Camacho et al., 1989).

4. Patología de la neurocisticercosis

La cisticercosis es la parasitosis más común en el cerebro y también una de las causas de problemas neurológicos más frecuentes en México.

La neurocisticercosis tiene una gran variedad de manifestaciones dependiendo del número y localización de los cisticercos en el sistema nervioso central (SNC). Los parásitos pueden alojarse en el espacio subaracnoideo, en los ventrículos y en el parénquima cerebral. Los cisticercos parenquimatosos pueden

afectar los hemisferios cerebrales, el tronco cerebral, el cerebelo y la médula espinal. Además, la patología que produce el cisticerco depende de otros factores tales como la reacción inflamatoria que desencadena. La intensidad de la reacción inflamatoria a su vez dependerá de la respuesta inmunológica de cada individuo y de la historia particular de cada parásito en el tejido. A pesar de lo anterior, en general se acepta que el 50 % de los casos de cisticercosis cursan asintomáticos.

El tiempo medio de aparición de síntomas en la cisticercosis humana es de 7 años (Dixon y Hardgraves, 1944; Dixon y Lipscomb, 1961). Las manifestaciones neurológicas más frecuentes son: crisis convulsivas, hipertensión intracraneal, síndrome de neurona motora superior y alteraciones del equilibrio y la visión.

En los casos asintomáticos, los cisticercos generalmente se localizan en el parénquima cerebral o el espacio subaracnoideo. En cambio, en la neurocisticercosis sintomática los cisticercos muestran reacción inflamatoria intensa. Conjuntamente, son frecuentes las formas racemosas del cisticerco, que siempre se encuentran en compartimientos líquidos tales como las cisternas meníngeas basales y las cavidades ventriculares. En las cisternas, la cápsula inflamatoria puede obstruir el paso del LCR provocando hidrocefalia e hipertensión craneal.

Se ha intentado describir la evolución natural de los cisticercos en el SNC de acuerdo a las observaciones en pacientes humanos. Primero se considera al cisticerco viable, vesicular,

con membrana transparente y escólex invaginado rodeado por una reducida inflamación. Posteriormente sigue la etapa vesicular-coloidal, con una vesícula engrosada, fluido vesicular turbio y rodeado de una cápsula inflamatoria. Después empieza la etapa granular nodular, con una vesícula reducida en tamaño y un fluido vesicular semisólido y granujiento. Finalmente, se alcanza la etapa calcificada; el parásito se convierte en un nódulo mineralizado sólido y rodeado por tejido conectivo denso. Se desconocen los tiempos que toma cada una de las etapas, sin embargo, existen evidencias indirectas que sugieren que los cisticercos pueden sobrevivir por décadas en el cerebro humano.

5. Epidemiología de la cisticercosis humana

Sólo se cuenta con estimaciones de la frecuencia de la cisticercosis en México y desgraciadamente no se ha evaluado la prevalencia. Estudios seroepidemiológicos recientes (Figura 7) han mostrado una seropositividad del 1 al 3.5 % en la población abierta del país (Larralde et al., 1992). Estos valores deben ser tomados con cautela ya que sólo indican que los individuos tuvieron contacto reciente con el parásito y no necesariamente que están infectados. El riesgo de contacto parece afectar a todos aproximadamente igual, aunque se encontraron algunas correlaciones significativas. Por ejemplo, el riesgo disminuye ligeramente en los niveles socioeconómicos privilegiados y en

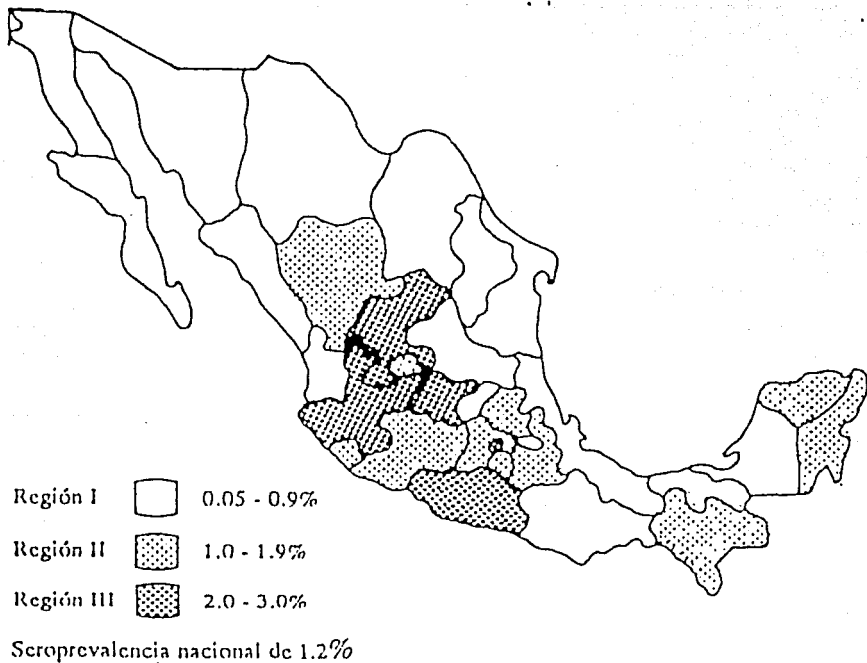


Figura 7. Seropositividad hacia un extracto crudo de cisticercos en grupos etarios de diferentes entidades federativas muestreadas durante 1987-1988 (tomado de Larralde *et al.*, 1992).

individuos con mayor escolaridad. Las mujeres tienen mayor tasa de seroprevalencia.

Aunque estudios en comunidades rurales (Díaz, 1989; Sarti, 1989) indican que existe un riesgo por contacto íntimo, los estudios serológicos muestran, además, un riesgo por factores que trascienden el entorno familiar. En cuanto a la edad, se encontró una seropositividad baja en los primeros cinco años de vida y un aumento gradual hasta los 50 años (Larralde et al., 1992). No existen estimados precisos de la prevalencia de cisticercosis en la población abierta de México. Parece claro que su valor debe oscilar entre 10 y 100 veces menos que los estimados de seropositividad mencionados arriba. Se requiere mejorar substancialmente el valor predictivo de los métodos diagnósticos actuales. En este sentido, el desarrollo de métodos que detecten antígenos en muestras de suero podría ayudar a cambiar esta situación.

6. Importancia socio-económica de la cisticercosis humana

La cisticercosis humana es una parasitosis considerable desde el punto de vista económico y social en México y otros países.

En un estudio hecho en 1982, Velasco-Suárez calculó pérdidas económicas anuales de 2,500 a 5,900 millones de pesos, debidas a la incapacidad laboral de individuos con cisticercosis. Las

pérdidas económicas por gastos de atención médica a pacientes con neurocisticercosis en 1986 fueron de 14.5 millones de dólares; se trataron 2,700 casos de neurocisticercosis (Flisser, 1988). Por último, el 75% de los individuos adquieren la cisticercosis en edad productiva (Velasco-Suárez et al., 1982; Flisser, 1988).

7. Importancia de la cisticercosis porcina

Se puede decir que la cisticercosis es un problema de conducta humana que se mantiene por ignorancia, negligencia y falta de recursos. La costumbre de crianza de los cerdos en libertad, incrementa el riesgo de que adquieran la cisticercosis por alimentación con heces fecales humanas, alimentos y agua contaminadas con huevecillos de *T. solium* (Figura 8). Los animales cisticercosos detectados en la inspección *post-mortem* deberían ser decomisados y procesados adecuadamente para evitar destruir la carne. Sin embargo, en nuestro país un gran número de animales infectados son distribuidos clandestinamente.

Existen diversos estudios que han tratado de estimar la prevalencia de la cisticercosis porcina en diferentes regiones del país. El estudio más completo es el realizado por Aluja que investigó los registros de 75 rastros en 22 estados de la república y estimó en 1.55 % la prevalencia nacional (Aluja, 1982) (Tabla 1).



Figura 8. Cerdo en libertad alimentándose con desechos en una población rural (tomado de Aluja, 1982).

<i>Estado</i>	<i>Localidad</i>	<i>Frecuencia</i>	<i>Año</i>
Aguascalientes	Aguascalientes	0.52	1980
Chihuahua	Chihuahua	0.49	1980
	Chihuahua	3.32	1980
	Chihuahua	1.65	1981
Colima	Varios	2.4	1980
Coahuila	Torreón	2.37	1981

<i>Estado</i>	<i>Localidad</i>	<i>Frecuencia</i>	<i>Año</i>
Distrito Federal	México, Ciudad	0.16	1981
Durango	Durango	2.21	1980
Guanajuato	Ocampo	10.0	1981
	San Felipe	3.0	1981
Jalisco	Guadalajara	0.005	1981
Michoacán	La Piedad	10.0	1980
Morelos	Varios	1.9	1980
	Cuernavaca	0.37	1980
Nuevo León	Monterrey	0.016	1981
Querétaro	Querétaro	0.74	1981
Sonora	Hermosillo	0.07	1980
Tamaulipas	Ciudad Victoria	0.37	1980
Tlaxcala	Huamantla	0.63	1980
	Apizaco	3.3	1980
Veracruz	Jalapa	0.11	1980
	Veracruz	0.75	1980
	Tuxpan	1.08	1980

<i>Estado</i>	<i>Localidad</i>	<i>Frecuencia</i>	<i>Año</i>
Yucatán	Mérida	0.04	1980
Zacatecas	Jerez	0.75	1980
	Fresnillo	2.10	1980
	Zacatecas	1.26	1980
Tabasco	No se encontró información		
Campeche			

Tabla 1. Prevalencia de la cisticercosis en diferentes regiones del país (Tomada de Aluja, 1982).

La cisticercosis porcina causa considerables pérdidas económicas. En 1980 más de 43 millones de dólares se perdieron por decomisos en los rastros (Acevedo-Hernández, 1989).

8. Diagnóstico.

El diagnóstico de la neurocisticercosis puede dividirse en dos grandes rubros: diagnóstico imagenológico y diagnóstico inmunológico.

Diagnóstico imagenológico: Desde hace muchos años se han utilizado varios métodos radiológicos simples o con medios de contraste para el diagnóstico imagenológico de la neurocisticercosis. La introducción de la tomografía computarizada vino a cambiar radicalmente la confiabilidad de los métodos imagenológicos. Este es un procedimiento no invasivo, seguro, preciso y moderadamente caro. La certeza diagnóstica de la tomografía alcanza un 97% y permite establecer el número y localización del(los) parásito(s) en el sistema nervioso central, además de facilitar el seguimiento de las lesiones en el cerebro de los pacientes. Recientemente, la resonancia magnética nuclear parece ser un paso adelante sobre la tomografía computarizada; entre sus ventajas se cuentan una mayor resolución y contraste en la imagen obtenida y la generación de imágenes en tiempos reales. La gran desventaja de la resonancia magnética es su alto costo, además de la reducida disponibilidad de equipos en nuestro país.

Diagnóstico inmunológico: Existe un gran número de informes en relación al diagnóstico inmunoenzimático (ELISA) de la cisticercosis (Schantz et al., 1980; Diwan et al., 1982; Grogl et al., 1985; Corona et al., 1986; Espinoza et al., 1986; Larralde et al., 1986; Rosas, 1986; Nascimento et al., 1987; Pammenter et al., 1987; Michault et al., 1990). En la mayoría de estos métodos se detecta la presencia de anticuerpos dirigidos hacia antígenos parasitarios; en consecuencia su valor predictivo y su utilidad para el diagnóstico del paciente hospitalario es limitada. La

presencia de anticuerpos sólo indica que el individuo ha tenido contacto reciente con alguna etapa del ciclo de vida de la *T. solium* y no, que se trata de una infección actual. Se han utilizado distintos extractos antigénicos entre los que se incluyen extractos crudos de tejido parasitario, fluido vesicular, fracciones glicoproteicas, etc. Un grave inconveniente en la mayoría de estos métodos es la existencia de reacciones cruzadas con otras parasitosis (Schantz et al., 1980; Espinoza, 1986; Pammenter, 1992). En general, los métodos inmunoenzimáticos obtienen mejores resultados con muestras de líquido cefalorraquídeo (LCR) que con suero (Espinoza et al., 1986).

También existen informes respecto al uso del Western blot (WB) en el diagnóstico de la neurocisticercosis. Este método que también detecta anticuerpos en muestras de suero y líquido cefalorraquídeo, alcanza valores de un 98% de sensibilidad y 100% de especificidad (Tsang et al., 1989). Se ha descrito que el ensayo de WB es más sensible y específico que el ELISA (Diaz et al., 1992). Además, se ha intentado definir los antígenos específicos del cisticerco de la *T. solium* (Gottstein et al., 1986; Gottstein et al., 1987). Por ejemplo, se ha descrito un péptido 26 kDa que no cruza con otras parasitosis -entre ellas hidatidosis- y que permite alcanzar una sensibilidad del 70% (Liu et al., 1991) con muestras de suero. También se han identificado otras proteínas aparentemente específicas de la *T. solium* (Kong et al., 1989).

Una manera en que los métodos inmunológicos se conviertan en diagnósticos de enfermedad sería a través de la detección de antígenos parasitarios. La detección de antígenos indica que el paciente presenta una infección actual. Desafortunadamente, el número de trabajos al respecto es limitado. Entre los antígenos supuestamente específicos de *T. solium* se han descrito antígenos purificados del escólex del cisticerco mediante anticuerpos monoclonales, que permiten alcanzar 100% de sensibilidad y que no presentan reacción cruzada con *T. solium* o *T. saginata* (Nascimento et al., 1987). También se ha tratado de detectar antígenos en muestras de LCR con una sensibilidad del 70-100% (Estrada et al., 1985; Téllez-Girón et al., 1987; Correa et al., 1989; Estrada et al., 1989; Gutiérrez et al., 1989; Velasco Castrejon et al., 1989; Choromanski et al., 1990).

También se han diseñado pruebas inmunológicas que utilizan muestras de saliva, las cuales resultan útiles para estudios epidemiológicos ya que la obtención de la muestra es indolora y no-invasiva (Acosta, 1990; Feldman et al., 1990). Las reacciones cruzadas observadas con quiste hidatídico en estas publicaciones, no causaría problemas en México porque la hidatidosis es de muy baja prevalencia.

Se ha intentado establecer métodos diagnósticos utilizando herramientas de la ingeniería genética: clonando y expresando genes de parásito que puedan ser inmunogénicos o especie específicos, o utilizando la métodos de hibridación de DNA

(Flisser et al., 1990; Harrison et al., 1990; García-Domínguez et al., 1992).

Diagnóstico de la cisticercosis porcina: El procedimiento más utilizado para diagnosticar la cisticercosis porcina en animales vivos es la palpación de la lengua y observación de los párpados que tiene un sensibilidad cercana al 70% (González et al., 1990). La inspección post-mortem generalmente consiste en practicar un par de cortes detrás de la paletilla en los músculos tríceps y anconeos derechos. En el músculo expuesto los cisticercos pueden ser detectados visualmente.

9. Tratamiento

El tratamiento que se aplica al paciente neurocisticercoso es variable dependiendo de la sintomatología en relación con la localización, número, y tipo de los cisticercos. El tratamiento utilizado puede ser sintomático, quirúrgico o farmacológico. En el tratamiento sintomático se utilizan un buen número de fármacos, por ejemplo, las crisis convulsivas son tratadas con antiepilépticos, la cefalea con analgésicos, la hipertensión intracraneana puede ser tratada quirúrgicamente o farmacológicamente con esteroides y diuréticos, finalmente, las alteraciones de conducta se tratan con psicodrogas. El tratamiento quirúrgico depende del número y características

patológicas en el sistema nervioso. La cirugía generalmente resuelve problemas mecánicos, aliviando parcial o temporalmente la hipertensión craneana y, en ocasiones los síntomas focales o epilepsia focal.

La introducción de varios tratamientos farmacológicos ha tenido un gran impacto en el manejo del paciente neurocisticercoso. Sin embargo, su utilización debe llevarse a cabo en centros hospitalarios por personal especializado. Los fármacos más frecuentemente usados son:

a) El prazicuantel es un fármaco de amplio espectro antihelmíntico que fue inicialmente utilizado para el tratamiento de la esquistosomiasis. Este medicamento es muy eficiente cuando los cisticercos son parenquimatosos o subaracnoideos, es poco tóxico y produce efectos colaterales moderados (Andrews, 1976; Leopold et al. 1978; Robles, 1981; Groll, 1982; De Ghetaldi et al., 1983; Sotelo et al., 1984; Escobedo et al., 1989; Sandoval et al., 1989).

b) El albendazol también tiene un amplio espectro antihelmíntico. Ataca larvas y formas adultas de nemátodos gastrointestinales y pulmonares, también formas adultas de céstodos y tremátodos. Este medicamento ha sido también empleado con éxito en el tratamiento de la cisticercosis; su ventaja sobre el prazicuantel es el bajo costo y la fácil obtención (Escobedo et al., 1987; Sotelo et al., 1988;

1988b; Alarcón *et al.*, 1989; Escobedo *et al.*, 1989; Agapejev *et al.*, 1992; Botero *et al.*, 1992; Escobedo *et al.*, 1992).

Al provocar la muerte del parásito con estos medicamentos, se puede incrementar la reacción inflamatoria y con ello exacerbar los síntomas neurológicos. Por lo tanto el tratamiento farmacológico antiparasitario generalmente se acompaña con anti-inflamatorios.

10. Relación huésped-parásito

La presencia del cisticerco en los tejidos de su huésped humano o porcino induce la formación de una respuesta inmune. La respuesta inmune del huésped cisticercoso ha sido estudiada principalmente de una manera indirecta en trabajos relacionados al inmunodiagnóstico. Se ha encontrado que la respuesta inmune no se relaciona con la destrucción del parásito. Los humanos cisticercosos tienen anticuerpos contra el cisticerco y a pesar de ello, el cisticerco sobrevive por períodos prolongados. Se ha demostrado que el tiempo promedio para la aparición de los síntomas en los individuos cisticercosos es de 7 años y puede llegar hasta los 20 años.

La IgG es la inmunoglobulina predominante entre los anticuerpos anti-cisticerco. Los sueros reconocen en inmunoelectroforesis hasta 8 antígenos y en Western blot más de

20. Los cisticercos de *T. solium* presentan abundante IgG del huésped asociada a la superficie, sin embargo, estas moléculas tampoco se relacionan con el daño en los cisticercos. (Correa et al., 1989) Se ha descrito una molécula de 55 kDa que se une a la región Fc de las inmunoglobulinas (Mandujano et al., 1992).

Las personas infectadas pudieran tener mayor susceptibilidad a otras enfermedades (Correa et al., 1989). Aparentemente la respuesta celular se encuentra disminuida en pacientes con cisticercosis (Correa et al., 1989). Incluso se ha informado un factor de RNA que inhibe la activación de linfocitos humanos por fitohemaglutinina (Molinari et al., 1990).

Se ha propuesto que el cisticerco emplea varios mecanismos para evadir la respuesta inmune del huésped y sobrevivir por largos períodos. Entre los mecanismos propuestos se pueden mencionar: 1. secreción de antígenos inmunodominantes para desviar a los anticuerpos lejos de la superficie ("pantalla de humo"), 2. enmascaramiento de la superficie con moléculas del huésped, 3. modulación o supresión de la respuesta inmune del huésped, 4. establecimiento del parásito en huéspedes inmunosuprimidos y 5. alojamiento en lugares inmunológicamente privilegiados tales como el sistema nervioso.

A pesar de lo anterior se puede inducir inmunidad en cerdos con antígenos de excreción/secreción obtenidos en cultivos de oncosferas (Pathak et al., 1990). También se puede proteger ratones de la infección con *T. solium* y *T. saginata* con antígenos oncosferales de estos parásitos (Molinari et al., 1988). En el

caso de la *T. ovis* y de la *T. Taeniaeformis*, se ha demostrado una alta protección utilizando proteínas de excreción secreción oncosferral o sus formas recombinantes (Johnson et al., 1989; Ito et al., 1991). Las perspectivas para el desarrollo de vacunas en parasitosis producidas por ténidos son prometedoras.

11. Antecedentes del Proyecto

El antígeno mejor caracterizado del cisticerco de la *T. solium* es sin duda el antígeno B (AgB). Este antígeno fue caracterizado inicialmente como un arco de precipitación sin carga neta aparente, identificado por inmunolectroforesis al confrontar un extracto de cisticercos contra sueros de pacientes neurocisticercosos (Figura 9). En esta prueba, fue el antígeno reconocido con mayor frecuencia por anticuerpos en sueros de pacientes neurocisticercosos, es decir, se trata de un antígeno inmunodominante (Woodhouse *et al.*, 1982; Espinoza *et al.*, 1986).

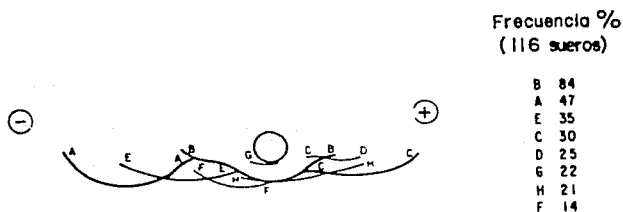


Figura 9. Diagrama de las 8 bandas de precipitación reconocidas por anticuerpos en sueros humanos enfrentados contra un extracto de cisticercos de *Taenia solium* mediante la técnica de inmunolectroforesis (tomado de Flisser *et al.*, 1983).

En 1982 se publicó el primer método de purificación del AgB. Este método era complejo y laborioso y permitía la purificación de pequeñas cantidades de proteína. El AgB purificado por el método original mostraba dos bandas 85 y 95 kDa en SDS-PAGE. Además, pruebas de fenol-sulfúrico indicaban un contenido de 12% de residuos glucosídicos (Guerra et al., 1982).

Se encontró que el AgB se une a la colágena (Plancarte et al., 1982), lo que dio la pauta para desarrollar un procedimiento de purificación por afinidad a colágena (Figura 10). El uso de este nuevo método de purificación mostró que el péptido de 85 kDa era en realidad un producto proteolítico del de 95 kDa (Laclette et al., 1990).

La localización de AgB en el cisticerco ha sido llevada a cabo por métodos de inmunofluorescencia e inmunoperoxidasa indirecta, así como por métodos de yodación radioactiva de superficie (Laclette et al., 1987). El antígeno se encontró ampliamente distribuido en el tejido del cisticerco, con una fluorescencia más intensa en los citones tegumentales (Laclette et al., 1987; 1989) (Figura 11). Dado que estas células participan activamente en la producción de proteínas y glicoproteínas que se envían al citoplasma distal (Lumsden, 1966; Oaks et al., 1971; Trimble et al., 1975), se propuso que el AgB podría ser sintetizado en los citones tegumentales y enviado al tegumento para su liberación hacia los tejidos del huésped (Laclette et al., 1987; 1989). Los resultados de experimentos con inmunoperoxidasa indirecta e iodación radioactiva de

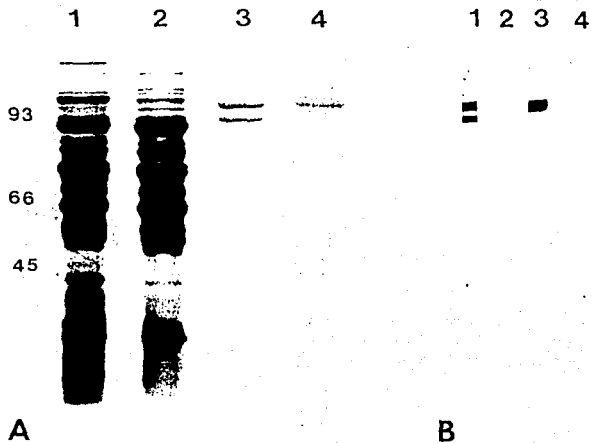


Figura 10. Purificación del AgB de *Taenia solium* a partir de un extracto crudo de cisticercos por afinidad a colágena. A: Gel de poliacrilamida teñido con azul de Coomassie de: 1) extracto crudo de cisticercos, 2) extracto crudo de cisticercos después de incubación con colágena polimérica. Fracciones unidas a la colágena cuando el extracto crudo se incubó en ausencia (3) o en presencia (4) de inhibidores de proteinasas. B: Western blot de la fracción A3 (carriles 1 y 2) y A4 (carriles 3 y 4) incubadas con IgG de conejo anti-AgB (tiras 1 y 3) y con suero normal de conejo (tiras 2 y 4) (tomada de Laclette *et al.*, 1989).

superficie, indicaron que el AgB no era una proteína de superficie por lo que se propuso que se trataba de un producto de excreción-secreción parasitario (Laclette *et al.*, 1987; 1989). Además, se puede colectar AgB en el sobrenadante de cultivo *in vitro* de cisticercos (Laclette *et al.*, 1989) y se le puede detectar en el LCR de pacientes neurocisticercosos (Correa *et al.*, 1989).

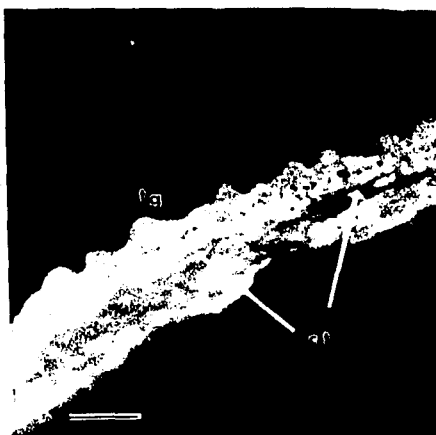


Figura 11. Inmunofluorescencia indirecta de un corte de cisticerco de *Taenia solium* incubado con la fracción de IgG de un suero anti-AgB. Como segundo anticuerpo se usó un suero de chivo anticonejo acoplado a isotiocianato de fluoresceína. Ct: citones tegumentales, Tg: tegumento. Barra: 80 μ (tomada de Laclette *et al.*, 1987).

La posibilidad de que se trate de un producto de excreción-secreción está de acuerdo con su inmunodominancia y correlacionaba bien con la intensa producción de anticuerpos en las células plasmáticas que rodean al cisticerco en el músculo del cerdo (Díaz, 1983). Sin embargo, no concuerda con el pobre infiltrado inflamatorio en el granuloma que rodea al cisticerco en el músculo esquelético del cerdo (Aluja et al., 1988).

La conexión entre el AgB y la reacción inflamatoria surgió a partir de su propiedad de unión con colágena. Esto llevó a cuestionar qué otras moléculas con estructura colagénica podrían unirse al AgB. Entre las proteínas con estructura colagénica cuya función se relaciona al sistema inmune, se encuentra el C1q. Esta proteína es un subcomponente del C1, el primer componente de la cascada del complemento.

Ensayos iniciales mostraron que una preincubación de suero humano con AgB purificado, disminuye los niveles de complemento funcional en el suero (Laclette et al., 1989). Recientemente, nuestro grupo ha informado que la disminución de los niveles funcionales del complemento se debe a una inhibición del C1, posiblemente debida a la unión del AgB con el C1q, tal como se muestra en la figura 12 (Laclette et al., 1992).

Se ha logrado obtener clonas de cDNA que contienen la secuencia codificadora completa del AgB de *T. solium* (Landa, 1992; Landa et al., 1993). La secuencia de aminoácidos deducida a partir de la secuencia nucleotídica codifica una proteína de 863 residuos de aminoácidos con un peso molecular de 98,000.

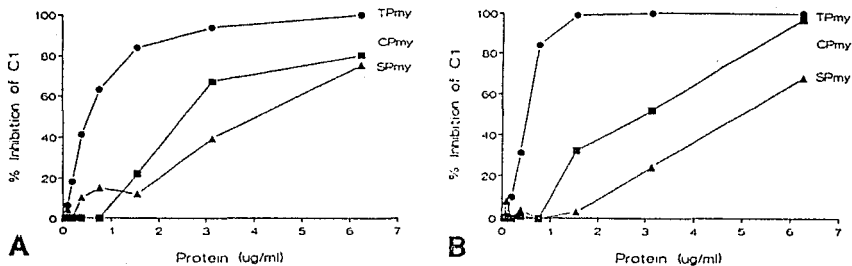


Figura 12. Inhibición del C1 por el AgB. Cantidades variables de AgB fueron incubadas con cada una de las paramiosinas a 37 °C por 30 min, con C1 aislado (A) o con suero humano deficiente en C2 (B). La actividad de C1 remanente en el suero fue evaluada en un ensayo hemolítico usando intermediarios activados de complemento sobre eritrocitos de carnero (tomada de Lacleite *et al.*, 1992).

El análisis de la secuencia de aminoácidos ha mostrado un 75% de similitud con la paramiosina del tremátodo *Schistosoma mansoni* y un 35% con paramiosinas de nemátodos como *Caenorhabditis elegans* y *Dirophilaria immitis* o de artrópodos como *Drosophyla melanogaster* (Landa, 1992). También se demostró identidad inmunológica de la proteína recombinante, expresada en *Escherichia coli*, con el antígeno B (Landa, 1992), además de identidad inmunológica entre paramiosina *S. mansoni* y AgB. Estos resultados demuestran que el AgB es la paramiosina de la *Taenia*

		TTCTTCCAATAGACTGAAACCGTGTATAACT11CGAAT11TCCCTGTGACTGCT11TGACTGAGAAGAAAT11TCTGAACCGTCCCAAT11TGAATC CGGTCCGT11TCTGACT11TCCAATGTACT11CAGCGACACAACCAATCCA11TGGCCAGT11GGCGTGT11TCCACCAAAACGGGACT11TACGAGACGAAGAC
TPmyX1	1	ATGTCTGAATCACACGTCAAAAT11TCTGCTACCATCATACCCGGGACT11CCCCAAGTACTGT11TCGACT11TGAGGTCCGGT11TCAGCAAGTCGGAGCCGCTCT
		H S E S H V K I S R T I I R G T S P V R L E S R V R E L D L S 34
	101	CGATCT11TGAGCGAGT11GCTCCGGTCCGGGTGAAACCGAAT11GCAACGAGAT11GAGCAT11CACT11GGACCAAT11GGCT11GAACCT11TTCGCAAT11TGAGT11GGTA D L E R D A R V A R N A E R N A N E M S I Q L D T M H S A E R L D E L S G 67
	201	C11TCTCT11CAGACT11CAGCAT11GCT11T11CCCCGTAAAGAT11T11GAGCAT11CT11CGAAGCT11GGCCAGGAT11T11GAAANAT11GCCAACCT11GCT11TCGAAC11TCCGGAC T S S Q T H D A I R K R K D M E I S K R L K D L E H A A N G A F E T A E 101
	301	GCCACT11CGCCCGCAACACACACCAT11GAT11CTCCGAGT11CTCCAGCGAGT11GAGA11T11GCAAGACGAGAAGGGCAGGGCAGCAAGGAGGCAAGGCA A T L R R K H N T M I S E I S S E V E N L Q K Q K G R A E C K S Q 135
	401	GCTCAT11GTAATCGAATACGGT11T11GGTCAACCT11GAT11GGCCCT11TAAAGGCCAAGGCT11CAGCGGAGGCAACCT11GGAGGCT11TGGAC11CAGCCAGCTGA L M L E I D N V L E G L D G A L K A K A K A S A E S K L E G L D S Q L 168
	501	CGCCGT11TGAGCGCGT11GACCGCAT11CT11CAACGCCAAAT11GGCCAGCGT11AACT11CTCCCAAGT11CGCT11T11GGCCCGACGAACT11TCCAAT11TGT11TCGGTA T R L K A L D L D L Q D H A D A N S A K S R L K A E N F L E S V R 202
	601	AATCAGGAGT11TAGCAACAAGT11GCTCACT11TCTCTCAACAAGAAGCCGCTCT11GAAAGCCACT11GGT11GACT11TAAGCGGCCAT11GGAT11GAAGAT11GCACG N Q E Y E A Q V V T F S K T K A A L E S Q L D L K R A M D E A A R 236
TPmyX4	701	CAATCGCCTAAGCCT11CAAAACAGT11T11CGAGT11CTCCAAAT11GGAT11ACGACCACT11GCAAGCAGCT11TACGAGGAGGAAGCCGGGACCGGAAAT11TGG N R L S L Q T Q L S S L Q M D Y D N L Q A R Y E E E E A E A G N L 269
TPmyX6	801	GCAACCAAGT11TCCAAAT11CAACCGCGAT11TGGCTCCCT11CAAGACCCGCT11T11GAGAGAGAACT11ATGGYCEAAAGCT11AAGAGGAT11TGAAGAAT11CAAAACCG R N O V A K F N A D M A A L K T R L E R L E M A K T T E E F E E L K R 303
	901	AAGCTGACT11TCCGAT11TACCGAT11TGGAGAT11TGGCT11GAACT11GAGCCACT11GCTGCCAAACCT11GKAGTAAGCAAAAGT11AAGCT11GACT11TGGAGT K L T V R I T E L D M A E H E R T R A N N L E K T K V K L T L E I 337
	1001	CAAGGCT11TACGGCT11GAGAAGCGGGT11TGGCAGCAGAGAAT11TGGAGAGT11TACGCAT11GGGGCAGGAGGACAGAACT11TGGCAAT11GACT11GCGACGTC K D G L A E N E A L A A E N G E L T H R A N E A E N E A L Q R 370
	1101	GAATAGCAGAT11GACAGT11GAAAT11CAACACCCCTCACT11CGGGCAAGCGCCCT11TAGAGGGGCAACAAT11GCCCTCAAGGGCAGGT11CGGT11GACCTCAC R D E H T V E N T L S A N S A L E A D U M H R L G G V D L T 404
	1201	GACCGCAT11CGCAAT11T11CGACCCCGGAAACCGGCACT11TGGCAT11CACT11GAAGGACGCAAAAT11CACCCCT11GGT11GAT11GCAAT11CTGCAC11GACCCAT11T D R I A N L R D A R N R O L G D O L K E T K S A L R D A N R R L T D L 438
	1301	GGAGGCGCT11GCGAGT11CAGT11TGGAGGACAGCGGT11GACAACCT11CGCCCT11TCTCT11CCTGAT11GCTGAGGAGGCACT11GAAGGAGAT11GGAAGCGAAGT11ACGTTG E A L R S Q L D L A S A L H D A E E A L K H E M A K Y V 471
	1401	CCTCGACGAGCCGCT11TAACTCACT11CAAGTCCGAGAT11TGGAAACAACGCT11TGCCT11GAGAAGGACGAGCAACT11GGAGAT11TGGAGAAGAGCAGCCAGCCAGC A S Q N A L N H L K S E M E O R L R E K D E E L E N L R K S T R T 505
	1501	ATTGAGGAGT11GACAAACCACT11CTCAGAGAT11GAGGTT11CGCT11CAAGT11CGGAT11TGT11CTCGT11TGAAGAAGAACT11ACGAGGCGCAAT11CAGCGGACT11TGA J E L T T T I S H E V R F K S D M S R L X K K Y E A T I S E L E 539
TPmyX7	1601	GTGTCAGCT11GACAGT11GGCGAAGCT11CACT11CAGCCGCAAGT11GCAACCCGCAAGCAACCT11GCT11GAGGAGT11CAAGCGT11GACGGT11GAGGAGC V Q I D V A N K A N V H N R E N K T L L Q R V Q E Q G A L E D 572
TPmyX6	1701	AGCAGGAGCT11CGGAAAGCT11GACAGAGAACT11TGGAGT11GAGCGAGGCAACCACT11CGCCCT11TCT11CGGAAGT11GGAAGAGAT11TCCGACCCCACT11GGA E R R A E A E S N L Q V S E R K R I A L A S E V E E I R S Q L E 606
	1801	CTCAGT11GACCGCGCT11GCAAGAAGCGCGAGT11CCGAACT11CAAGCAT11GCAAGT11TCCGAGCT11CACCTAT11CGGT11CAACACT11TACCAAT11GACAA L S D R A R K N A E S E L N D A N G R I S E L T L S S V N T L T G A N D K 640
	1901	ACGTCCACT11GAAGCGGAT11TGGCGT11CATGAGGCGGAT11CTGAT11GAGCCGCTCAAT11GCGCGAAGGCT11GCTGAGGAT11GAGCT11GACCGT11TGAAGCGT R R L E G D I G V M Q G D L D E A V N A R K A A E D R A D R L N A 673
	2001	AGGTACT11CGCCCT11GGCT11GAGT11GCGACAGGAAAGAAAT11TCAAGCGT11GCTGAGACT11TGGCGAAGCAACT11GAGAT11TCCGAT11CCGT11GAGAT11CAGC E V I R L A D E I R Q E E N Y K R A E T L R K Q L E I E I R E I T 707
	2101	GTCAGT11TGAGGAGCGT11GAGGTT11TCCGCT11CTGAGGTCGCGGAT11TGGTCAAAAGCT11CAGAACT11CGGT11GAGGAGGCT11TGAAGGCGGAC11TGAGCGG V K L E E A E A F A T R E G R R H V Q K L Q N R V R L E A D V D G 741
	2201	AGAAAT11TGT11CGCCCAAGGAGGCT11CCCAACCGCGCAAAAT11ACGACCGTCAAT11TCAAGAACT11AGACACAGAGCGAGGAT11GATAAACCCATGATTT E I R R A K A N K Y E R Q F K E L O T Q S E D D K R M I 774
	2301	TGGAGCT11CAAGACCT11GTACAGCAACT11GAT11CAAGT11GAAAGCT11CAAAACGTCAGCT11GAGGACAGGAAAGGTT11TCTCAGCT11GACGAT11GACCAAG L E L Q D L L D K T Q I K M A Y K R O L E E O E E V S L T M S K 808
	2401	TACCGTAAGGCGCAGCAACAGAT11TGGAGGCGGCAACT11CTGCT11GACAT11GCGCGAGAGGACGAT11CACCAT11AAGAGGCAAAAT11TGGTGAACCGGTTCCCG Y R K A Q Q I E E A E H R A D M A E R T I T I K R T I G G P G S R 842
TPmyX2	2501	CCCGGTT11CGGT11TGGGAGAT11CAACAGT11TCCCGT11GTAACCGCT11GCAACAGCACT11TATGAT11GAT11CCT11CAAAAGGGCAGAACT11CGT11GACT11TTT A V S V R E I N S V S R G N R A T S I H - 863
	2601	TAGCCCTTATCC /APPROX. 0.85 kb

Figura 13. Secuencia nucleotídica y de aminoácidos de la región codificadora de la clona de cDNA de la paramosina de la *Taenia solium*. La secuencia subrayada corresponde a los oligonucleótidos sintéticos utilizados para obtener los tres fragmentos del gen de la paramosina y en el extremo izquierdo se encuentra su clave (ver Objetivos del proyecto). El codón de iniciación (ATG) y de terminación (TAG) se encuentran en negritas (tomada de Landa, 1993).

solium (TPmy), por lo que ambas denominaciones serán usadas indistintamente en la presente tesis.

En una publicación reciente de Kalinna y McMannus (Kalinna et al., 1993), se informa un receptor de Fc asociado a la superficie tegumental de la *T. crassiceps*. Este receptor muestra homología completa con el AgB. Este hallazgo es especialmente interesante ya que apoya la idea de una asociación del AgB con la superficie, además de que este hallazgo puede ser explicado en base a una unión con el Clq. Es decir que la función receptora de Fc podría estar mediada por un complejo AgB-Clq.

Nuestro grupo ha propuesto que las paramiosinas inhiben la producción de mediadores complementarios de inflamación en la interfase huésped-cisticerco, es decir que desempeñan un papel inmunomodulador de la respuesta del huésped (Laclette et al., 1989; 1992). El cisticerco puede evitar el reclutamiento de células hacia la interfase para disminuir la confrontación con su huésped humano o porcino. Por lo anterior, la TPmy se ha convertido en un candidato para el desarrollo de una vacuna en contra de la cisticercosis.

Cabe mencionar que la paramiosina es también candidato para el desarrollo de una vacuna contra infecciones helmínticas tales como esquistosomiasis (Pearce et al., 1986; Pearce et al., 1988; Flanigan et al., 1989) y filariasis (Nanduri et al., 1989).

El papel inmunomodulador de la TPmy y su potencial como vacuna no son los únicos atractivos para caracterizar su interacción con Clq. Una proteína que se une al Clq e inhibe la

cascada del complemento tiene también potencial biotecnológico. Por un lado cabe la posibilidad de aprovechar sus propiedades anti-inflamatorias, en caso de que la actividad inhibitoria de C1q resida en un péptido pequeño de la molécula. Por el otro lado, la TPmy podría ser utilizada para el atrapamiento de complejos inmunes en soportes sólidos, en el desarrollo de pruebas inmunológicas diagnósticas de enfermedades por complejos inmunes, tales como enfermedades autoinmunes y varias enfermedades parasitarias.

Para caracterizar la interacción de la paramiosina con la colágena y el C1q a nivel submolecular, hemos preparado una primera serie de construcciones plasmídicas para la expresión recombinante de diferentes fragmentos de paramiosina, así como de la molécula completa. Cada uno de los fragmentos recombinantes ha sido expresado, purificado en cantidad suficiente (del orden de los miligramos) y probado en experimentos de unión a colágena y C1q así como de inhibición del complemento. Cabe hacer notar que esta estrategia es posible gracias a que disponemos de clones de cDNA, conteniendo la secuencia codificadora completa de TPmy (Landa et al., 1993).

Desde los primeros ensayos se determinó que la interacción con C1q se lleva a cabo a través del extremo amino-terminal de la paramiosina. Esto nos llevó a realizar cinco series más de construcciones de expresión, que han permitido localizar el sitio

de unión con Clq en fragmentos peptídicos cada vez menores, siempre asociado al extremo amino del AgB. El número total de construcciones de expresión exitosas obtenidas para el gen de TPmy durante el año pasado se aproxima a 30. Se ha logrado expresar TPmy en cantidades preparativas incluso en sistemas eucarióticos glicosilantes. En la actualidad se tiene una idea razonable de la región de la TPmy que se une al Clq y este proyecto del grupo se encuPntra en una situación investigativa especialmente interesante.

El presente proyecto de tesis fue concebido para contribuir a la información acerca del papel de la TPmy en la relación huésped-cisticerco. En concreto, se pretendía averiguar si existen regiones de la molécula de la paramiosina que sean reconocidas preferentemente por los anticuerpos anti-TPmy en pacientes humanos cisticercosos. Consideramos que se trata de una pregunta especialmente interesante ya que la paramiosina es una proteína filamentosamente estructuralmente homogénea. Es decir que en caso de encontrarse una distribución epitópica no homogénea, posiblemente se deba a características en las secuencia de aminoácidos, mas que a características estructurales de la molécula. Además, puesto que el sitio de unión con Clq se localiza en el extremo amino terminal de la TPmy, pretendemos responder la pregunta de si cabría esperar un bloqueo del sitio activo de la TPmy por los anticuerpos del huésped. Al respecto,

recientemente se ha caracterizado isotípicamente la antigenicidad de la paramiosina de *Dirofilaria immitis* con suero de individuos infectados con *Onchocerca volvulus*. En este estudio se encontró que el extremo amino terminal de la proteína es reconocido preferencialmente (Steel et al., 1990).

12. Objetivos del Proyecto:

El objetivo final del presente proyecto de tesis de licenciatura es el de determinar la distribución de los epítomos de la paramiosina reconocidos por anticuerpos en sueros humanos.

Este objetivo se pretende alcanzar probando el reconocimiento de distintos fragmentos recombinantes de la TPmy. Para ello se producirán construcciones de expresión que permitan obtener fragmentos recombinantes de la TPmy. En estas construcciones, la molécula de la TPmy se pretende expresar en su longitud total o dividida en tres tercios (ver Figura 14). Los objetivos parciales del proyecto serán:

1. Desarrollo de las construcciones de expresión.
2. Confirmar por secuenciación, que las construcciones contienen los insertos esperados,
3. Expresión y purificación parcial de cada uno de los fragmentos recombinantes hasta producir cantidades del orden de los miligramos.
4. Tamizaje de sueros humanos obtenidos en una zona endémica para cisticercosis, hasta obtener un número grande (mayor de 25) de sueros con anticuerpos anti-TPmy.
5. Probar el reconocimiento de los sueros hacia cada uno de los tres fragmentos recombinantes purificados.

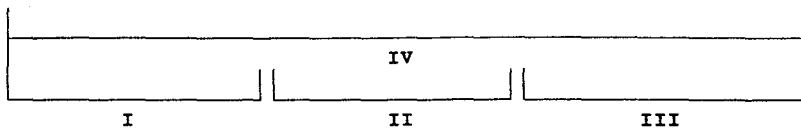


Figura 14. Fragmentos de TPmy que serán expresados en un sistema bacteriano para probar por Western blot el reconocimiento de anticuerpos en sueros de pacientes cisticercosos. Los fragmentos I, II y III equivalen a un tercio de la longitud total de TPmy (fragmento IV).

III. Materiales y Métodos

1. Materiales

Cisticercos. Los cisticercos fueron disecados de músculo esquelético de cerdos naturalmente infectados. Los cisticercos siempre fueron obtenidos durante las primeras cinco horas después del sacrificio de los cerdos. Las larvas fueron lavadas tres veces en PBS (NaCl 0.15 M, $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 0.01 M, pH 7.4) y congeladas a -70°C hasta su uso.

Sueros humanos. Los sueros humanos utilizados en el presente trabajo de tesis fueron amablemente provistos por L. Arcos, los cuales fueron obtenidos en poblaciones rurales de Michoacán, en las que se ha detectado una transmisión activa de la *T. solium*. Únicamente se utilizaron sueros positivos hacia fluido vesicular de *Taenia crassiceps*, cepa ORF, obtenido por ultracentrifugación en un ensayo inmunoenzimático (ELISA).

Cuatro sueros de individuos con tuberculosis fueron donados generosamente por la técnico M. Elinos y cuatro de individuos con amibiasis invasiva por el estudiante de maestría J. C. Sánchez.

Bacterias. Las bacterias utilizadas fueron de la especie *Escherichia coli*, pertenecientes a las cepa JM109. Estas células son: *recA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96 relA1 thi Δ(lac-proAB)*

F' [traD36, proAB', lacI', lacZΔM15] (ver Apéndice A). Esta cepa que no recombina, puede propagar vectores que llevan mutaciones ambar, y puede modificar, pero no cortar el DNA transfectado.

Oligonucleótidos sintéticos. Los oligonucleótidos utilizados para el desarrollo de las construcciones de expresión y para la confirmación de las mismas fueron sintetizados ex-profeso en un sintetizador automático Applied Biosystems Inc. Los oligonucleótidos para las construcciones de expresión se encuentran en la Tabla 2.

CLAVE	SECUENCIA
Tpmy X1	GG <u>GAA TTC</u> GCT AGC AAT ATG TCT GAA TCA CAC GTC
Tpmy X2	GGG <u>AAG CTT</u> GCT AGC TAC ATG ATG CTG GTT GC
Tpmy X4	GG <u>GAA TTC</u> CTG CGC AAC CAA GTT GC
Tpmy X5	GG <u>GAA TTC</u> CTC AAC CGC GAG AAC A
Tpmy X6	GG <u>GAA GCT TAA</u> TTT CCG GCT GCC TCG
Tpmy X7	GG <u>GAA GCT TAG</u> TTG ACG TTC GCC TTG T

Tabla 2. Oligonucleótidos sintetizados para las construcciones de expresión.

El subrayado en la secuencia de los oligonucleótidos muestra la posición de los sitios de restricción introducidos para facilitar la subclonación de los productos de PCR (ver sección Ligación de los los fragmentos de PCR en el vector pRSET).

Los oligonucleótidos sintéticos utilizados para la confirmación de las construcciones de expresión se encuentran en al Tabla 3.

CLAVE	SECUENCIA
pRSET HU	T CAT CAT GGT ATG GCT AGC
pRSET HUR	GCT AGT TAT TGC TCA GCG G

Tabla 3. Oligonucleótidos sintetizados para la confirmación de las construcciones de expresión.

2. Métodos

Marcaje radioactivo de los oligonucleótidos. Los oligonucleótidos se marcaron radioactivamente con [γ - 32 P] dATP usando polinucleótido cinasa del bacteriófago T4. La mezcla de reacción contenía 1 μ l del oligonucleótido por marcar a una concentración de 100 pmol/ μ l, 2.5 μ l de un amortiguador de 500 mM Tris-HCl, pH 7.6, 100 mM MgCl₂ y 50 mM ditioneitol (DTT), 7 μ l [γ - 32 P] dATP

[(Amersham International plc) (3,000 Ci/mmol; 11.5 pmol)], 1 μ l (10 unidades) polinucleótido cinasa de T4. La mezcla se completa hasta 25 μ l con agua destilada (13.5 μ l) y la reacción se lleva a cabo a 37°C durante 30 min y se detiene llevándola a 95°C durante 5 min.

Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR). La amplificación de fragmentos de DNA conteniendo una parte o toda la secuencia codificadora del AgB se llevó a cabo por el método de la PCR. La mezcla de reacción en tubos de microcentrífuga de 500 μ l contenía 1 μ l (~5 ng) de DNA λ gt-10 de una clona que contiene la secuencia codificadora completa del AgB (Landa, 1992; Landa et al., 1993), 1 μ l de una solución de cada oligonucleótido en agua a una concentración de 100 pmoles/ μ l, 10 μ l de un amortiguador de 200 mM (NH₄)₂SO₄, 700 mM Tris pH 8.3, 20 mM MgCl₂, 0.1% albúmina sérica bovina (BSA) y 1% Tritón X-100 y 0.5 μ l de Taq polimerasa (2.5 unidades/ml). La mezcla se completa con agua destilada hasta 100 μ l de volumen total de reacción y se cubre con una capa de 75 μ l de aceite mineral. El programa utilizado para los ciclos térmicos de la reacción fue:

1. 2 min a 94°C,
2. 25 ciclos de 1 min a 50°C, 3 min a 72°C y 1 min a 94°C
3. un ciclo de 3 min a 50°C, y 10 min a 72°C.

Al final de los ciclos térmicos, la mezcla de reacción fue colectada cuidando de no tomar aceite mineral. Una muestra de 5

μ l se corría en un gel de agarosa en 0.9 M de Tris-borato, 1 mM de EDTA (TBE) y 0.5 μ g/ml de bromuro de etidio para analizar los productos de PCR. La mezcla de reacción era concentrada por precipitación etanólica y resuspendida en 5-10 μ l de agua destilada. La purificación de los fragmentos se llevó a cabo por electroforesis en gel de agarosa al 0.8 %, 40 mM de Tris-acetato, 1 mM de EDTA (TAE) y 0.5 μ g/ml de bromuro de etidio para recortar del gel la banda de interés. Para recortar las bandas de DNA en el gel, éstos se iluminan con luz ultravioleta.

Purificación de los fragmentos de DNA. A cada banda recortada se le agregan 500 μ l de una solución saturada de NaI (90.8 g/100 ml) con Na₂SO₄ (1.7 g/100 ml) y se incuba el tubo a 55°C hasta que se disuelve la agarosa. Se agregan 2 μ l de polvo de vidrio, se agita vigorosamente en vórtex y se conserva la mezcla a 4°C por una hora. Posteriormente, se centrifuga por 30 seg en microfuga y se descarta el sobrenadante. Nuevamente se agrega el NaI, se agita, se centrifuga y se descarta el sobrenadante. El DNA unido al polvo de vidrio se lava tres veces agregando 500 μ l de una solución que contiene 50% de etanol, 0.1 M de NaCl, 10 mM de Tris pH 7 y 1 mM de EDTA, centrifugando y descartando el sobrenadante. Finalmente, se seca el polvo de vidrio al vacío por 5 min, se resuspende en 20 μ l de 10 mM de Tris pH 7 y 1 mM de EDTA (TE) y se incuba al menos 30 min a 37°C para solubilizar el DNA.

Ligación de los fragmentos de DNA en el plásmido pRSET. Para la expresión recombinante del AgB, los fragmentos de DNA fueron digeridos con *Eco* RI y *Hind* III para exponer los sitios de restricción construidos en los oligonucleótidos sintéticos usados en la PCR (ver Tabla 2). Posteriormente fueron clonados en fase dentro del plásmido pRSET-B (ver Apéndice B) previamente digerido con *Eco* RI/*Hind* III. La reacción de ligación se llevó a cabo en una mezcla de reacción que contenía 1 μ l (10 ng) de pRSET, 3-8 μ l (3 ng del fragmento con la secuencia completa del AgB, ó 1 ng de los fragmentos de un tercio de la longitud) de los fragmentos de DNA, 10 μ l de amortiguador de ligasa (200 mM de Tris-HCl, pH 7.6, 20 mM de MgCl₂, 40 mM de DTT) y 0.1 μ l de ligasa del bacteriófago T4 (0.25 unidades), completado con agua destilada hasta 20 μ l de volumen total. Generalmente, la reacción se dejaba a 15°C durante 2-4 h y se detenía calentándola a 65°C durante 10 min.

Transformación bacteriana con las construcciones de expresión.

Una colonia de la cepa JM109, aislada en una caja de cultivo de medio mínimo M9, se crece durante toda la noche con agitación (175 rpm) en 50 ml de SOBMB (20 g bacto-triptona, 5 g extracto de levadura, 0.5 g de NaCl/l, adicionado con 10 mM MgCl₂ y 2.5 mM KCl). Medio mililitro del cultivo anterior se crece en durante 4-5 h en 50 ml de SOBMB hasta que el cultivo llega a una DO₆₀₀ = 0.5. Se mantiene el frasco del cultivo en hielo por 10 min. y se centrifugan a 3,000 g por 10 min a 4°C. La pastilla de células se resuspende en 2 ml de TFB (45 mM MnCl₂, 10 mM CaCl₂, 100 mM KCl,

10 mM ácido 2-[N-morfolino]etanofulfónico (MES) y 3 mM Cloruro de hexamina-cobalto) y se mantiene en hielo entre 30 min a 6 h.

Cien microlitros de bacterias en TFB (células competentes) se incuban en hielo durante 30 min en presencia de un pequeño volumen del plásmido transformante (10-100 ng). Posteriormente, las células competentes se someten a un choque térmico a 37-42°C durante 3 min. Se adicionan 900 μ l de SOBAM y se deja recuperar a las células transformadas durante 20 min a 37°C. Finalmente, se toman 50 μ l de células transformadas y se siembran en la superficie de una caja de Petri con medio sólido SOBAM que se marca como cultivo al 5%. Los restantes 950 ml de células transformadas son centrifugadas a 2,000 g durante 5 min y se descarta la mayor parte del sobrenadante (~900 μ l). La pastilla de células se resuspende en la pequeña cantidad de medio y se siembra en una caja de Petri como antes, marcándola como 95%. Ambas cajas se mantienen toda la noche o durante 12 h a 37°C. A la mañana siguiente, las únicas colonias que crecen en el medio con ampicilina son aquéllas que contengan el plásmido transformante (ver Apéndice B), es decir, las clonas recombinantes.

Purificación alcalina de plásmidos. Las clonas bacterianas transformadas con las construcciones de expresión se crecieron durante la noche en cultivos de 50 ml de SOBAM con 100 μ g/ml de ampicilina (SOBAM-amp). A la mañana siguiente el cultivo se centrifuga 3,000 g durante 10 min y la pastilla de células se

resuspende en 5 ml de Glucosa 50 mM, EDTA 10 mM y Tris 25 mM, pH 8 y se conserva en hielo por 10 min. Posteriormente se agregan 10 ml de una solución recién preparada de NaOH 0.2 mM y SDS 1% y se agita por inversión del tubo dos o tres veces. Se adicionan 7.5 ml de acetato de amonio 7.5 M y la mezcla se agita vigorosamente y se mantiene en hielo por 10 min. Posteriormente, se centrifuga a 1,500 g por 10 min a 4°C, se colecta el sobrenadante y se le agregan 15 ml de isopropanol dejándose de nuevo en hielo por 10 min. Se centrifuga a 1,500 g por 10 min, se decanta el sobrenadante y la pastilla se resuspende en 200 µl de TE. La solución anterior se incubó con RNAasa (concentración final de 100 µg/ml) a 37°C por 30 min para posteriormente extraerla primero con fenol y luego con cloroformo. Para lograr una mejor pureza del plásmido, la fracción era cromatografiada a través de sepharosa CL4B colectando fracciones de 6-7 gotas que se analizaron en geles de agarosa para determinar la(s) fracción(es) contenían el DNA plasmídico.

Confirmación de las construcciones de expresión por secuenciación con DNA polimerasa de Thermococcus litoralis (Vent-polimerasa). Las construcciones de expresión fueron verificadas secuenciando los extremos de los fragmentos insertados en el vector pRSET. La reacción de secuenciación con deoxi-dideoxinucleótidos y ciclos térmicos con Vent-polimerasa (New England Biolabs) está basada en una combinación entre la PCR (ver arriba) y el método de

terminación de cadena por dideoxinucleótidos de Sanger (Sanger et al., 1977).

En detalle, el primer paso se prepararon los tubos de reacción con deoxi(dXTP)-dideoxi (ddXTP)-nucleótidos. Para esto se usaron las mezclas de secuenciación para CircumVent (ver Tabla 4), se agregó 3 μ l de la mezcla "A" en el fondo de un tubo marcado con "A", y 3 μ l de las mezclas de "C", "G" y "T" en el fondo de tubos con las marcas correspondientes.

Tabla 4. Concentración (μ M) de deoxi/dideoxinucleótidos en las mezclas de secuenciación para CircumVent.

	Mezcla A	Mezcla C	Mezcla G	Mezcla T
ddATP	900	---	---	---
ddCTP	---	480	---	---
ddGTP	---	---	400	---
ddTTP	---	---	---	720
dATP	30	30	30	30
dCTP	100	37	100	100
dGTP	100	100	37	100
dTTP	100	100	100	33

En el segundo paso se combinó el templado con el oligonucléotido. Para esto se mezcló lo siguiente en un tubo de microcentrífuga:

- 1.- 0.05 pmoles de templado de doble cadena.
- 2.- 1.2 pmolas del oligonucleótido marcado.
- 3.- 1.5 μ l de amortiguador 10 x para CircumVent (100 mM KCl, 100 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 200 mM Tris-HCl, pH 8.8, y 50 mM MgSO_4)
- 4.- 1 μ l de la solución de Tritón X-100 al 3%

Finalmente, se agregó agua destilada hasta un volumen total de 14 μ l y se mezcló la solución pipeteando suavemente. El tercer paso fue la adición de la polimerasa y de los deoxi-dideoxi nucleótidos. Primero, se adicionaron 2 unidades de Vent (DNA) polimerasa al tubo conteniendo el templado, el oligonucleótido, el amortiguador, el Tritón X-100 y el agua, y se mezcló la solución pipeteando suavemente. Posteriormente, se distribuyeron 3.2 μ l de esta reacción al tubo marcado como "A" y se mezcla pipeteando suavemente. Se repitió la adición con los tubos "C", "G" y "T". Después, la reacción se cubrió con 100 μ l de aceite mineral estéril. Finalmente, se pusieron los tubos en la máquina de PCR y se comenzaron los ciclos térmicos. El programa usado fue: 22 ciclos de: 95°C , 1 min; 50°C, 1.5 min y 72°C ,1 min.

Por último, se terminó la reacción adicionando, a cada tubo por debajo de la capa de aceite mineral, 4 μ l de Formamida desionizada con, 0.3% de Cianol de Xileno FF, 0.3% de Azul de

bromofenol, 0.37% de EDTA, pH 7. Las reacciones se almacenaron a -20°C .

Producción de proteínas de fusión. Las clonas bacterianas transformadas conteniendo los vectores de expresión fueron crecidas en 50 ml de SOB_M-amp con agitación (175 rpm) a 37°C hasta que llegaron a una $\text{DO}_{600} = 0.3$ y se le agrega isopropiltio- β -D-galactósido (IPTG) a una concentración final de 1 mM (ver Apéndice B). Después una hora más de crecimiento en presencia del inductor gratuito IPTG se toma una alícuota de 1 ml como muestra, y se infectan las bacterias con el bacteriófago ayudador M13/T7 (a una dosis de 5 unidades formadoras de placas/bacteria) que aporta la polimerasa de T7 necesaria para la producción de transcritos de la proteína de fusión (ver Apéndice B). A partir de ese momento se toman alícuotas de 1 ml a las 2, 4 y 6 h, que se centrifugan durante 2 min y la pastilla de bacterias se resuspende en 200 μl de amortiguador de Laemmli y se analiza el nivel de inducción en SDS-PAGE comparando las alícuotas a los distintos tiempos con la inicial (antes de la infección con M13/T7).

Purificación de las proteínas de fusión. Las proteínas recombinantes expresadas en niveles elevados frecuentemente son tóxicos para la bacteria huésped. Un mecanismo común que utiliza la bacteria es el de insolubilizar las proteínas recombinantes en los llamados cuerpos de inclusión. Este hecho provee una ventaja

para la purificación de las proteínas recombinantes ya que se pueden eliminar los componentes bacterianos a base de tratamientos energéticos, para conservar únicamente los cuerpos de inclusión que pueden ser posteriormente solubilizados. La proteína recombinante es prácticamente el único constituyente de los cuerpos de inclusión, por lo que al aislarlos se obtiene la proteína recombinante en forma casi pura.

Los cuerpos de inclusión fueron purificados a partir de un cultivo de 100 ml de bacterias, transformadas con cada uno de las construcciones de expresión, e inducidas a expresar la proteína de fusión como se describió anteriormente. El cultivo se centrifuga a 4,000 g, durante 20 min y la pastilla bacteriana se resuspende en 5 ml de 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, con 20% sacarosa y se conserva a 4°C por 20 min. Las bacterias se centrifugan como antes y la pastilla se resuspende en 5 ml de agua bidestilada a 4°C, dejándose incubar por 10 min. La suspensión se centrifuga a 8,000 g durante 15 min y el sedimento se resuspende en 1 ml de PBS, pH 7.2, con 1 µg/ml leupeptina, 0.5 mM de fluoruro de fenilmetilsulfonil (PMSF) y 20 µg/ml de aprotinina. La suspensión es sonicada 3 veces en hielo con un sonicador de vástago, durante 30 seg a 50 W. Se agregan 130 unidades de RNAasa y 40 µg de DNAasa y se incuba a temperatura ambiente por 10 min. Se agregan 4 ml del amortiguador anterior y se centrifuga a 13,000 g durante 30 min. La pastilla se lava tres veces por resuspensión en 4 ml de PBS pH 7.2, con 25 % sacarosa y 1 % Tritón X-100, seguida por centrifugación a 25,000 g a 4°C durante 20 min. El precipitado se

resuspende en 1 ml de 50 mM Tris-HCl, pH 8, con 5 M de cloruro de guanidina y 0.65 M NaCl y se sonica 5 seg a 50 W y se mantiene la suspensión a 4°C por 60 min. Posteriormente, se diluye 1:1 con 50 mM Tris-HCl pH 8 y se dializa contra 10 mM de fosfatos, pH 7.2 (también se puede usar veronal o Tris) con 0.3 M NaCl y 10 mM EDTA. Al final de la diálisis la solución se clarifica por centrifugación a 25,000 g durante 30 min y se almacena el sobrenadante en alícuotas a -75 °C hasta su uso.

Purificación del AgB/TPmy natural. El procedimiento de purificación del AgB por afinidad a colágena fue descrito hace varios años (Laclette et al., 1989) y modificado recientemente (Laclette et al., 1992). En breve: un gramo de cisticercos recién descongelados son homogeneizados en 5 ml de un amortiguador de fosfatos 10 mM, pH 7.4, conteniendo NaCl 0.6 M, ácido etilendiamintetraacético (EDTA) 2.5 mM, p-hidroximercuribenzoato (PHMB) 0.04%, PMSF 0.006%, tosil lisina clorometil cetona (TLCK) 0.1mM y leupeptina 25 µg/ml en un homogeneizador Polytron (Brinkman Instruments Co.) a máxima potencia durante 1 min en hielo. El homogenado es centrifugado a 100,000 g por 60 min a 4°C y el sobrenadante se diluye 1:1 con amortiguador de fosfatos conteniendo todo lo que se describe arriba excepto NaCl. Esto quiere decir que la concentración de NaCl se reduce a 0.3 M. El extracto se incuba entonces con un gramo de colágena polimérica Tipo I de tendón bovino, durante 60 min a 4°C con agitación lenta. Posteriormente, la colágena es lavada tres veces con el

mismo amortiguador (con una concentración de 0.3 M de NaCl), y el material unido a la colágena se eluye con el mismo buffer conteniendo 0.5 M de NaCl y se concentra aproximadamente 10 veces en una cámara de Amicon usando una membrana que retiene moléculas mayores a 30 kDa (PM30, Amicon). Finalmente, se dializa la proteína contra amortiguador de fosfatos 0.3 M de NaCl, se determina su concentración por el método de Lowry y se mantiene en alícuotas a -75°C hasta su uso.

Métodos Misceláneos. La electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) se realizó siguiendo la descripción de Laemmli (Laemmli et al., 1979). Las bandas se visualizaron tiñéndolas con Amido Negro. Los pesos moleculares de las bandas se calcularon por comparación con proteínas estándares (BioRad). Los Western blot se realizaron siguiendo el método de Towbin (Towbin et al., 1979). Se usaron cantidades equimolares de cada una de las proteínas recombinantes; en el caso de la proteína completa se colocaron 150 μg /pozo y en el caso de los fragmentos de un tercio de la longitud del AgB, se aplicaron 50 μg /pozo. Los sueros humanos fueron incubados con las tiras de nitrocelulosa durante 60 min a temperatura ambiente y a una dilución de 1:500. Como segundo anticuerpo se utilizó un anticuerpo de conejo anti-IgG humana acoplado a peroxidasa.

IV. Resultados

1. Construcciones de Expresión

Obtención de las construcciones de expresión. Se sintetizaron ocho oligonucleótidos diseñados a partir de la secuencia ya conocida (Landa et al., 1993) del AgB (ver Tabla 2 en el capítulo de Materiales y Métodos). Estos oligonucleótidos fueron diseñados para iniciar la amplificación por PCR, de tres fragmentos del gen de la paramiosina así como de la secuencia completa (ver Figura 14 en el capítulo de Introducción).

Para la construcción de expresión de la secuencia completa de la TPmy, se utilizaron los oligonucleótidos Tpmy-X1 y Tpmy-X2. Para la expresión del fragmento amino-terminal se usaron los oligonucleótidos Tpmy-X1 y Tpmy-X6; para el fragmento central, Tpmy-X4 y Tpmy-X7 y para el carboxilo-terminal, Tpmy-X5 y Tpmy-X2 (ver Tabla 2 en el capítulo de Materiales y Métodos). La proteína completa está codificada entre la base 1 y la base 2592, es decir que está formada por 864 aminoácidos. El fragmento amino-terminal está contenido entre la base 1 a la 804, es decir que codifica para 268 aminoácidos. El fragmento medio comprende de la 804 a la 1654 (850 pb) y codifica para 268 aminoácidos. El carboxilo-terminal contiene de la 1654 a la 2592 (938 pb) y codifica para 312 aminoácidos. Nótese que los oligonucleótidos que inician en el extremo 5' tienen incluido un sitio de restricción Eco RI

(subrayado en la Tabla 2), mientras que los usados para iniciar en los extremos 3' de los fragmentos poseen un sitio de *Hind* III, para conseguir la orientación correcta. Para mantener el marco de lectura apropiado entre el extremo 5' de la secuencia de fusión y el fragmento de DNA ligado se utilizó la versión B de pRSET (ver Apéndice B y Figura 15). Como se muestra en la figura 16, en todos los casos, el producto de PCR mostraba un tamaño de acuerdo con el esperado a partir de la secuencia de nucleótidos.

Confirmación de las Construcciones de expresión.

Las construcciones para la expresión de los diferentes proteínas recombinantes fueron realizadas por ligación de cada uno de los fragmentos de DNA obtenidos por PCR con una cantidad equimolecular de pRSET previamente cortado con *Eco* RI y *Hind* III. Se transformaron bacterias de la cepa JM109 siguiendo métodos convencionales y se seleccionaron las células transformantes, que contienen plásmido, por su fenotipo de resistencia a ampicilina (ver Apéndice B). La construcción que contiene el tercio amino-terminal se denominó VW 2-1, el tercio central se denominó VW 3-3 y el carboxilo-terminal VW 4-1. La construcción conteniendo la secuencia codificadora completa del AgB se denominó como VW 7-3.

Antes de intentar las inducciones de expresión, se decidió confirmar las construcciones por secuenciación de las regiones de ligación. La secuenciación se realizó sobre los plásmidos recombinantes obtenidos de una purificación alcalina usando Vent polimerasa (New England Biolabs Inc.). Como iniciadores se

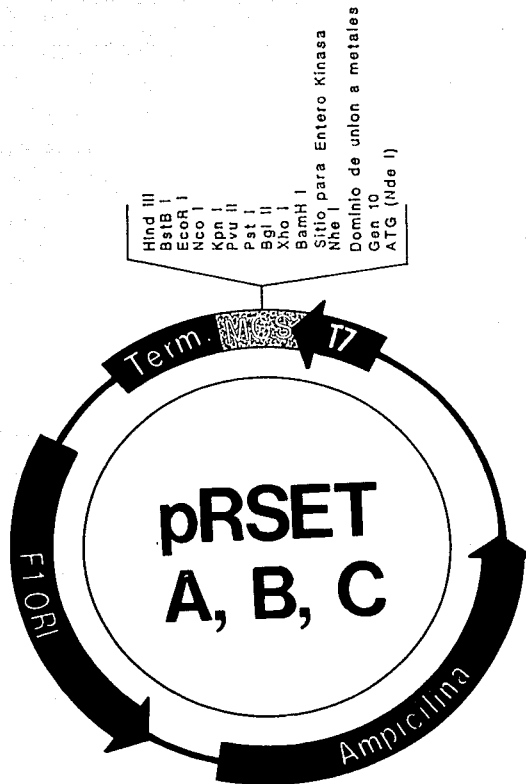


Figura 15. Representación esquemática del vector utilizado en las construcciones para la expresión de los péptidos recombinantes del AgB. Los fragmentos de DNA fueron insertados en los sitios EcoRI/HindIII. Para mayor detalle sobre el vector consultar el Apéndice B.

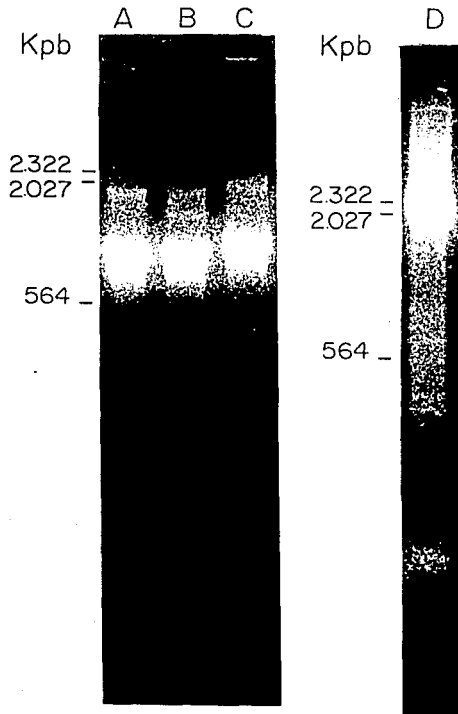


Figura 16. Electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos de DNA amplificados por PCR, para expresar los péptidos del AgB. La amplificación por PCR se realizó utilizando oligonucleótidos sintéticos diseñados a partir de la secuencia nucleotídica del AgB (Landa 1992). A: VW 2-1, B: VW 3-3, C: VW 4-1 y D: VW 7-3.

utilizaron dos oligonucleótidos sintéticos (TPmy HU y TPmy HUR) diseñados de acuerdo a la secuencia de pRSET, para unirse 60-110 nucleótidos por arriba del sitio de clonación. La mezcla de reacción contenía dideoxinucleótidos para promover la terminación de las cadenas, y los ciclos térmicos permiten por un lado secuenciar sobre un templado de doble cadena y por el otro, amplifican el fragmento de DNA entre los oligonucleótidos iniciadores. La figura 17 muestra que tanto la construcción para expresar al AgB completo como las que expresan los péptidos amino-terminal, central y carboxilo-terminal, poseen la secuencia esperada.

2. Expresión de las proteínas recombinantes

Las pruebas iniciales de inducción de las construcciones de expresión se llevaron a cabo para determinar el tiempo en el cual se alcanza la máxima expresión de cada una de las proteínas recombinantes. Para ello se crecieron las colonias de las bacterias transformadas con cada construcción de expresión (VW 2-1, VW 3-3, VW 4-1 y VW 7-3) en 5 ml de medio SOBm con ampicilina y se les agregó IPTG y el bacteriófago ayudador M13/T7, para inducir la expresión de la polimerasa T7, que a su vez transcribe las secuencias de las proteínas recombinantes. Paralelamente se crecieron bacterias sin transformar para utilizarlas como control negativo de inducción. A partir de la adición del bacteriófago se

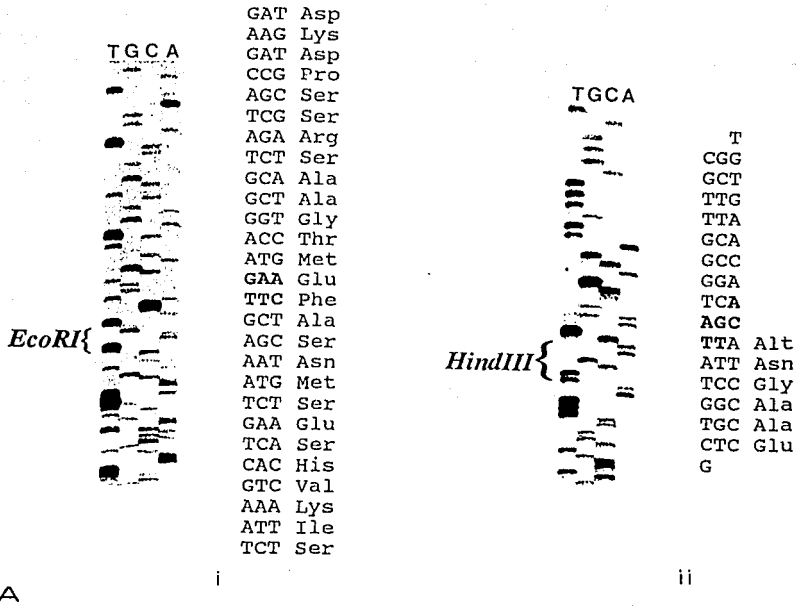
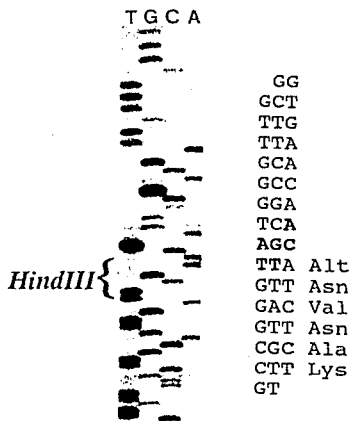
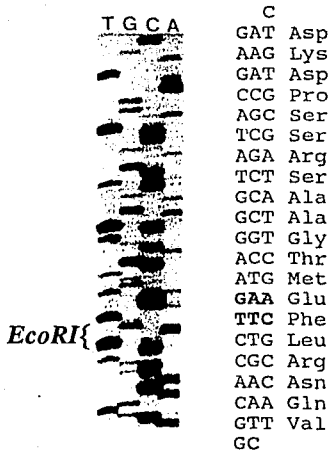
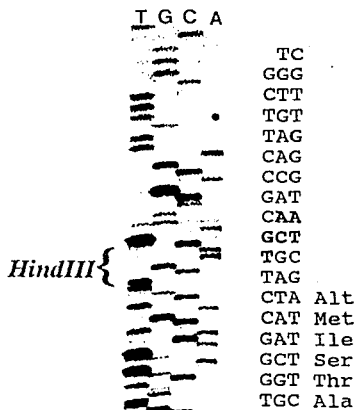
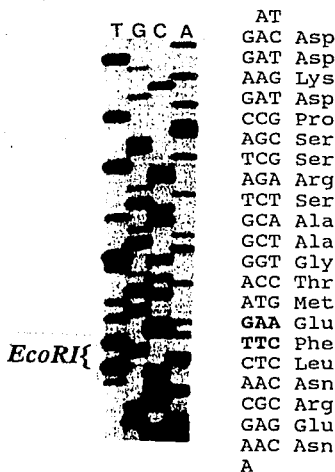


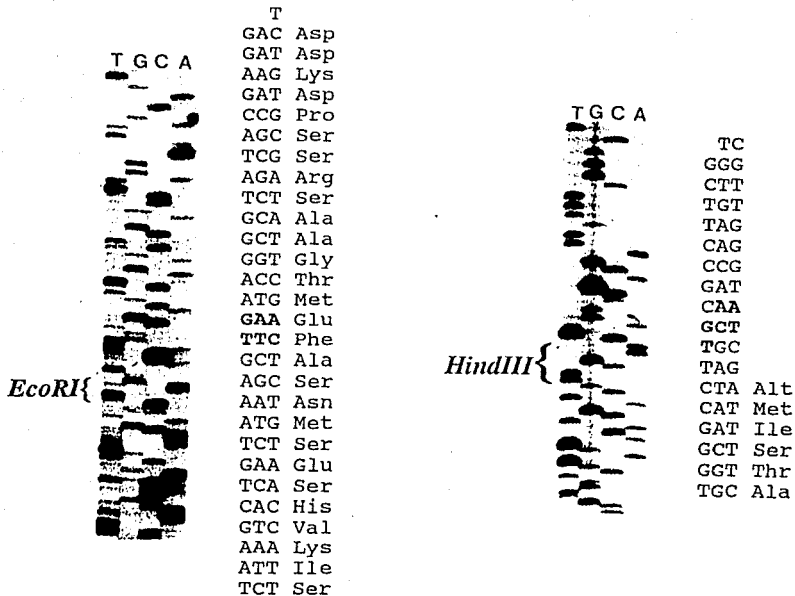
Figura 17. Confirmación de las construcciones de expresión. La confirmación en de todas las construcciones se llevó a cabo por secuenciación mediante PCR de las regiones de ligación dentro del vector. La enzima utilizada en la PCR fue la Vent-polimerasa. El aminoácido codificado por cada triplete se encuentra escrito al lado derecho. A: fragmento VW 2-1, i: extremo 5', ii: extremo 3' (en todas las direcciones 3'-5' la secuencia de aminoácidos esta basada en la secuencia complementaria reversa); B: fragmento VW 3-3, i: extremo 5', ii: extremo 3'; C: fragmento VW 4-1, i: extremo 5', ii: extremo 3'; D: proteína recombinante completa VW 7-3, i: extremo 5', ii: extremo 3'.



B



C



D

tomaron alícuotas de la inducción cada dos horas para analizarlas por SDS-PAGE. Como se muestra en la figura 18 el patrón de bandas de las bacterias transformadas y sin transformar en el tiempo cero es muy similar. En cambio, a las dos horas las clonas bacterianas transformadas presentan una banda intensa con un peso molecular aparente que es consistente con el esperado de cada una de los péptidos recombinantes.

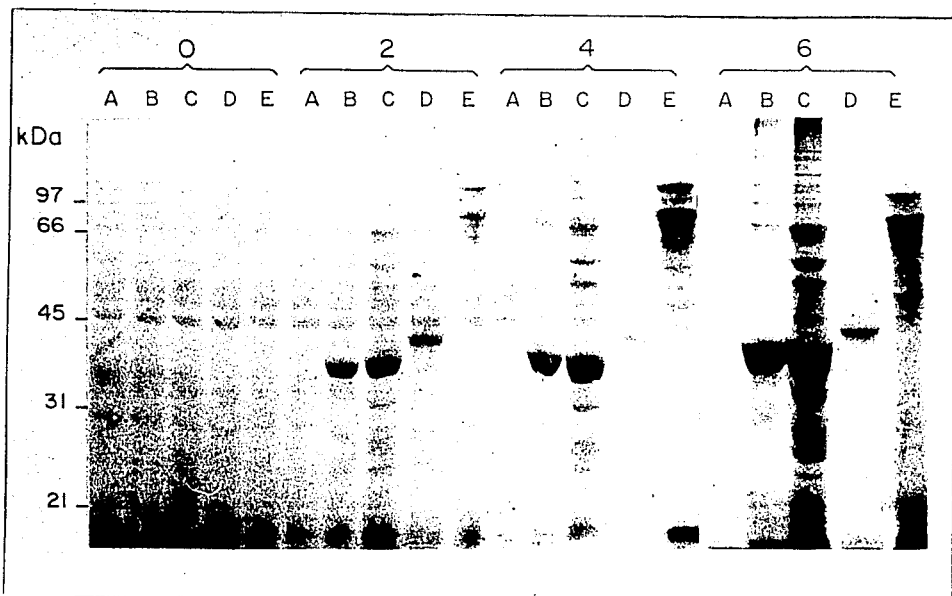


Figura 18. Expresión de las péptidos recombinantes en distintos tiempos después de la inducción de la expresión. A: bacterias sin transformar, B: bacterias transformadas con VW 2-1, C: transformadas con VW 3-3, D: transformadas con VW 4-1 y E: transformadas con VW 7-3. El número que se encuentra arriba de cada serie de columnas indica el tiempo en horas después del inicio de la inducción; el tiempo cero corresponde al momento en el que se agregó el bacteriófago M13/T7 y el IPTG (ver mayores detalles en Materiales y Métodos).

El tiempo en que se alcanza la máxima expresión fue de 4 h para las clonas VW 2-1 y VW 3-3, y de 6 h para las clonas VW 4-1 y VW 7-3.

3. Purificación de las proteínas recombinantes

Las clonas que expresaron proteína inducible en altos niveles fueron utilizadas para la purificación de los péptidos recombinantes de AgB. Después de unas pruebas iniciales se encontró que la mayor parte de la proteína recombinante se encontraba en los llamados cuerpos de inclusión de las bacterias; esto es común tratándose de proteínas ajenas expresadas en altos niveles por las bacterias. Consecuentemente, se purificaron los cuerpos de inclusión bacterianos lisando las células con un choque hipotónico y con sonicación. Los cuerpos de inclusión se lavan varias veces para deshacerse de los debris celulares con una solución que contiene Tritón X-100. Finalmente, los cuerpos de inclusión se solubilizan con cloruro de guanidina en un amortiguador que contiene una concentración 0.65 M de NaCl. La alta concentración de sal es indispensable ya que el AgB es una proteína extremadamente polar. Como último paso, la proteína solubilizada se dializa contra PBS, 0.3 M NaCl y se concentra en amicon para ser cuantificada por Lowry y analizada en SDS-PAGE. La figura 19 muestra los geles de las fracciones enriquecidas con cada una de las proteínas de fusión. En todos los casos se

consideró que el enriquecimiento en el péptido de interés era suficiente para usarlo en los ensayos de Western blot con los sueros humanos. Cabe mencionar que el rendimiento de todas las proteínas recombinantes fue del orden de los miligramos alcanzándose un máximo de 8 mg/100 ml de cultivo.

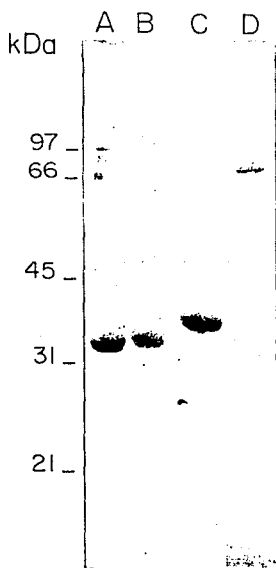
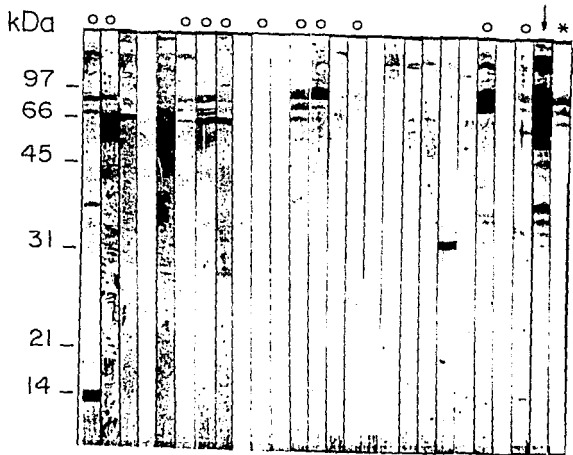
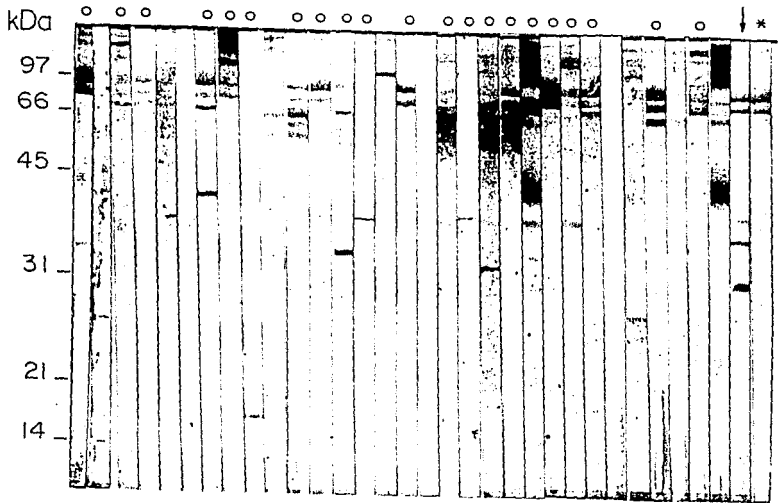


Figura 19. Purificación de los péptidos recombinantes del AgB. Los carriles contienen muestras semipuras de los péptidos recombinantes corridos en gels de poliacrilamida con SDS. A: fragmento recombinante VW 2-1, B: fragmento recombinante VW 3-3, C: fragmento recombinante VW 4-1 y D: proteína recombinante completa VW 7-3.

4. Selección de los sueros positivos al AgB

Los sueros humanos que se usaron para determinar la distribución de epítopes del AgB fueron seleccionados entre sueros previamente identificados como positivos a un extracto crudo de cisticercos (ver sección III.1.). Para ello, el AgB fue purificado a partir de un extracto crudo de cisticercos por un método de afinidad hacia colágena. Inicialmente se intentó determinar la positividad o negatividad de los sueros humanos colectados en áreas endémicas mediante pruebas de ELISA, sin embargo, se encontró que no era fácil discernirlos por lo que se decidió realizar pruebas de Western blot para considerar únicamente la positividad hacia la banda del AgB. Para ello, la fracción enriquecida en AgB fue corrida en un gel de poliacrilamida con SDS con un solo pozo y transferida a una hoja

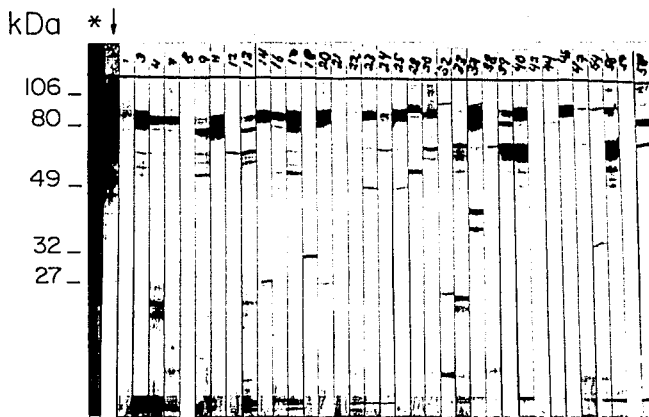
Figura 20. Detección de los sueros positivos hacia el AgB por Western blot. Las tiras con AgB purificado de cisticercos se incubaron con sueros humanos previamente determinados como positivos por un ensayo inmunoenzimático (ELISA), que utiliza un extracto crudo de antígenos del cisticerco. Hacia el extremo derecho se muestra un carril del AgB teñido con amido negro marcado con un asterisco, el carril marcado con una flecha es un control positivo y muestra el reconocimiento del AgB por un suero hiperinmune de conejo anti-AgB. Los círculos indican que sueros fueron considerados como positivos.



de papel de nitrocelulosa. Se recortó la hoja en tiras y se pusieron a incubar las tiras con cada uno de los 50 sueros anticisticercos diluidos 1:500 (Figura 20). Al final de ambas pruebas, un total de 32 sueros resultaron claramente positivos hacia el AgB. Otros sueros reconocían débilmente al AgB; finalmente sólo 7 sueros resultaron totalmente negativos. A pesar de las dificultades con las pruebas de ELISA mencionadas arriba, en ningún caso esta prueba detectó como positivo algún suero que se hubiera encontrado negativo por Western blot.

5. Distribución de epítopes reconocidos por anticuerpos humanos en las proteínas recombinantes

Una vez seleccionados los sueros positivos hacia el AgB de *T. solium*, se usaron para determinar si los anticuerpos en los sueros reconocen preferencialmente alguno de los fragmentos recombinantes. Inicialmente se hicieron ensayos de Western blot para ver si el AgB recombinante de longitud total era reconocido por los anticuerpos anti-AgB. Como era de esperar, la proteína recombinante completa fue reconocida tanto como la proteína natural (Figura 21). Además de la proteína recombinante los sueros reconocieron otras proteínas de la bacteria presentes en la fracción de los cuerpos de inclusión. Ésta es una observación común cuando se trabaja con proteínas recombinantes producidas en bacterias, ya que el ser humano mantiene niveles altos de



VW 7-3

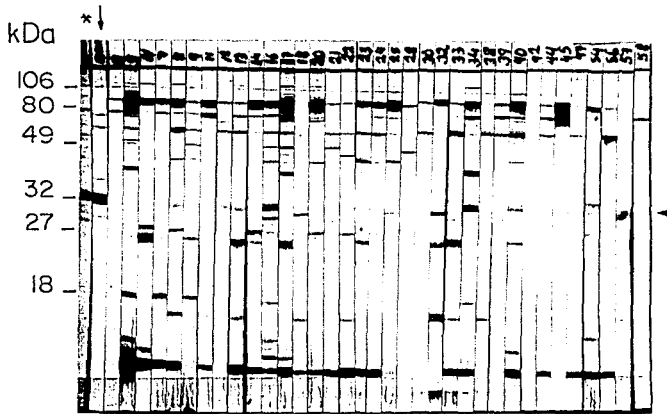
Figura 21. Detección de los sueros positivos hacia la proteína recombinante VW 7-3 por Western blot. Las tiras con la proteína recombinante VW 7-3 semipura se incubaron con los sueros humanos positivos al AgB previamente determinados como positivos por un Western blot, que utiliza el AgB. Hacia el extremo izquierdo se muestra un carril de la proteína VW 7-3 teñido con amido negro marcado con un asterisco y la flecha lateral señala la banda que corresponde a la proteína recombinante, el carril marcado con la flecha es un control positivo y muestra el reconocimiento de la proteína recombinante por un suero hiperinmune de conejo anti-AgB.

anticuerpos anti-bacterianos. Sin embargo, la posición del AgB puede ser fácilmente identificada por su peso molecular, teniendo una de las tiras de nitrocelulosa con Amido Negro, y puesto que se trata de la proteína más abundante en la fracción.

A continuación se realizaron ensayos similares de Western blot utilizando los fragmentos recombinantes amino-terminal (VW 2-1), central (VW 3-3) y carboxilo-terminal (VW 4-1). El fragmento VW 4-1 resultó ser el más frecuentemente reconocido por los sueros humanos positivos al AgB . El reconocimiento hacia los otros fragmentos recombinantes parece ser notablemente más bajo (Figura 22).

También se realizaron ensayos de Western blot de los fragmentos recombinantes con los sueros que en la selección inicial habían resultado negativos o levemente positivos (Figura 24). Ningún suero se convirtió en claramente positivo hacia alguno de los fragmentos del AgB. Además, el reconocimiento de los tres fragmentos recombinantes resultó muy débil y posiblemente similar, a diferencia del reconocimiento de los sueros positivos que resultó fuertemente dirigido hacia el fragmento VW 4-1.

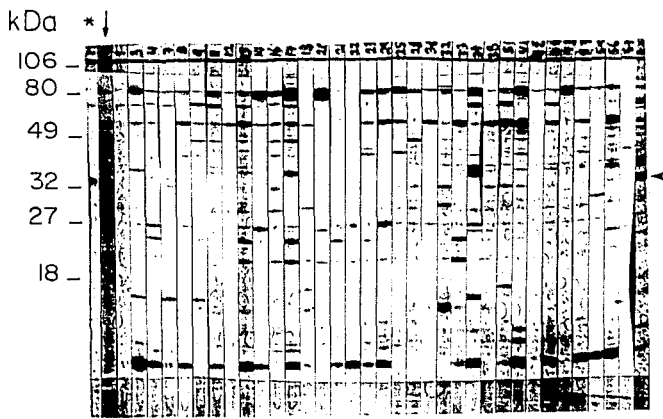
Se estudió también el reconocimiento de los fragmentos recombinantes por sueros de pacientes con otras enfermedades infecciosas. Se usaron cuatro sueros de pacientes con tuberculosis y cuatro de pacientes con amibiasis. Algunos resultaron positivos; por ejemplo, el paciente tuberculoso T1 resultó ser muy positivo al fragmento central (VW 3-3) mientras



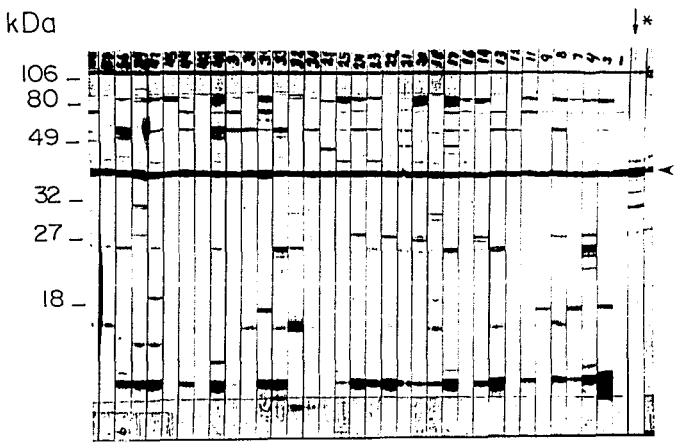
A

VW 2-1

Figura 22. Detección de los sueros positivos hacia las proteínas recombinantes por Western blot. Las tiras con cada una de las proteínas recombinantes semipuras se incubaron con los sueros humanos positivos al AgB previamente determinados como positivos por un Western blot, que utiliza el AgB. Se muestra marcado con un asterisco un carril de la proteína teñido con amido negro y la flecha lateral señala la banda que corresponde a la proteína recombinante, el carril marcado con la flecha es un control positivo y muestra el reconocimiento de la proteína recombinante por un suero hiperinmune de conejo anti-AgB. A: fragmento VW 2-1, B: fragmento VW 3-3 y C: fragmento VW 4-1.



B VW 3-3



C VW 4-1

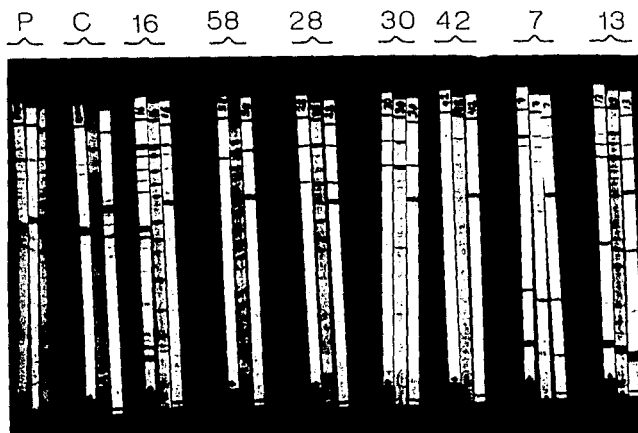


Figura 23. Composición de tiras que resume la respuesta de los sueros hacia cada fragmento recombinante. En cada conjunto de tres tiras la del extremo izquierdo siempre es el fragmento amino-terminal, la del centro es el fragmento central y la del extremo derecho, el carboxilo-terminal. P: Tiras teñidas con amido negro, C: control positivo que muestra el reconocimiento de cada uno de los tres fragmentos recombinantes por un suero hiperinmune de conejo anti-AgB. El número superior de cada grupo indica el suero que se usó.

que el paciente T3 resultó moderadamente positivo hacia el fragmento amino-terminal (VW 2-1). El paciente amibiásico B resultó claramente positivo hacia el fragmento amino-terminal (VW 2-1) y el paciente A resultó positivo hacia el carboxilo-terminal (VW 4-1). Sin embargo, no se observó ninguna tendencia clara de reconocimiento hacia alguno de los fragmentos recombinantes (Figura 25).

También se realizaron pruebas de especificidad de reacción de reconocimiento incubando cada uno de los fragmentos recombinantes sólo con el anticuerpo conjugado a peroxidasa a concentraciones 20 veces mayores que la usada en los ensayos ordinarios (Figura 26).



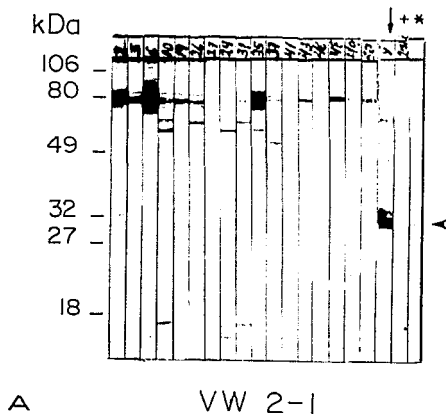
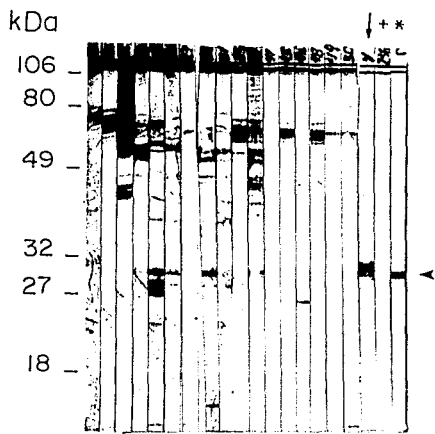
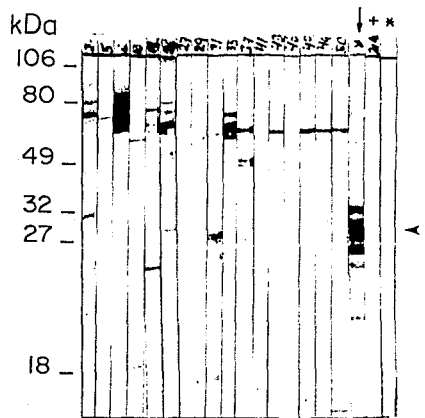


Figura 24. Confirmación de los sueros negativos hacia las proteínas recombinantes por Western blot. Las tiras con cada una de las proteínas recombinantes semipuras se incubaron con los sueros humanos negativos al AgB previamente determinados como negativos por un Western blot, que utiliza el AgB. Se muestra marcado con un asterisco un carril de la proteína teñido con amido negro y la flecha lateral señala la banda que corresponde a la proteína recombinante, el carril marcado con una cruz fue incubado solamente con el anticuerpo conjugado a peroxidasa diluido 1:2000, el carril marcado con la flecha es un control positivo y muestra el reconocimiento de la proteína recombinante por un suero hiperinmune de conejo anti-AgB. A: fragmento VW 2-1, B: fragmento VW 3-3 y C: fragmento VW 4-1.



B

VW 3-3



C

VW 4-1

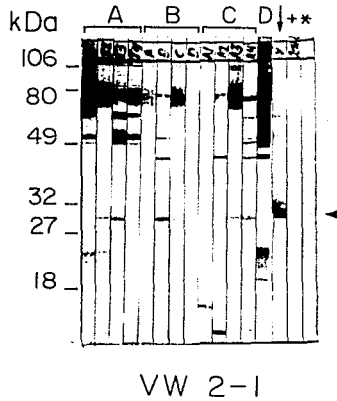
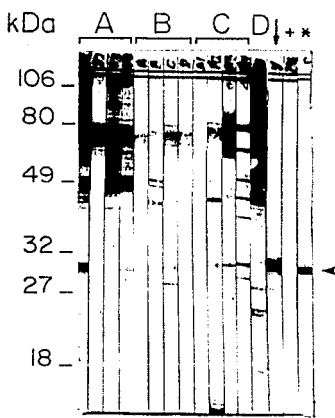
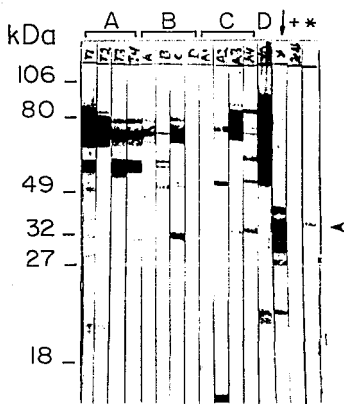


Figura 25. Detección de los sueros positivos a las proteínas recombinantes a partir sueros de individuos con otras infecciones. Para realizar esta prueba sólo se utilizaron sueros de individuos con otras infecciones: A: tuberculosis, B: amibiasis, C: negativos en ELISA para detectar cisticercosis y D: individuo sano. Se muestra un carril marcado con un asterisco de la proteína teñido con amido negro y la flecha lateral señala la banda que corresponde a la proteína recombinante, el carril marcado con una cruz fue incubado sólo con el anticuerpo conjugado a peroxidasa diluido 1:2000, el carril marcado con la flecha es un control positivo y muestra el reconocimiento de la proteína recombinante por un suero hiperinmune de conejo anti-AgB. 1: fragmento VW 2-1, 2: fragmento VW 3-3 y 3: fragmento VW 4-1.



2

VW 3-3



3

VW 4-1

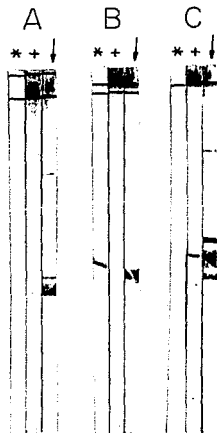


Figura 26. Detección de pegado del anticuerpo conjugado a peroxidasa a los fragmentos recombinantes. Las tiras con cada uno de los fragmentos recombinantes (VW 2-1, VW 3-3 y VW 4-1) fueron incubadas sólo con el anticuerpo anti-IgG humana conjugado a peroxidasa diluido 1:50. Hacia el extremo izquierdo de cada conjunto de tres tiras se muestra un carril de cada fragmento recombinante teñido con amido negro marcado con un asterisco, el carril marcado con una cruz fue incubado sólo con el anticuerpo conjugado a peroxidasa diluido 1:50, el carril marcado con la flecha es un control positivo y muestra el reconocimiento de la proteína recombinante por un suero hiperinmune de conejo anti-AgB. A: fragmento recombinante VW 2-1, B: fragmento recombinante VW 3-3 y C: fragmento recombinante VW 4-1.

V. Discusión

En la presente tesis se realizó la fase inicial de un estudio dirigido a caracterizar la distribución de epítopes reconocidos por anticuerpos humanos en el AgB de *T. solium*. Una base metodológica fundamental fue el aprovechamiento de técnicas de DNA recombinante.

Previamente, se habían obtenido, caracterizado y expresado clonas de cDNA conteniendo la región codificadora completa del AgB (Landa et al., 1992; 1993). Estas clonas fueron usadas como templado para obtener por amplificación con PCR, las regiones codificadoras de tres fragmentos así como de la proteína completa (ver sección II.11). La amplificación se realizó con oligonucleótidos sintéticos diseñados para amplificar solamente las regiones deseadas. Los oligonucleótidos tenían, además, un sitio de restricción para facilitar su posterior ligación a un nuevo vector de expresión. Como era de esperarse, los productos de las amplificaciones mostraron un tamaño de alrededor de 800 pb, que equivale a un tercio de la región codificadora completa, lo cual se confirmó al correrlos en un gel de agarosa. Los productos de la amplificación fueron subclonados en el vector de expresión pRSET.

La decisión para utilizar el pRSET se debe a su promotor viral T7 que asegura hasta donde cabe, la expresión de altos niveles de proteína recombinante (ver apéndice B). La segunda

ventaja es la facilidad y seguridad que ofrece el vector para controlar al promotor T7, lo que garantiza la rápida y segura expansión de las bacterias transformantes. Otras características del vector se describen en el Apéndice B.

Las construcciones de expresión fueron confirmadas por secuenciación de las regiones de ligación entre los insertos y el vector (ver sección IV.1). Las proteínas recombinantes mostraron un peso molecular de acuerdo con los esperados (ver sección IV. 2), (ver sección IV.3). La purificación consistió básicamente en el aislamiento de los cuerpos de inclusión y su solubilización en un medio altamente desnaturizante. Este procedimiento puede llevarse a cabo en menos de seis horas. De hecho no fue necesario aprovechar la afinidad del péptido de fusión hacia metales divalentes para lograr un grado de pureza de la proteína recombinante mayor al 80%. Además, el rendimiento de la purificación fue de hasta 8 mg/100 ml de cultivo de células transformadas. La obtención de estas cantidades de AgB es difícilmente alcanzable a partir de cisticercos de *T. solium*. Este sistema de expresión y purificación permitió contar con cantidades más que suficientes para los ensayos inmunológicos.

La purificación de la proteína natural de *T. solium* se realizó con el método descrito por Laclette et al., (1990), que es sencillo, ya que implica un solo paso. La proteína natural y los fragmentos recombinantes se usaron para determinar la distribución de epítopes en el AgB por ensayos de Western blot

usando un banco de 50 sueros humanos positivos a un extracto de cisticerco, provenientes de una zona endémica para cisticercosis.

El primer paso fue detectar los sueros positivos al AgB natural purificado de cisticercos, para después confirmar la seropositividad hacia la proteína recombinante completa. Este paso era crucial ya que los fragmentos del AgB, en los que se pretendía determinar la localización de epítopes, son también recombinantes. Los ensayos iniciales de ELISA, en los que sueros humanos positivos a *T. solium* se enfrentaron con AgB natural, no consiguieron diferenciar claramente grupos de sueros positivos y negativos. Esto puede deberse a dos razones; en primera al hecho de que entre los individuos respondedores hacia AgB se pueden encontrar sueros ligeramente, medianamente y fuertemente positivos, lo que dificulta establecer el límite entre positivo y negativo. En segunda, por el reconocimiento hacia otros antígenos del cisticerco, presentes en cantidades pequeñas en la fracción de AgB purificado. En consecuencia se decidió realizar pruebas de Western blot para considerar únicamente la positividad hacia la banda del AgB.

El ensayo de Western blot tiene como inconveniente el hecho de que las proteínas son inicialmente desnaturalizadas durante la electroforesis y después parcialmente renaturalizadas sobre la membrana de nitrocelulosa. Es posible que algunos epítopes no se recuperan, por lo que de inicio podría quedar excluido el reconocimiento hacia los epítopes menos estables. Sin embargo, el hecho de que la intensidad de la banda de reconocimiento hacia el

AgB en Western blot correlaciona directamente con la densidad óptica determinada por ELISA, nos hace pensar que en caso de producirse una destrucción de epítopes no se trata de los más prominentes.

Con las anteriores limitaciones en mente se realizaron las pruebas de 50 sueros humanos positivos mediante ensayos de Western blot utilizando AgB natural. De este banco de 50 sueros, 32 resultaron positivos al AgB. Los sueros positivos al AgB natural resultaron similarmente positivos al AgB recombinante completo en ensayos de Western blot, indicando que la proteína recombinante tiene semejanza antigénica con la proteína nativa.

Quando se probaron los diferentes fragmentos del AgB por ensayos de Western blot, el carboxilo-terminal fue reconocido fuertemente por todos los sueros. Los sueros levemente positivos y negativos con los fragmentos recombinantes, aunque muestran un reconocimiento débil hacia los tres fragmentos (VW 2-1, VW 3-3 y VW 4-1), permiten establecer que el reconocimiento preferencial de los sueros positivos hacia el carboxilo-terminal se debe a una reacción específica. Esto es adicionalmente apoyado por los resultados con sueros de otras infecciones como amibiasis y tuberculosis en los fragmentos fueron sólo ocasionalmente reconocidos.

Otros controles de la especificidad de la reacción de reconocimiento hacia el extremo carboxilo-terminal incluyeron pruebas de pegado del segundo anticuerpo a concentraciones veinte veces mayores que la usada en los ensayos ordinarios. Este

control es especialmente pertinente en vista de un reporte reciente en el que se describe una proteína de superficie en la *Taenia crassiceps*, similar al AgB que presenta la propiedad de unirse a la región Fc de la IgG (Kalinna et al., 1993).

En un estudio similar acerca del reconocimiento de anticuerpos de pacientes hacia la paramiosina de la *Dirofilaria immitis*, se encontró que la región amino-terminal era la más reconocida (Steel et al., 1990). Esta observación es interesante y sugiere que existen regiones inmunodominantes distintas en paramiosinas de diferentes especies de parásitos.

Cabe hacer notar que en los ensayos de Western blot, los sueros humanos no sólo reconocen a la proteína recombinante, sino también a otras proteínas bacterianas presentes en pequeñas cantidades, que no se detectan por tinción con azul de Coomassie en el gel, o de Amido Negro en la membrana de nitrocelulosa. Esto es de esperarse considerando que los sueros humanos contienen títulos altos de anticuerpos dirigidos hacia diversos componentes bacterianos. Sería deseable preadsorber los sueros humanos con un extracto crudo bacteriano para eliminar las especificidades no deseadas. En este proyecto no fue posible llevar a cabo la preadsorción debido a limitaciones en la cantidad de suero conseguidas para realizar los ensayos.

El hecho de que estas fracciones de la paramiosina sean reconocidas por los sueros de los pacientes cisticercosos indica que la conformación de al menos algunos epítopes se mantiene en fragmentos de un tercio del tamaño total de la proteína. No se

probaron fragmentos que incluían el tercio amino-terminal con el central o el tercio carboxilo-terminal con el central, a pesar de que se prepararon las construcciones de expresión, puesto que el reconocimiento de los tercios contiguos era extremadamente diferente y no hacía pensar que algunos epítodos dominantes se encontrarán en las regiones intermedias. Además, dado que la estructura de la paramiosina es un alfa hélice superenrollada que forma homodímeros paralelos, es de esperarse que la conformación de los epítodos depende de aminoácidos cercanos en la secuencia.

Aparte de las pruebas presentadas en esta tesis, existen datos que muestran que la paramiosina recombinante comparte propiedades inmunológicas con la natural. Por ejemplo, tanto la paramiosina natural como la recombinantes de *Schistosoma mansoni* confieren protección a un ratón inmunizado. Asimismo, pacientes con oncocercosis reconocen la paramiosina recombinante de *D. immitis* (Pearce et al., 1986; Pearce et al., 1988; Flanigan et al., 1989; Steel et al., 1990).

Las diferencias en la respuesta humoral de paciente a paciente con cada una de las fracciones pudiera indicar diferentes poblaciones de anticuerpos en cada suero. La relación del isotipo de la respuesta inmune contra la paramiosina y la resistencia a sido estudiada en otras infecciones helmínticas (Dessein et al., 1981; Gusmao et al., 1981; Balloul et al., 1987; Khalife et al., 1989; Steel et al., 1990). En estos trabajos se encontró que el isotipo de anticuerpo producido indica el estado

clínico y la susceptibilidad a la enfermedad. Un estudio de la reacción isotípica contra la proteína completa o los fragmentos, tal vez, permitirá establecer una relación con el estado de la enfermedad o la resistencia a una infección subsecuente.

La expresión recombinante de diferentes regiones de la paramiosina podría tener aplicaciones en el diagnóstico de la cisticercosis. Para el diagnóstico de muchas enfermedades se busca el antígeno que permite desarrollar la prueba diagnóstica con alta sensibilidad y especificidad. Similarmente, es concebible que se pueda identificar un epítotope de la paramiosina reconocido por una mayoría de sueros de pacientes que no muestre reacciones cruzadas con otros parásitos.

La antigenicidad de la región carboxilo-terminal de la TPmy está de acuerdo con la propuesta de un papel regulador de la paramiosina en la relación huésped-parásito (Laclette et al., 1992; 1993). Los anticuerpos unidos al extremo carboxilo-terminal de esta proteína filamentososa dejarían libre el extremo amino-terminal para llevar a cabo su acción inhibitoria del complemento y con ello inhibir el desarrollo de la respuesta inflamatoria del huésped.

Apéndice A

Características de las cepas bacterianas

recA1: El gen *recA* codifica para una ATPasa dependiente de DNA, esencial para la recombinación en *E. coli*. Las cepas que llevan la mutación *recA1* no pueden recombinar, lo cual da lugar a dos ventajas: 1) los plásmidos propagados en las cepas que llevan esta mutación permanecen como monómeros y no forman círculos multiméricos y 2) segmentos extraños de DNA propagados en vectores M13 tienen pocas deleciones en cepas *recA*'

supE: Es un supresor de mutaciones ambar que inserta glutamina en los codones UAG. Por un tiempo, las directivas de NIH requirieron que los vectores M13 llevaran una mutación ambar en proteínas de la cápside, para disminuir el riesgo de la propagación del bacteriófago en bacterias ambientales. Este requisito ya no es necesario y actualmente muchos vectores no llevan tales mutaciones. Sin embargo, muchas de las cepas de *E. coli* que son usadas como huéspedes fueron desarrolladas cuando los anteriores protocolos dominaban. Estas cepas y muchas de sus derivadas llevan el supresor que permite la propagación de vectores que llevan mutaciones ambar.

endA1: Es una mutación supresora de la degradación de plásmido dependiente de endonucleasa A.

hsdR17: *hsd* es un gen bacteriano que codifica una subunidad de la enzima *EcoK*, una enzima de restricción tipo I. Esta subunidad es la responsable de el corte en los sitios de restricción del DNA. Las cepas *hsdR* metilan, pero no cortan el DNA. Un DNA no modificado que es clonado directamente en M13 y propagado en una cepa bacteriana con esta mutación, sería modificado y, por esto, protegido contra la actividad de restricción si el vector es introducido después en una cepa de *Escherichia coli* con *hsd⁺*.

$\Delta(lac-proAB)$: Es una deleción en un segmento cromosomal que abarca el operón *lac* y genes vecinos involucrados en la biosíntesis de prolina. Los huéspedes bacterianos que llevan este marcador son incapaces de usar lactosa como una fuente de carbono y necesitan la prolina para su crecimiento.

Episoma F': El factor F (fertilidad) es el cromosoma sexual en *Escherichia coli*, es una doble hélice circular, contiene 19 genes de transferencia (*tra*) involucrados en la transferencia del material genético masculino dentro de las bacterias femeninas. También tiene genes responsables de la síntesis del pili F sexual.

traD36: Es una mutación que suprime la transferencia por conjugación de los factores de F'. Este marcador fue exigido por las directivas de NIH que existían hace tiempo. Estos protocolos

no lo juzgan indispensable, sin embargo, aún existen esos marcadores en bacterias de ese tiempo.

proAB: Es la región del cromosoma bacteriano que codifica para enzimas involucradas en al biosíntesis de la prolina. Estos genes se encuentran frecuentemente en el episoma F', el cual puede complementar la síntesis de prolina en un huésped $\Delta(lac-proAB)$. De esta forma se garantiza la presencia del F' en el huésped.

lacI^r: Es una mutante del gene *lacI* que sintetiza aproximadamente 10 veces más represor que el gen nativo. Esta sobreproducción de represor inhibe aun más el ya de por sí bajo nivel de transcripción de operón *lac*, en ausencia de inductor. Así la síntesis de proteínas potencialmente tóxicas es minimizada cuando secuencias extrañas de DNA son colocadas bajo el control del promotor *lacZ* en cepas *lacI^r*. En la mayoría de las cepas usadas para la clonación con vectores M13, *lacI^r* es llevado con *lacZ Δ M15*.

lacZ Δ M15: Es una mutante que carece de secuencias del gen *lacZ* que codifica para la porción amino-terminal de la β -galactosidasa. El péptido expresado por Δ M15 puede tomar parte en la ó-complementación. La mayoría de los huéspedes para los vectores M13 llevan esta versión deletada del gen *lacZ* en un episoma F'.

gyrA: El ácido nalidixico es un bacteriostático, ya que inhibe la síntesis de DNA al inhibir la DNA girasa. Esta mutación que afecta a la DNA girasa confiere resistencia al ácido nalidixico.

Apéndice B

El plásmido de Expresión pRSET'

Los vectores de expresión pRSET (A,B,C) son una serie de plásmidos derivados de la familia de los plásmidos pUC, que permiten obtener altos niveles de expresión de productos recombinantes en *E. coli*. Los niveles altos de expresión de las secuencias codificadoras clonadas en los vectores pRSET se logran gracias al promotor viral T7. Los insertos se ligan en fase y por debajo (downstream) de una secuencia que codifica un péptido de fusión amino-terminal que contiene (en orden desde el amino-terminal hacia el carboxilo-terminal), un codón de inicio ATG, una secuencia de seis residuos de histidina que le confieren a la proteína de fusión afinidad hacia metales divalentes, una secuencia para la estabilización del transcrito proveniente del gene 10 del bacteriófago T7, y un sitio de reconocimiento y corte para la enterocinasa (Figura 15).

El dominio con afinidad hacia metales del péptido de fusión permite la purificación de los péptidos recombinantes por cromatografía de afinidad hacia metales. El sitio de reconocimiento y corte para la enterocinasa se encuentra entre el péptido de afinidad a metales y el péptido de interés y sirve para liberarlo de su contraparte en la proteína de fusión. El DNA insertado se propaga con el vector en una cepa de *E. coli* que no expresa la polimerasa T7, evitando la expresión del gene clonado.

Cuando se desea la expresión, la bacteria transformada se infecta con un bacteriófago M13 que contiene el gene de la polimerasa T7 controlado por el promotor *lac* de *E. coli* (bacteriófago M13/T7). La inducción se realiza en presencia de IPTG el cual libera al promotor *lac* de *E. coli* induciendo la expresión de la polimerasa T7 del bacteriófago M13/T7. Por lo anterior, en presencia de IPTG y M13/T7, las bacterias transformadas mantienen niveles altos de la polimerasa T7 que a su vez producen abundantes transcritos para la proteína de fusión. De esta manera es posible la expresión de niveles altos de la proteína recombinante regulables por IPTG y M13/T7.

Los posibles efectos tóxicos provocados en la bacteria transformada al expresar una proteína extraña, son evitados al utilizar bacterias sin polimerasa T7. La ausencia de la polimerasa T7 en la bacteria transformada, asegura su crecimiento ya que no se expresa la proteína recombinante.

Por debajo de las secuencias 5' descritas anteriormente, existen varios sitios de reconocimiento para enzimas de restricción (polylinker). La lista de sitios de restricción es: *Bam* HI, *Xho* I, *Bgl* II, *Pst* I, *Pvu* II, *Kpn* I, *Nco* I, *Eco* RI, *Bst* BI y *Hind* III (Figura 27). Para conseguir la expresión del péptido de interés en la proteína de fusión, es necesario mantener el marco de lectura apropiado entre el extremo 5' de la secuencia de fusión y el fragmento de DNA ligado; para ello existen tres versiones diferentes de pRSET: A, B y C. En estas tres versiones se encuentran los tres marcos de lectura, por lo

tanto, se puede elegir la versión adecuada para la correcta expresión de péptido de interés en fase correcta con el extremo amino-terminal.

Además, este vector le confiere a la bacteria un nuevo fenotipo, la resistencia a ampicilina, lo cual permite seleccionar fácilmente a las bacterias transformadas en un medio con este antibiótico. El nuevo fenotipo es debido a la presencia del gen de resistencia a la ampicilina (*amp'*) en el vector. Este gen codifica para una enzima que es secretada dentro del espacio periplásmico de la bacteria, en donde cataliza la hidrólisis del anillo β -lactámico, provocando la detoxificación concomitante de la droga.

* Tomado con modificaciones del manual Xpress System Expression Description (InVitrogen Co.)

Nde I
 (0)
 +1
 ATG CGG GGT TCT CAT CAT CAT CAT CAT CAT GGT ATG GCT AGC ATG ACT
 MET Arg Gly Ser His His His His His His Gly Met Ala Ser Met Thr

Nhe I
 (1320)

Dominio de unión
 a metales.

Bam HI
 (3520)
 GGT GGA CAG CAA ATG GGT CGG GAT CTG TAC GAC GAT GAC GAT AAG GAT
 Gly Gly Gln Gln Met Gly Arg Asp Leu Tyr Asp Asp Asp Asp Lys Asp

Sitio de reconocimiento
 para la enterocinasa.

Xho I, Pvu II Nco I Bst B
 (3740) (3960) (4180) (4510) (4730) (4840) (4950)
 Sac I Bgl II Pst I Kpn I Eco RI Hind III
 CCG AGC TCG AGA TCT GCA GCT GGT ACC ATG GAA TTC GAA GCT
 Pro Ser Ser Arg Ser Ala Ala Gly Thr Met Glu Phe Glu Ala

Figura 27. Secuencia del sitio múltiple de clonación del vector pRSET-B que muestra sus principales características.

Bibliografía.

- Acevedo-Hernández, A. (1989) Epidemiología de la cisticercosis porcina. En: Cisticercosis humana y porcina. Su conocimiento e investigación. Flisser, A. y Malagón, F. (eds). Limusa. México. pp. 251-253.
- Acosta, E. (1990) Antibodies to the metacestode of *Taenia solium* in the saliva from patients with neurocysticercosis. J. Clin. Lab. Anal. 4(2):90-94.
- Alarcón, F.; Escalante. L.; Dueñas, G; et al. (1989) Neurocysticercosis: Short course of treatment with albendazole. Arch. Neurol. 46:1231-1236.
- Aluja, A.S. (1982) Frequency of porcine cysticercosis in México. Cysticercosis: Present State of Knowledge and Perspectives. Flisser, A.; Willms, K.; Laclette, J.P.; Larralde, C.; Ridaura, C. and Beltrán, F. (eds). Academic Press. New York, U.S.A. pp. 53-62.
- Aluja, A.S.; Escobar, A.; Escobedo, F.; Flisser, A.; Laclette, J.P.; Larralde, C.; Madrazo, I.; Velázquez, V. y Willms, K. (1987) Cisticercosis: Una recopilación actualizada de los conocimientos básicos para el manejo y el control de la cisticercosis causada por *Taenia solium*. Fondo de Cultura Económica. México D.F. p. 20.
- Aluja, A. y Vargas, G. (1988) The histopathology of porcine cysticercosis. Vet. Parasitol. 28:65-77.
- Ambrosio Hernández, J.R. (1991) Estudio de la internalización de macromoléculas en cisticercos de *Taenia crassiceps*. Tesis de Maestría. Instituto de Investigaciones Biomédicas. UNAM.
- Andrews, P. (1976) Pharmacokinetic studies with Droncit in animals using a biological assay. Vet. Med. Nachr. 2:154.
- Aristóteles. (1969) "Histoire des Animaux", vol. III libro VIII, párrafo XXI pag. 48-49. Sociéte d'Edition "Les Belles Lettres," París.
- Aristófanes. "Las Once Comedias". Ed. Porrúa. Ciudad de México. 1976.
- Balloul, J.M.; Grzych, J.M.; Pierce, R.J. and Capron, A. (1987) A purified 28,000 Daltons protein from *Schistosoma mansoni* adult worms protects rats and mice against experimental schistosomiasis. J. Immunol. 138:3448.

Briseño, C.E.; Biagi, F. y Martínez, B. (1961) Cisticercosis: observaciones sobre 97 casos de autopsia. Prensa Med. Mex. 26:193-197.

Cañedo, L.; Laclette, J.P. y Morales, E. (1982) Evagination of the metacestode of *Taenia solium*. En Cysticercosis: Present state of Knowledge and perspectives. Flisser, A.; Willms, K.; Laclette, J.P.; Larralde, C.; Ridaura, C. and Beltrán, F. (eds). Academic Press, New York. pp. 363-374.

Corona, T.; Pascoe, D.; Gonzales-Barranco, D.; Abad, P.; Landa, C. y Estanol, B. (1986) Anticysticercosis antibodies in serum and cerebrospinal fluid in patients with cerebral cysticercosis. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry. 49:1044-1049.

Correa, D.; Sandoval, M.A.; Harrison, L.J.S.; Parkhouse, R.M.E. Plancarte, A.; Meza-Lucas, A. y Flisser, A. (1989) Human neurocysticercosis: comparison of enzyme immunoassay capture techniques based on monoclonal and polyclonal antibodies for the detection of parasite products in cerebrospinal fluid. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 83:814-816.

Correa, D.; Tovar, A.; Espinoza, B.; Plancarte, A. y Flisser, A. (1989) Cisticercosis humana: relación inmunológica huésped parásito. En "Cisticercosis humana y porcina. Su conocimiento e investigación en México. Flisser, A. y Malagón, F. (eds). Limusa. México. pp. 31-43.

Costero, I. 1944. Anatomía Patológica de la cisticercosis cerebral. Memoria de la VI Asamblea Nacional de Cirujanos. Mex.

Costero, I. Tratado de Anatomía Patológica.. Vol. 2, Atlanta, México, D.F., 1946.

Choromanski, L; Estrada, J.J. and Kuhn, R.E. (1990) Detection of antigens of larval *Taenia solium* in the cerebrospinal fluid of patients with the use of HPLC and ELISA. J. Parasitol. 76(1)69.

De Ghetaldi, D.L.; Norman, M.R. and Douville, W.A. (1983) Cerebral cysticercosis treated biphasically with dexametasone and Praziquantel. Ann. Internal. Med. 99:179.

de Groot, A.S.; Johnson, A.H.; Maloy, W.L.; Quakyi, I.A.; Riley, E.M.; Menon, A.; Banks, S.M.; Berzofsky, J.A. and Good, M.F. (1989) Human T cell recognition of polymorphic epitopes of malaria circumsporozoite protein. J. Immunol. 142:4000

Dessein, A.J.; Parker, W.L.; James, S.L. and David, J.R. (1981) Ig E antibody and resistance to infection. I. Selective supresion of Ig E antibody response in rats diminishes the resistance and the eosinophil response to *Trichinella spiralis* infection. J. Exp. Med. 153:423.

Díaz, J.F.; Verastegui, M.; Gilman, R.H.; Tsang, V.C.; Pilcher, J.B.; Gallo, C.; García, H.H.; Torres, P.; Montenegro, T.; Miranda, E. (1992) Immunodiagnosis of human cysticercosis (*Taenia solium*): a field comparison of an antibody-enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), an antigen-ELISA, and an enzyme-linked immunoelectrotransfer blot (EITB) assay in Peru. The Cysticercosis Working Group in Peru (CWG). Am. J. Trop. Med. Hyg. 46(5)610-615

Díaz, S. (1983) Síntesis de anticuerpos en la reacción inflamatoria al cisticerco de la *Taenia solium* en el músculo porcino. Tesis de Maestría. Facultad de Medicina, UNAM, México.

Díaz Camacho, S.; Candil-Ruiz, A.; Uribe-Beltrán, M. y Willms, K. (1989) Epidemiología de teniasis/cisticercosis en una comunidad de Sinaloa. En: cisticercosis humana y porcina. Su conocimiento e investigación en México. Flisser, A. y Malagón, S. (eds). Limusa. México. pp. 243-250.

Diwan, A.R.; Coker-Van, M.; Brown, M.; Sibianto, D.B.; Yolken, R. Desowitz, R.; Escobar, A.; Gibbs, C. y Gadjusek, C. (1982) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibody to cysticerci of *Taenia solium*. Am. J. Trop. Med. Hyg. 31:364-369.

Dixon, H. and Hardgraves, W. (1944) A further ten years clinical study covering 248 cases. Quart. J. Med. 13:107-121.

Dixon, H. and Lipscomb, F. (1961). Cysticercosis: An analysis and follow-up of 450 cases. Stationery office, Medical Research Council Special Report Series, No. 229. 58:London.

Doherty, T.M.; Booth, R.J.; Gibson, J.J.; Love, S.G.; Harding, D.R. and Watson, J.D. (1989) Characterization of an antibody-binding epitope from the 18 kDa protein on *Mycobacterium leprae*. J. Immunol. 142:1691

Escobedo, F.; Penagos, P.; Rodriguez, J.; et al. (1987) Albendazole therapy for neurocysticercosis. Arch. Intern. Med. 147:738-741.

Escobedo, F. (1989) Tratamiento de cisticercosis/taeniasis humana. En: Cisticercosis humana y porcina. Su conocimiento e investigación. Flisser, A. y Malagón, F. (eds). Limusa. México. pp. 199-204.

Espinoza, B.; Ruiz-Palacios, G.; Tovar, A. Sandoval, M.A. Plancarte, A. y Flisser, A. (1986) Response in patients with neurocysticercosis and its application in immunodiagnosis. J. Clin. Microbiol. 24:536-541.

- Estrada, J.J.; Kuhn, R.E. (1985) Immunochemical detection of antigens of larval *Taenia solium* and anti-larval antibodies in the cerebrospinal fluid of patients with neurocysticercosis. *J. Neurol. Sci.* 71(1)39-48.
- Estrada, J.J.; Estrada, J.A. and Kuhn, R.E. (1989) Identification of *Taenia solium* antigens in cerebrospinal fluid and larval antigens from patients with neurocysticercosis. *Am. Trop. Med. Hyg.* 41(1)50-55
- Feldman, M.; Plancarte, A.; Sandoval, M.; Wilson, M. and Flisser, A. (1990) Comparison of two assays (EIA and EITB) and two samples (saliva and serum) for the diagnosis of neurocysticercosis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 84(4)559-562.
- Flanigan, T.P.; King, C.H.; Lett, R.R.; Nanduri, J. and Mahmoud, A.F. (1989) Induction of resistance to *Schistosoma mansoni* infection in mice by purified parasite paramiosin. *J. Clin. Invest.* 83:1010.
- Flisser, A.; Plancarte, A.; Espinoza, B.; Woodhouse, E.; Rivera, L.; Trueba, T.; Yakoleff-Greenhose, V.; Sierra, A.; Laclette, J.P.; Cañedo, L. y Larralde, C. (1983) The immune state of patients with cysticercosis. *Afr. J. Clin. and Exp. Immunol.* 3:183.
- Flisser, A. (1988) Neurocysticercosis in México. *Parasitology today.* 4(5)131-137.
- Flisser, A.; Plancarte, A.; Correa, D.; Rodriguez-Del-Rosal, E.; Feldman, M.; Sandoval, M.; Torres, A.; Meza, A.; Parkhouse, R.M.; Harrison, L.J. et al (1990) New approaches in the diagnosis of *Taenia solium* cysticercosis and taeniasis. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 65(1)95-98
- Flores, B.F. y Velásquez, A.F. (1971) Principales padecimientos encontrados en las necropsias de algunos hospitales de la Ciudad de México. IV. Hallazgos en el Hospital General del Centro Médico Nacional. *Gac. Med. Mex.* 102:208.
- García-Domínguez, C.; Lightowers, M.W.; Gasser, R.B. and Craig, P.S. (1992) Diagnosis of *Taenia solium* cysticercosis using a recombinant antigen. XIIIth International congress for tropical medicine and malaria. Ed. Tharavani, S.; Fungladda, W.; Kuhsmith, S. and Pruekwatana, O. vol. 2 p. 171.
- Gemmel, M. A. y R. Lawson. (1982) Ovin cysticercosis: An epimemiological model for the cysticercosis I. The free living egg phase. *Cysticercosis: Present State of Knowledge and Perspectives.* Flisser, A.; Willms, K.; Laclette, J.P.; Larralde, C.; Ridaura, C. and Beltrán, F. (eds). Academic Press. New York, U.S.A. pp.87-98.

Gómez-Izquierdo, I. 1901. Locura por cisticercosis del cerebro. Revista Médica. 13:265.

González, A.E.; Cama, V.; Gilman, R.H.; Tsang, V.C.; Pilcher, J.B.; Chavera, A.; Castro, M.; Montenegro, T.; Verastegui, M.; Miranda, E.; et al (1990) Prevalence and comparison of serologic assays, necropsy, and tongue examination for the diagnosis of porcine cysticercosis in Peru. Am. J. Trop. Med. Hyg. 43(2)194-199.

Gottstein, B.; Tsang, V.C.W. and Schantz, P.M. (1986) Demonstration of species-specific and cross-reactive components of *Taenia solium* metacestode antigens. Amer. J. Trop. Med. Hyg. 35:308-318.

Gottstein, B.; Zini, D. y Schantz, P.M. (1987) Species-specific immunodiagnosis of *Taenia solium* cysticercosis by ELISA and immunoblotting. Tropenmed. Parasitol. 38:299-303.

Griesinger, W. Cysticerken und ihre diagnse. Archives für Heilkunde 3, 1862. Gesammelte Abhandlugen, s. 399. Berlin, 1872.

Grogl, M.; Estrada, J.J.; Mac Donald, G. Kuhn, R.E. (1985) Antigen-antibody analysis in neurocysticercosis. J. Parasitol. 71:433-442.

Groll, E.W. (1982) Chemotherapy of human cysticercosis with Praziquantel. In Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives. Flisser, A.; Willms, K.; Laclette, J.P.; Larralde, C.; Ridaura, C. and Beltrán, F. (eds). New York, Academic Press. pp. 207-218.

Guerra, G.; Flisser, A.; Cañedo, L. y Laclette, J.P. (1982) Biochemical and immunological Characterization of antigen B purified from cysticerco of *Taenia solium*. In Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives. Flisser, A.; Willms, K.; Laclette, J.P.; Larralde, C.; Ridaura, C. and Beltrán, F. (eds). New York, Academic Press. pp. 437-451.

Gutiérrez, M. (1989) Diagnóstico inmunológico de la cisticercosis. En: Cisticercosis humana y porcina. Su conocimiento e investigación en México. Flisser, A. y Malgón, S. (eds). Limusa. pp. 175-178

Gusmao, R.D'A.; Stanley, A.M. and Ottesen, E.A. (1981) *Brugia pahangi*: immunologic evaluation of the differential susceptibility to filarial infection in inbred Lewis rats. Exp. Parasitol. 52:147.

Harris, D.P.; Backstrom, B.T.; Booth, R.J.; Love, S.G.; Harding, D.R. and Watson, J.D. (1989) The mapping of epitopes of the 18

kDa protein of *Mycobacterium leprae* recognized by murine T cell in proliferation assay. *J. Immunol* 143:2006

Harrison, L.J.; Delgado, J.; Parkhouse, R.M. (1990) Differential diagnosis of *Taenia saginata* and *Taenia solium* with DNA probes. *Parasitology* 100(3)459-461

Hartree, E.F. (1972) Determination of protein: A modification of Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal. Biochem.* 48:422.

Henneberg, R. Die Tierischen Parasiten des Zentralnervensystem. In "Handbuch der Neurologie"(ed. M. Lewandowsky)vol. III Springer, Berlin, 1912.

Ito, A.; Bogh, H.O.; Lightowers, M.W.; Mitchell, G.F.; Takami, T.; Kamiya, M.; Onitake, K. y Rickcard, M.D. (1991) Vaccination against *Taenia taeniaeformis* infection in rats using a recombinant protein and preliminary analysis of the induced antibody response. *Mol. Biochem. Parasitol.* 44:43-52.

Jeffrey, H.C. and Leach, R.M. (1991) Atlas of Medical Helminthology and Protozoology. Churchill Livingstone. Edinburgh London Melbourne and New York. p. 20.

Johnson, K.S.; Harrison, G.B.L.; Lightowers, M.W.; O'Hoy, K.L.; Cogle, W.G.; Dempster, R.P.; Lawrence, S.B.; Vinton, J.G.; Heath, D.D. y Rickard, M.D. (1989) Vaccination against ovine cysticercosis using a defined recombinant antigen. *Nature.* 338:585-587.

Kalina, B. and McManus, D.P. (1993) An IgG (Fc γ)-binding protein of *Taenia crassiceps* (Cestoda) exhibits sequence homology and antigenic similarity with schistosome paramyosin. *Parasitology* 106:289-296.

Khalife, J.; Dunne, D.W.; Richardson, B.A.; Mazza, G.; Thorne, K.J.I.; Capron, A. and Butterworth, A.E. (1989) Functional role of human of IgG subclasses in eosinophil-mediated killing of schistosomes of *Schistosoma mansoni*. *J. immunol.* 142:4422.

Kong, Y.; Kang, S.Y.; Cho, S.Y.; Min, D.Y. (1989) Cross-reacting and specific antigenic components in cystic fluid from metacestodes of *Echinococcus granulosus* and *Taenia solium*. *Kisaengchunghak-Chapchi* 27(2)131-139.

Laclette, J.P.; Ornelas, Y.; Merchant, M.T. y Willms, K. (1982) Ultrastructure of surrounding envelopes of *Taenia solium* eggs. Cysticercosis: Present State of Knowledge and Perspectives. Flisser, A.; Willms, K.; Laclette, J.P.; Larralde, C.; Ridaura, C. and Beltrán, F. (eds). Academic Press. New York, U.S.A. pp. 375-387.

Laclette, J.P.; Merchant, M.T. y Willms, K. (1987) Histological and ultrastructural localization of antigen B in the metacestode of *Taenia solium*. J. Parasitol. 73:121-129.

Laclette, J.P.; Rodríguez, M.; Landa, A.; Arcos, L.; De Alba, P.; Mancilla, R. y Willms, K. (1989) The coexistence of *Taenia solium* cysticerci and the pig: Role of antigen B. Acta Leidensia. 57(2)115-122.

Laclette, J.P.; Alagón, A.; Willms, K. y Torre-Blanco, A. (1990) Purification of antigen B from *Taenia solium* Cysticerci by affinity to Mammalian collagen. J. Parasitol. 76:273-275.

Laclette, J.P.; Shoemaker, C.B.; Richter, D.; Arcos, L.; Pante, N.; Cohen, C.; Bing, D. and Weller, N. (1992) Paramyosin inhibits complement C1. J. Immunol. 148:124-128

Laemmli, U.K. (1979) Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227:680.

Landa, A. (1992) *Taenia solium*: Clonación, caracterización y expresión del gen para el antígeno B. Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias, UNAM. 1992.

Landa, A; Laclette, J.P.; Nicholson-Weller, A. and Shoemaker, B.C. (1993) *Taenia solium* paramyosin (AgB): cDNA cloning and recombinant expression of collagen-binding and complement inhibitor activity. Molecular and Biochemical Parasitology (Enviado)

Langle, O. (1940) Síndrome liquórico da cisticercose encéfalomeningé. Revista de Neorilogia e Psiquiatria de Sao Paulo. 6:35.

Larraide, C.; Laclette, J.P.; Owen, C.S.; Madrazo, I.; Sandoval, M.; Bojalil, R.; Sciutto, E.; Contreras, L.; Arzate, J.; Diza, M.L.; Govezensky, T.; Montoya, R.M. and Goodsaid, F. (1986) Reliable serology of *Taenia solium* cysticercosis with antigens from cyst vesicular fluid: Elisa and hemagglutination tests. Am. J. Trop. Med. Hyg. 35:965-973.

Larraide y col. (1992) Seroepidemiología de la cisticercosis en México. Salud Pública de México. 34(2)197-210.

Leopold, D.; Ungetuhm, W.; Groll, E.; Diekam, H.W.; Nowak, J. and Wegner, D.H.G. (1978) Clinical pharmacology in normal volunteers in Praziquantel, drug against schistosomes and cestodes. An example of complex study covering both tolerance and pharmacokinetics. Europ. J. Clin. Pharmacol. 14:281.

Liu, D.; Xu, Z.B.; Hu, Y.X. (1991) [The significance of immunoblot in serodiagnosis of cysticercosis cellulosae] Chung-Hua-Nei-Ko-Tsa-Chih 30(4)233-235.

Lumsden, R.D. (1966) Cytological studies on the absorptive surface of cestode. II. The synthesis and intracellular transport of protein in the strobilar integument. Zeitschr. Parasitenk. 28:1-13.

Macías, V. y Maqueo, M. (1958) Cisticercosis cerebral. Rev. Invest. Clin. 10:443-454.

Mandujano, A. and Correa, D. 1992 Presence of an Fc binding molecule in *Taenia solium* cysticerci. XIIIth International congress for tropical medicine and malaria. Ed. Tharavanij, S.; Fungladda, W.; Kuhsmith, S. and Pruekwatana, O. vol. 2 p. 104.

Márquez, M.H. y Austria, B. (1969) Cisticercosis en el Hospital General de México. Estudio anatomopatológico de 155 casos. Rev. Lat. Am. Pat. 8:79.

Mazzoti, L. (1944) Datos sobre la cisticercosis en México. Rev. Inst. Salub. y Enf. Trop. 5:283.

Michault, A.; Coubes, P.; Laporte, J.P.; Bouillan-Linet, E.; Leroy, D. (1990) Enzyme linked immunosorbent assay for the diagnosis of cerebral cysticercosis in Reunion Island: Comparison with computerized tomography scan. Pathol. Biol. 36(3)266-270.

Molinari, J.L.; Tato, P.; Aguilar, T. and Palet, A. (1988) Immunity in mice to an oncosphere infection by using oncosferal antigens from *Taenia solium* or *Taeniarrhynchus saginatus*. Rev. Lat-amer. Microbiol. 30:325-333.

Molinari, J.L.; Tato, P.; Reynoso, O.A. and Cazares, J.M. (1990) Depressive effect of a *Taenia solium* cysticercus factor on culture human lymphocytes stimulated with phytohaemagglutinin. Ann. Trop. Med. and Parasit. 84(3)205-208.

Moses, A. (1911) Os metodos biologicos de diagnostico nas cisticercoses. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 3:320.

Nanduri, J. and Kazura, J.W. (1989) Paramyosin enhanced clearance of *Brugia malayi* microfilaremia in mice. J. Immunol. 143:3359.

Nascimento, E.; Noqueira, P.M.P. and Tavares, C.A.P. (1987) Improved immunodiagnosis of human cysticercosis with scolex protein antigens. Parasitol. Res. 73:446-450.

Nascimento, E.; Tavares, C.A.; Lopes, J.D. (1987) Immunodiagnosis of human cysticercosis (*Taenia solium*) with antigens purified by monoclonal antibodies. J. Clin. Microbiol. 25(7)1181-1185.

Nieto, D. (1956) Cysticercosis of the nervous system. Diagnosis by means of the spinal fluid complement fixation test. *Neurology*. 6:725-738.

Nieto, D. (1982) Historical notes on cysticercosis. *Cysticercosis: Present State of Knowledge and Perspectives*. Flisser, A.; Willms, K.; Laclette, J.P.; Larralde, C.; Ridaura, C. and Beltrán, F. (eds). Academic Press. New York, U.S.A. pp.1-7.

Oaks, J. y Lumsden, R.D. (1971) Cytological studies on the absorptive surface of cestodes. V. Incorporation of carbohydrate containing macromolecules into tegument membranes. *J. Parasitol.* 1256-1268.

Ocheterena, I. (1935) Contribución al conocimiento de la histopatología de la cisticercosis cerebral en México. *Ann. Inst. Biol. Mex.* 4:81.

Pammenter, M.D.; Rossow, E.J. Epstein, S.R. (1987) Diagnosis of neurocysticercosis by enzyme-linked immunosorbent assay. *S. Afr. Med. J.* 71:512-514.

Pammenter, M.D.; Epstein, S.R.; Rees, R.T. (1992) Cross reactions in the immunodiagnosis of schistosomiasis and cysticercosis by a cerebrospinal fluid enzyme-linked immunosorbent assay. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 86(1)51-52

Pathak, K.M.L. and Gaur, S.N.S. (1990) Immunization of pigs with culture antigens of *Taenia solium*. *Vet. Parasit.* 34:353-356.

Pessoa e Silveira, F. (1930) Cysticercose, diagnostique par la deviation du complement. *Rev. Neurol.(Paris)* 4:127.

Pearce, E.J.; James, S.L.; Dalton, J.; Barrall, A.; Ramos, C.; Strand, M. y Sher, A. (1986) Immunochemical characterization and purification of Sm-97, a *Schistosoma mansoni* antigen monoespecifically recognized by antibodies from mice protectively immunized with a non-living vaccine. *J. Immunol.* 137:3593-3600.

Pearce, E.J.; James, S.L.; Lanar, D.E. y Sher, A. (1988) Induction of protective immunity against *Schistosoma mansoni* by vaccination with schistosoma paramyosin (Sm97), a nonsurface parasitic antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5678-5682.

Plancarte, A.; Flisser, A. y Larralde, C. (1982) Fibronectin-like properties of antigen B from cysticerci of *Taenia solium*. En *Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives*. Flisser, A.; Willms, K.; Laclette, J.P.; Larralde, C.; Ridaura, C. and Beltrán, F. (eds). New York. Academic Press. pp. 453-463.

Rabiela, M.T.; Lombardo, R.L. y Flores, B.F. (1972) Cisticercosis cerebral: Análisis de 68 casos de autopsias. *Patología* 10:27-40.

- Rabiela, M.T.; Rivas, H.A. y Rodríguez, I.J. (1979) Consideraciones anatomopatológicas sobre la cisticercosis cerebral como causa de muerte. *Patología* 17:119-136.
- Ramos, J. (1888) Nota sobre un caso de cisticercosis en cuerpo vitreo. *Rev. Med. Mex.* 1:13.
- Ramírez-Bon, E.; Merchant, M.T.; Gonzales-Del pliego, M.; Cañedo, L. (1982) Ultrstructure of the bladder wall worm of the metacestode of *Taenia solium*. En *Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives*. Flisser, A.; Willms, K.; Laclette, J.P.; Larralde, C.; Ridaura, C. and Beltrán, F. (eds). New York. Academic Press. pp.261-280.
- Reyes, A.E. y Beltrán, G.P. 1967. Cisticercosis intracraneana. *Rev. Med. Hosp. Gral.* 39(5)317-348.
- Robles, C. 1944 Consideraciones acerca de 100 casos de tumor cerebral operados. *Prensa Med. Mex.* 6:67-78.
- Robles, C. (1981) Tratamiento médico de la cisticercosis cerebral con Prazicuantel. *Gac. Med. (Mex.)* 117:355.
- Rosas, N.; Sotelo, J. y Nieto, D. (1986) ELISA in the diagnosis of neurocysticercosis. *Arch. Neurol.* 43:53.
- Rothfield, J. (1935) Über die Präcipitationreaktion bei Hirncysticercose. *Deutsche Zeitschrift für Nervenheilkunde* 137:93.
- Sandoval, M.; Madrazo, I.; de Dios, J. y Santiago, Noe. (1989) Tratamiento de la neurocisticercosis con prazicuantel. En: *Cisticercosis humana y porcina. Su conocimiento e investigación*. Flisser, A. y Malagón, F. (eds). Limusa. México. pp.215-219.
- Sanger, F.; Nicklen, S. y Coulson, A. (1977) DNA sequencing with chain terminaiting inhibitors. *Proc. Natl. Acad. USA.* 74:5463-5467.
- Santin, G. and Vargas, J. 1966 Roegten study of cysticercosis of the central nervous system. *Radiology* 86:520-528.
- Sarti, E. (1989) Epidemiología de la teniasis/cisticercosis. En: *Cisticercosis humana y porcina. Su conocimiento e investigación*. Flisser, A. y Malagón, F. (eds). Limusa. México. pp. 233-242.
- Schantz, P.M.; Shanks, D. and Wilson, M. (1980) Serologic cross-reactions with sera from patients with echinococcosis and cysticercosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 21:609-612.
- Silverman, P. (1954) Studies on the biology on some tapeworm of the genus *Taenia*. I. Factors affecting hatching and of taeniid

ova, and some criteria of their viability. *Ann. Trop. Med. and Parasitol.* 48:207.

Sotelo, J.; Escobedo, F.; Rodríguez-Carbajal, J.; Torres, D. y Rubio Donadieu. (1984) Therapy of parenchymal brain cysticercosis with Praziquantel. *New England J. Med.* 310:1001.

Sotelo, J.; Escobedo, F. and Penagos, P. (1988) Albendazole vs praziquantel for therapy for neurocysticercosis. *Arch. Neurol.* 45:532-534.

Sotelo, J.; Penagos, P.; Escobedo, F.; et al. (1988b) Short course of albendazole therapy for neurocysticercosis. *Arch. Neurol.* 45:1130-1133.

Steel, C.; Limberger, R.J.; McReynolds, L.A.; Ottesen, E.A. and Nutman, T.B. (1990) B cell responses to paramyosin: Isotypic and epitopic mapping of filarial paramyosin in patients with Onchocerciasis. *J. Immunol.* 145:3917-3923.

Taylor, J.B.; Vidal, A.; Torpier, G.; Meyer, D.J.; Roitsch, C.; Balloul, J.M.; Southan, C.; Sondermeyer, P.; Pemble, S.; Lecocq, J.P.; Capron, A. and Ketterer, B. (1988) The glutathione transferase activity and tissue distribution of a cloned Mr 28K protective antigen of *Schistosoma mansoni*. *EMBO J.* 7:465.

Télliez-Girón, E.; Ramos, M.C.; Dufour, L.; Alvarez, P. y Montante, M. (1987) Detection of cysticercus cellulosa antigens in cerebrospinal fluid by dot enzyme linked immunosorbent assay (Dot-ELISA) and standar ELISA. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 37:169-173.

Towbin, H.; Staehelin, T. y Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gel to nitrocellulosa sheets. Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sciences. USA.* 70:4350.

Trimble, J. y Lumsden, R.D. (1975) Cytochemical characterization of tegument membrane associated carbohydrates in *Taenia crassiceps* larvae. *J. Parasitol.* 61:665-676.

Troye-blomberg, M.; Riley, E.M.; Perlman, H.; Andersson, G.; Larsson, A.; Snow, R.W.; Allen, S.J.; Houghten, R.A.; Olerup, O.; Greenwood, B.M. and Perlmann, P. (1989) T and B cell responses of *Plasmodium falciparum* malaria-immune individuals to synthetic peptides corresponding to sequencies in differente region of the *P. falciparum* antigen Pf155/RESA. *J. Immunol.* 143:3043.

Tsang, V.C.; Brand, J.A.; Boyer, A.E. (1989) An enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay and glycoprotein antigens for diagnosing human cysticercosis (*Taenia solium*). *J. Infect. Dis.* 159(1)50-59.

Velasco Castrejón, O.; Gutiérrez-Quiroz, M.; Romero, V.; Guzmán-Bracho, C. (1989) Detection of soluble antigens of *Cysticercus cellulosae* in spinal fluid as a diagnostic means for neurocysticercosis. Rev. Latinoam. Quim. 31(3)235-239.

Velasco-suárez, M.; Bravo, M.A. y Quirasco, F. (1982) Human cysticercosis: medical implication and economic impact. En Cysticercosis: Present State of Knowledge and Perspectives. Flisser, A.; Willms, K.; Laclette, J.P.; Larralde, C.; Ridaura, C. and Beltrán, F. (eds). Academic Press. New York, U.S.A. pp. 47-52.

Woodhouse, E.; Flisser, A. and Larralde, C. (1982) Seroepidemiology in human cysticercosis in México. Cysticercosis: Present State of Knowledge and Perspectives. Flisser, A.; Willms, K.; Laclette, J.P.; Larralde, C.; Ridaura, C. and Beltrán, F. (eds). Academic Press. New York, U.S.A. pp. 11-23.

Yoshino, K. (1933) Studies on the postembryonal of *Taenia solium* part II. On the youngest form of *Cysticercus cellulosae* and on the migratory course of the oncosphaera of *Taenia solium* within the intermediate host. J. Med. Ass. Formosa 32.

Zenteno-Alanis, G.H. (1966) Frecuencia de la cisticercosis en México. Prensa Med. Mex. 31:156-162.