

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE MEDICINA

11261

6

20)

**CARACTERIZACION DE CLONAS DE cDNA DE *Taenia solium*
IDENTIFICADAS CON ANTICUERPOS ANTI CISTICERCO**

T E S I S

Que para obtener el grado de:

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOMEDICAS
AREA BIOQUIMICA**

P r e s e n t a :

BIOL. DIANA MA. ORTIZ GARCIA.

México, D.F.

1994

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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.

Esta tesis fue realizada bajo la dirección y asesoría de la Dra. Ana Flisser,
en el Departamento de Microbiología y Parasitología de
la Facultad de Medicina de la
Universidad Nacional Autónoma de México.

A Elíseo....

con todo mi amor, mi admiración y respeto por enseñarme a caminar en la adversidad y en la dicha con la esperanza del mañana. Por creer en mí.

A mi madre...

por su ejemplo de superación

A la memoria de Tanya...

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Ana Flisser por permitirme realizar este trabajo en su laboratorio.

Al Dr. Abraham Landa por proporcionarme las bibliotecas de cDNA de *Taenia solium*.

Al M. en C. Agustín Plancarte por donarme la fracción de LLGP.

Al Dr. Juan Pedro Laclette por permitirme trabajar en su laboratorio y por proporcionarme los iniciadores de λ gt11.

Al Q.F.B David Vargas por el apoyo técnico.

Agradezco la revisión de esta tesis a:

El Dr. Rogelio Alonso.

La M. en IBB. Dolores Correa

La Dra. Ana Flisser,

El Dr. Juan Pedro Laclette

El Dr. Vicente Madrid

A mis amigos y compañeros de laboratorio, por la amistad, el apoyo y las críticas que me brindaron a:

Laura Aguilar

Guillermina Avila

Javier Ambrosio

Odelia Benitez

Cuauhtémoc Corella

Andrés Campos

Irma López

Alejandro, Araceli, Areli

Marcela, Mayra y Rosa

Angel Manjarrez

Pablo Maravilla

Angeles Mondragón

Ruben del Muro

Agustín Plancarte.

Dra. Ma. Teresa Rabiela

Patricia de la Torre

Dayana, Lilia, José

A las personas que de alguna forma contribuyeron a la realización de esta tesis, a:

La Sra. Aurora.
La Srita. Mónica
El Sr. Jorge (fotógrafo)
El Sr. Enrique (dibujante)
El Sr. Juan Rojas
La Srita Evangelina

A mis amigos:

Yuriri Bernal	Heidi Moyao
Ivan Proaño	Jorge Luis de la Rosa
Julio Reyes	Olivia Sánchez
Verónica Vallejo	Teresa Negrete
Juan Conde	Sofía Fragoso
José Antonio Ibarra	América Mandujano
Yolanda Medina	Zoila Morales

A mi padre.....

por su cariño

A mis hermanas.....

Edith
Laura
Abigail
Mayela

A Héctor Macías

A mis sobrinos

Annalí, Eliud, Gaby, Isaí, Huri, Kirey y Miguel.

A las familias García Hernández, Manzano Delgadillo, Manzano Olivera, Quezada García, Pineda Manzano y Xiu Manzano,

Este trabajo fue financiado por la Comunidad Económica Europea.
Contrato CI1* 0392. ME (JR).

Durante el desarrollo de este trabajo, la autora fue becaria del
Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT),
al cual hace patente su agradecimiento

**"CARACTERIZACION DE CLONAS DE cDNA DE *Taenia solium*
IDENTIFICADAS CON ANTICUERPOS ANTI CISTICERCO"**

I N D I C E

RESUMEN	1
I. INTRODUCCION	
1.0 Generalidades	1
1.1 Clasificación	1
1.2 Ciclo de vida	2
1.3 La cisticercosis humana	7
1.4 Tratamiento	8
1.5 Diagnóstico	10
2.0 Clonación y expresión de genes	14
2.1 Antecedentes	14
2.2 Expresión recombinante	14
2.2.1 Bibliotecas de DNA genómico	15
2.2.2 Bibliotecas de cDNA	17
2.3 Hospederos y vectores	18
2.3.1 <i>Escherichia coli</i>	18
2.3.2 Bacteriófagos de <i>E. coli</i>	21
2.3.2.1 λ gt11	22
2.3.2.2 Otros fagos	22
2.3.3 Plásmidos de <i>E. coli</i>	23
2.3.4 Vectores de eucariotes	24
3.0 Aplicación de la ingeniería genética al estudio de los parásitos	27
3.1 Parásitos protozoarios	27
3.2 Parásitos asquelmintos	28
3.3 Parásitos platelmintos	29
II. HIPOTESIS	33
III. OBJETIVOS	34
IV. MATERIALES Y METODOS	35
1.0 Obtención de sueros hiperinmunes anti GP42	35
1.1 Electrotransferencia de la LLGP	35
1.2 Inmunización de ratones	36
1.3 Comprobación de la producción de anticuerpos	36
2.0 Adsorción de sueros con extractos bacterianos	37
3.0 Titulación y amplificación de la biblioteca	39
4.0 Tamizado de las bibliotecas	39
4.1 Tamizado con anticuerpos	39
4.2 Tamizado con la sonda radioactiva	40
5.0 Generación de lisógenos recombinantes	41

6.0 Síntesis de las proteínas de fusión	41
6.1 Crecimiento de las clonas lisogénicas e inducción de β -gal	41
6.2 Lisis celular	42
6.3 Purificación de las proteínas de fusión	42
7.0 Identificación de las proteínas de fusión	43
7.1 Identificación con tinción de plata	43
7.2 Identificación por IET	43
8.0 Purificación del DNA de los fagos recombinantes	44
9.0 Obtención del inserto de cDNA de los fagos recombinantes	44
9.1 Obtención con la enzima de restricción EcoRI	44
9.2 Obtención por la reacción en cadena de la polimerasa	45
10.0 Marcaje radioactivo del inserto de cDNA	47
10.1 Método de "random priming"	47
10.2 Método de marcaje en un extremo con la enzima polinucleótido cinasa	47
11.0 Transferencia de DNA a membrana de nylon (Southern blot)	47
12.0 Secuenciación del inserto	48
IV. RESULTADOS	49
1.0 Obtención de sueros hiperinmunes anti GP42	49
2.0 Adsorción de sueros	49
3.0 Tamizado de la biblioteca con anticuerpos	52
4.0 Tamizado de la biblioteca con la sonda radioactiva	52
5.0 Obtención de las proteínas de fusión de las clonas lisogénicas y su identificación por IET	52
6.0 Obtención de los insertos de cDNA de las clonas positivas	64
7.0 Southern blot	64
8.0 Secuencia del inserto	68
V. DISCUSION	69
VI. BLIOGRAFIA	78

R E S U M E N

La cisticercosis es una parasitosis causada por el cisticerco de *Taenia solium* que afecta al ser humano y al cerdo y es considerada un problema de salud pública y de economía ganadera en varios países en vías de desarrollo. Debido a la diversidad sintomatológica de la neurocisticercosis humana, se han diseñado varios métodos inmunológicos de diagnóstico, entre ellos se encuentra la inmunoelectrotransferencia (IET) que emplea como antígeno una fracción enriquecida en glicoproteínas (GPs) del cisticerco y es 100% específica y 98% sensible. Las GPs más frecuentemente reconocidas por los anticuerpos de los enfermos con neurocisticercosis son las GP50, GP42 y GP24. El proceso de purificación de la fracción de GPs, implica un enorme esfuerzo, consumo de tiempo y de reactivos considerable y las cantidades obtenidas son restringidas. La clonación y expresión de genes eucariotes en *E. coli* ha permitido obtener proteínas recombinantes útiles para el inmunodiagnóstico de diferentes parasitosis, por lo que se considera a esta tecnología como una alternativa rápida, abundante, económica y específica para la obtención de antígenos.

El objetivo del presente trabajo fue identificar clonas de una biblioteca de cDNA de *T. solium* construida en λ gt11, que expresen a la GP42 como antígeno recombinante y evaluarlas frente a muestras de sueros y líquidos cefalorraquídeos (LCR) de enfermos con neurocisticercosis.

Se purificó la GP42 y se inmunizaron ratones. Los sueros se adsorbieron con extractos de *E. coli* y se realizaron los tamizados de la biblioteca. Se obtuvieron siete clonas positivas (clonas 1,4,5,7,9,12,13). Se generaron lisógenos recombinantes con los fagos de estas clonas en *E. coli* Y 1089 y se verificó la producción de las proteínas de fusión por IET con los extractos de bacterias lisadas y anticuerpos contra β -galactosidasa (β -gal). Las clonas 7, 12 y 13 expresaron proteínas de peso molecular mayor al de β -gal en sobrenadantes y precipitados; mientras que en las clonas 1 y 9 las bandas observadas fueron menores a β -gal. Se verificó por IET la antigenicidad de las proteínas de fusión con mezclas de sueros ó de LCR de enfermos con neurocisticercosis previamente adsorbidos. Las 7 clonas presentaron bandas que no fueron reconocidas por la clona Y, que es una clona infectada con el fago silvestre. Posteriormente se purificaron las proteínas de fusión de las clonas 7, 9, 12, 13 y se analizaron por IET empleando la mezcla de sueros; se observó una banda de 65 kDa.

Se purificó el DNA de todas las clonas y se realizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con iniciadores de Gibco BRL y con otros sintetizados en la UNAM. Los tamaños de los insertos obtenidos con los primeros fueron de 90 a 360pb en las diferentes clonas y solo en la clona 5 se obtuvieron insertos de 90, 600 y 1000pb con los segundos. Se intentó purificar los insertos de 360pb sin éxito, en cambio se purificó el inserto de 600pb de la clona 5, se marcó radioactivamente y se utilizó como sonda en un Southern blot utilizando DNA de *T. solium* y de *T. saginata* digeridos con EcoRI y HindIII, solo hibridó con su DNA homólogo.

Por último, se secuenció el inserto de 600pb, se dedujo la secuencia de aminoácidos a partir de la secuencia de nucleótidos obtenida y se obtuvo una homología del 19.5% con un precursor de una GP del virus SV5, por lo que no se consideró como significativa.

Los resultados obtenidos en las IET con las proteínas de fusión y los anticuerpos indican la obtención de clonas que sí expresan proteínas de *T. solium*. Sin embargo, los resultados obtenidos con el inserto de la clona 5 demuestran que el fragmento de 600pb no codifica ninguna proteína de *T. solium*. Una posible explicación a estos resultados contradictorios sería que el inserto de la clona 5 es un artefacto producido por la amplificación por PCR con iniciadores que contienen secuencias de reconocimiento por BamHI y HindIII adyacentes debido a que estas secuencias se encuentran muy cercanas en el DNA de λ gt11, lo que permitiría el reconocimiento de los iniciadores en esta zona y la amplificación de un fragmento de DNA del mismo fago.

I N T R O D U C C I O N

1. GENERALIDADES

La cisticercosis es una parasitosis causada por el metacéstodo de *Taenia solium* (Linnaeus, 1758) cuando se establece en el sistema nervioso central (SNC), el ojo, el músculo esquelético y el tejido subcutáneo tanto del hombre como del cerdo (Flisser, 1988).

La cisticercosis está ampliamente distribuida en países en vías de desarrollo donde predominan las malas condiciones higiénicas y una incipiente industria porcina, además de una deficiente educación para la salud. La cisticercosis es endémica en el sureste de Asia no islámico, la parte central y sur de Africa y en América Latina (Mahajan, 1982; Schenone y col., 1982). México y Brasil son los países más afectados del continente americano (Sarti, 1989). Las características de la enfermedad hacen que se considere un problema de salud pública debido al alto costo médico que implica el tratamiento de los enfermos con neurocisticercosis y un problema económico debido a las cuantiosas pérdidas ocasionadas por el decomiso de la carne de cerdo infectada.

1.1 CLASIFICACION

Clasificación descrita por Ehlers, 1985 y 1986:

Dolyopharyngiophora
 Neodermata
 Cestoda
 Eucestoda
 Cyclophyllidea
 Taeniidae
 Taenia
 Taenia solium (Linnaeus, 1758)

1.2 CICLO DE VIDA

La *Taenia solium* es un helminto hermafrodita, cuyo estado adulto vive en el intestino delgado del ser humano, en donde logra sobrevivir hasta 20 años induciendo sintomatología mínima (Flisser, 1988). Tiene un cuerpo aplanado de color blanquecino que mide entre 1.5 y 5m de largo, pudiendo alcanzar hasta 8m de longitud (Figura 1). El cuerpo del adulto se divide en tres regiones: el escólex, el cuello y el estróbilo. El escólex es piriforme y mide de 0.6 a 1mm de diámetro (Figura 2); como órganos de fijación, presenta cuatro ventosas musculares de 0.5mm de diámetro y un rostelo formado por dos coronas concéntricas de 11 a 14 ganchos cada una. Estos ganchos pueden medir de 0.10 a 0.16mm (Gemmell y col., 1983). El cuello es la región germinal poco diferenciada a partir de la cual se genera el estróbilo (Figura 2). El estróbilo, que constituye la mayor parte del cuerpo, está formado por una cadena de numerosos segmentos llamados proglótidos (Figura 1), cada uno de los cuales forman una unidad de reproducción; son de tres tipos: los inmaduros, que son los más cercanos al cuello y no poseen órganos sexuales diferenciados. Los maduros en los cuales ya se aprecia un ovario trilobulado y un promedio de 375 a 575 testículos (Figura 3) y finalmente se encuentran los proglótidos grávidos, que son los de mayor tamaño y miden de 5 a 20mm de largo y de 5 a 6mm de ancho. En éstos se observa un saco uterino central que presenta de 7 a 13 ramas laterales conteniendo hasta 60,000 huevos cada uno (Gemmell y col., 1983; Flisser y col., 1991).

Cuando el parásito ha alcanzado un tamaño promedio de 220cm de longitud (aproximadamente 3 o 4 meses después de la infección) se empiezan a desalojar uno o más proglótidos grávidos periódicamente junto con las heces (Gemmell y col., 1983). En el ambiente los proglótidos se pueden desintegrar liberando a los huevos los cuales pueden ser ingeridos por el cerdo o el ser humano (Cheng, 1978).

Los huevos de *T. solium* (Figura 4) miden de 30 a 40 μ m de diámetro, poseen varias envolturas: la más externa es el vitelo que generalmente se pierde en la heces; la siguiente es el embrióforo, formado por bloques de una proteína similar a la queratina (Trejo, 1986) y unidos entre sí por una proteína cementante, los que dan a los huevos su aspecto radiado característico y la resistencia al medio. Finalmente se encuentra la membrana oncosferal que rodea a la oncosfera o embrión haxacanto (Laclette y col., 1982). La oncosfera está formada por un complejo sistema muscular que mueve a los tres pares de ganchos, posee un par de glándulas que ayudan a la penetración en la mucosa intestinal, así como un sistema nervioso primitivo y células germinativas a partir de las cuales se desarrollará el siguiente estadio de desarrollo llamado cisticerco ó metacéstodo.

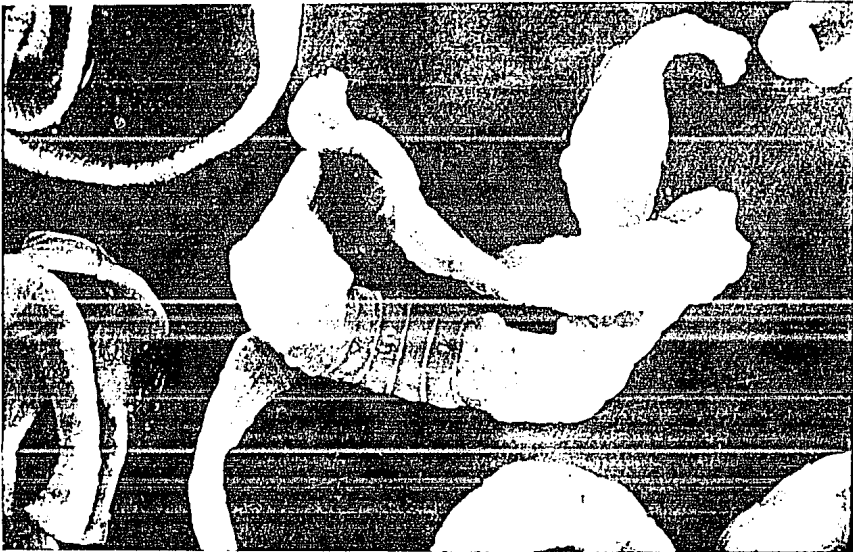


FIGURA 1. Estado adulto de *Taenia solium* (donada por la Dra. Ana Flisser).

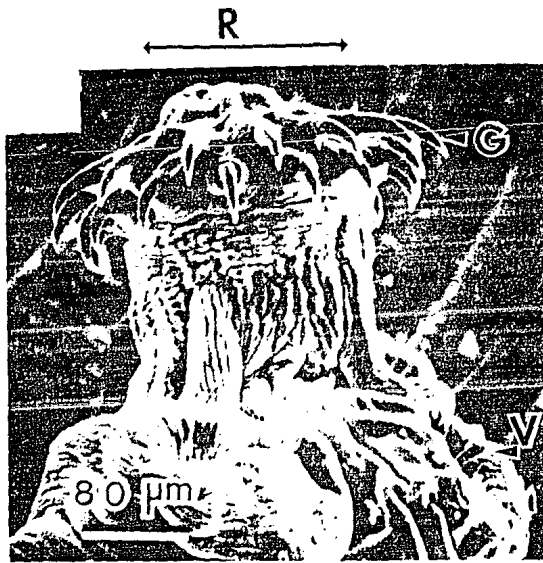


FIGURA 2. Microscopía electrónica de barrido del escólex de *Taenia solium*. R: rostelo, V: ventosa, G: ganchos (Reproducida de Cañedo y col., 1982).

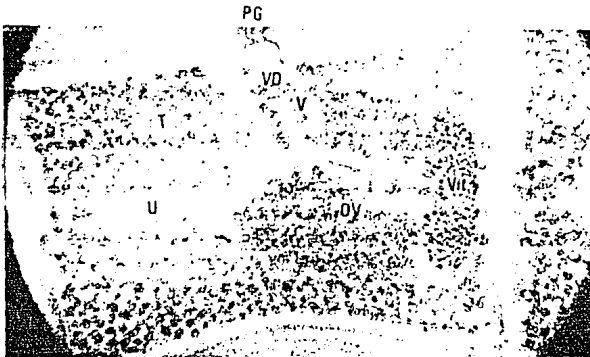


FIGURA 3. Fotografía de un proglótido maduro de *Taenia solium*. VD: vaso deferente, OV: ovario, Vit: vitelaria, T: testículos, V: vagina, PG: poro genital, U: útero, (donada por la P. de Biol. Laura Aguilar Vega)

El hombre y el cerdo adquieren cisticercosis por ingerir huevos de *T. solium*. La larva eclosiona estimulada por el bajo pH, los jugos gástricos y los intestinales (Silverman, 1954). En la primera fase de la eclosión, el cemento que une a los bloques del embrióforo se degrada por la acción de las enzimas proteolíticas estomacales estableciendo la comunicación de la oncosfera con el medio exterior (Laclette y col., 1982). La oncosfera se libera de la membrana oncosférica por la acción de enzimas intestinales y con ayuda de sus ganchos y posiblemente por sus secreciones enzimáticas, penetra a través de la pared intestinal, se transporta a través de la circulación y se puede implantar principalmente en músculo esquelético, SNC, ojo y tejido subcutáneo, desarrollándose en metacéstodo o cisticerco (Figura 5; Yoshino, 1933 a, b; Schenone y col., 1982).

En 1933, Yoshino infectó a cerdos, alimentándolos con huevos de *T. solium* y después de establecerse la oncosfera y desarrollarse en cisticerco, encontró que éste medía de 1 a 4mm a los 20-30 días de la infección y de 6 a 9mm a los 60-70 días. En este tiempo, el escólex estaba completamente formado con su doble corona de ganchos y sus cuatro ventosas. Observó que medía de 8 a 15mm de los 177 a 325 días después de la infección (Yoshino, 1933 a).

El cisticerco de *T. solium* está formado por una vesícula ovalada y translúcida llena de fluido vesicular. Mide de 0.5 a 2cm de diámetro y en su interior se encuentra el escólex invaginado. El rostelo se forma entre los 40 y 50 días, y a los 60-70 días, el cisticerco tiene su cuello elongado enrollado dentro del receptáculo, formando muchos pliegues que constituyen el canal espiral (Yoshino, 1933a). La superficie de la pared vesicular está cubierta de unas estructuras denominadas microtrícas limitadas por la membrana plasmática la cual está cubierta por una capa de glicocalix (Ramírez-Bon y col., 1982). Por debajo de la membrana plasmática, el tegumento se encuentra repleto de vesículas elipsoidales de diferentes tamaños; una banda protoplásmica continua limita al tegumento en la parte interna. Esta banda está sostenida por una membrana de tejido conectivo interrumpido por pliegues del sincicio conectando de esta forma al tegumento con los cuerpos celulares nucleados. A través de esta superficie ocurre el intercambio metabólico entre el hospedero intermediario y el parásito, ya que también carece de sistema digestivo (Lumsden y col., 1982, Flisser, 1994).

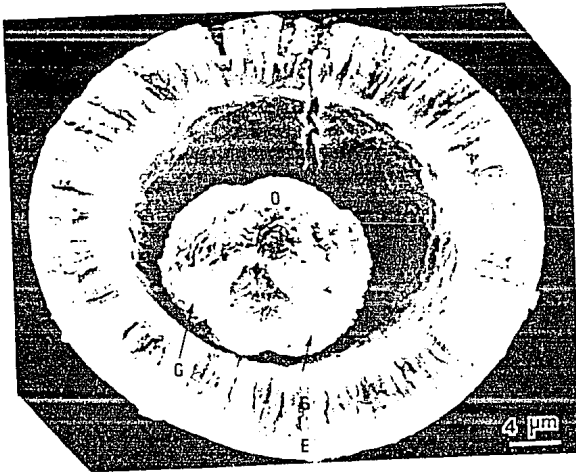


FIGURA 4. Micrografía electrónica de barrido de un huevo de *Taenia solium*. E: embrióforo, O: oncosfera, G: ganchos oncosferales (reproducida de Laclette y col., 1982).

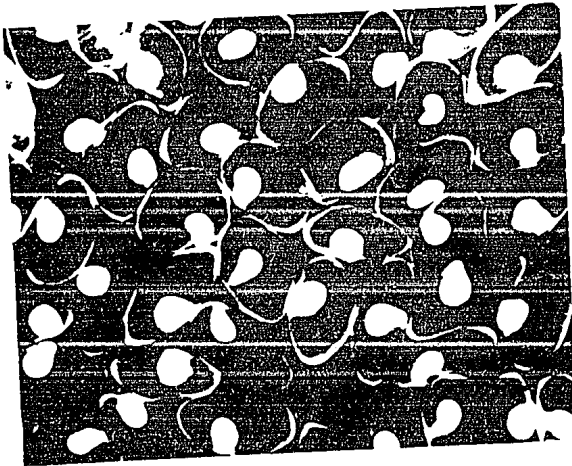


FIGURA 5. Fotografía de metacéstodos de *Taenia solium* (donada por la Dra Ana Flisser).

El cisticerco establecido en el sistema nervioso del ser humano, puede ser celuloso o racemoso. El tipo celuloso mide de 0.5 a 1.5cm, la vesícula puede ser esférica u ovalada, de color blanquecina o amarillenta. La pared vesicular es translúcida, a través de la cual se observa el escólex con apariencia de un gránulo sólido excéntrico. Estas características morfológicas se observan en cisticercos extirpados de cerebro o de músculo, tanto de seres humanos como de cerdos. Al ser separados del tejido del hospedero, es frecuente que se observe una cápsula delgada de colágena dentro de la cual el cisticerco permanece vivo (Escobar, 1983; Aluja y col., 1987; Rabiela, y col., 1989).

El cisticerco racemoso presenta una vesícula lobulada, lo que asemeja con un racimo de uvas, este tipo de cisticercos es el más grande, mide de 10 a 20cm y en su interior puede contener hasta 60ml de fluido vesicular (Berman y col., 1981; Jung y col., 1981). El escólex es difícilmente observable y sólo se puede demostrar su presencia en algunos casos realizando cortes histológicos detallados casos (Berman y col., 1981; Rabiela y col., 1982; Escobar, 1983).

Algunos estudios han revelado que ambos tipos de cisticercos pueden co-existir en el mismo cerebro en un 9 a 13%. Sin embargo, el cisticerco celuloso es el más común (Rabiela y col., 1979 y 1982; Saquímux y Fernández, 1990). Recientemente Rabiela demostró la presencia de formas intermediarias bilobuladas, con el escólex visible claramente como en el cisticerco celuloso, lo que sugiere que el racemoso proviene del celuloso (Rabiela y col., 1982, 1985 y 1989).

El ciclo de vida se completa cuando la carne mal cocida de un cerdo infectado es ingerida por el hombre. En el estómago, el cisticerco evagina por la acción de la tripsina, así como las sales biliares y se fija a la pared intestinal, desarrollándose progresivamente en una tenia adulta, infección conocida como teniasis (Cheng, 1978; Flisser, 1988) (Figura 6).

1.3 LA CISTICERCOSIS HUMANA

La cisticercosis humana es variable, la que se trata con mayor frecuencia en México es la cisticercosis cerebral o neurocisticercosis, debido al establecimiento del metacéstodo en el parénquima, en el espacio subaracnoideo o en las cavidades ventriculares del SNC (Figura 7). La cisticercosis ocular se debe al establecimiento del parásito dentro del globo ocular o detras de la retina (Figura 8); menos frecuentes son los casos de cisticercosis subcutánea y muscular (Figura 9; Schenone y col., 1982; Zenteno-Alanis, 1982).

La neurocisticercosis humana es uno de los padecimientos de mayor importancia entre las parasitosis prevalentes en México. Por medio del análisis de casos de autopsia, se ha encontrado que alrededor del 2% de los cadáveres tienen cisticercos en el cerebro (Mazzotti, 1944; Pérez-Tamayo y Flores, 1958; Briceño y col., 1961; Zenteno-Alanis, 1966; Rabiela y col., 1972; Martuscelli, 1975). El daño que produce el cisticercos al ser humano cuando se establece en el SNC es variable, ya que puede ser asintomático, pues se han reportado entre un 25% y un 80% en hallazgos de autopsias (Albores y Altamirano, 1971; Rabiela y col., 1982) ó inducir una gran heterogeneidad sintomatológica, desde perturbaciones sensoriales o motoras leves hasta la presencia de crisis convulsivas y cefalea relacionadas con craneo hipertensivo e hidrocefalia (Zenteno-Alanis, 1982; Madrazo y Flisser, 1992).

La cisticercosis ocular, después de la cerebral, es la que más trastornos puede ocasionar al paciente, incluyendo ceguera (Puig-Solanes, 1974; Cardenas y col., 1989). Los cisticercos localizados en el tejido subcutáneo y muscular, generalmente provocan trastornos ligeros o pasan desapercibidos (Zenteno-Alanis, 1982).

1.4 TRATAMIENTO

La neurocisticercosis humana se puede tratar por métodos quirúrgicos ó empleando drogas cestocidas. El uso de neurocirugía depende de la localización y características anatomopatológicas de los cisticercos; se emplea para reducir la hipertensión endocraneana ó para la extirpación de cisticercos intraventriculares (Escobedo y col., 1982; Escobedo, 1989). También se pueden administrar fármacos como: anticonvulsivos, analgésicos, esteroides, diuréticos y psicodrogas para controlar la sintomatología de los pacientes (Escobedo y col., 1982; Flisser, 1988). Un avance importante en el tratamiento de la cisticercosis son las drogas que atacan al parásito. Dos drogas cestocidas han sido de gran utilidad en el tratamiento de algunos casos de neurocisticercosis, así como de cisticercosis muscular y subcutánea: el praziquantel, una pirazin-isoquinoleína acetilada y el albendazol, un derivado benzimidazólico (Flisser, 1994). El praziquantel se ha utilizado ampliamente en esquistosomiasis humana, con alto porcentaje de eficacia (Pearson y Guerrant, 1983; Andrews, 1985), mientras que el albendazol es un antihelmíntico de amplio espectro que se usa en infecciones por céstodos y nemátodos intestinales (Pene y col., 1982).

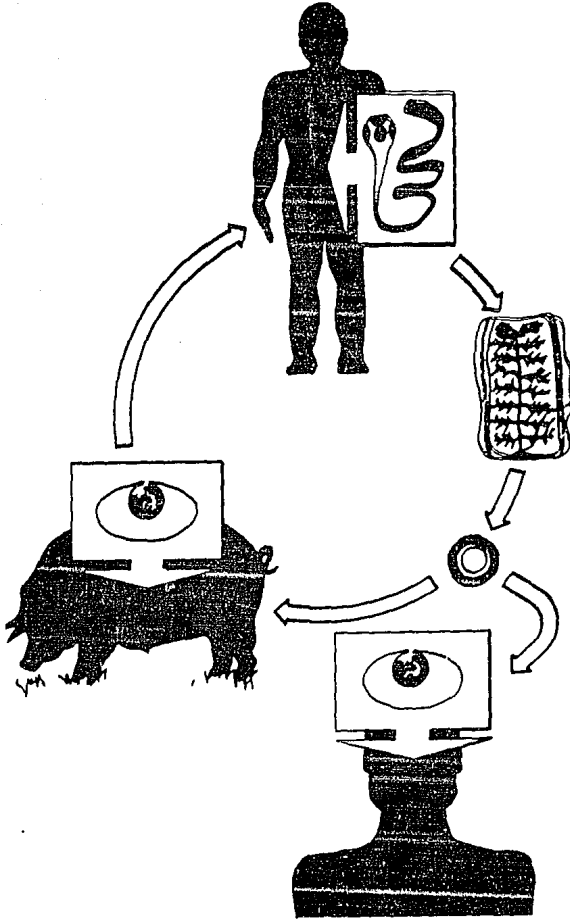


FIGURA 6. Ciclo de vida de *Taenia solium* (reproducida de Aluja y col., 1987).

La primera droga utilizada para el tratamiento de la neurocisticercosis fue el praziquantel y años después el albendazol; algunos estudios toxicológicos y farmacocinéticos en seres humanos, indican que ambas drogas son de absorción rápida y no hay efectos tóxicos en general, ya que sólo en casos raros, la segunda llega a ser hepatotóxica (Leopold y col., 1978; Marriner y col., 1986; Frohberg, 1989). Estos medicamentos son eficientes contra los parásitos vivos localizados en el parénquima cerebral y en posición subaracnoidea (Sotelo y col., 1984; Vasconcelos y col., 1987; Escobedo, 1989). No se usan drogas cestocidas cuando el cisticerco se localiza en los ventrículos ó en el ojo (Flisser, 1988). La dosis precisa de ambas drogas no se ha definido todavía. El praziquantel generalmente se usa a 50mg/kg de peso corporal, tres veces al día durante 15 días (Sotelo y col., 1984 y 1985). El albendazol se administra a 15mg/kg durante 8 días (Escobedo y col., 1987; Alarcón y col., 1989; Sotelo y col., 1988 y 1989). La eficacia del tratamiento cestocida se mide por la reducción del número ó del tamaño de los cisticercos observados mediante técnicas de imagen, mejoramiento clínico y la desaparición de la dilatación ventricular (Sotelo y col., 1989). Cuando se presentan crisis convulsivas, las drogas antiépilépticas son el tratamiento adecuado. Generalmente, las calcificaciones se presentan en el parénquima del cerebro e indican que la infección se adquirió hace un largo tiempo. Las calcificaciones debidas a cisticercosis llegaron a ser visibles aproximadamente entre los 4 y 7 años después de la infección (Dixon y Lipscomb, 1961; Flisser, 1994). Las calcificaciones también pueden aparecer después de una resolución espontánea del cisticerco, lo cual es más frecuente en niños y adolescentes que en adultos (Miller y col., 1983).

1.5 DIAGNOSTICO

Debido a la heterogeneidad de la sintomatología de la neurocisticercosis en los seres humanos, el diagnóstico clínico es difícil de realizar, por lo que se han diseñado métodos muy diversos para el diagnóstico. Las pruebas inmunodiagnósticas y el uso de procedimientos de imagen apoyan el diagnóstico en los enfermos sintomáticos (Aluja y cols. 1987; Flisser, 1988). Actualmente se cuentan con métodos que permiten no solo identificar al parásito, sino también localizarlo con alta precisión, lo que permite diseñar estrategias de tratamiento médico ó quirúrgico (revisado en Correa y col., 1991).

La cisticercosis subcutánea o muscular se determina mediante palpación, por biopsia de los nódulos ó en el material de autopsia donde se demuestra la presencia del parásito (Puig-Solanes, 1974). La cisticercosis ocular puede evidenciarse por medio del oftalmoscopio cuando el parásitos son viables ó reconocibles (Acha y Szifres, 1986), pero se puede diagnosticar erróneamente debido a la reacción inflamatoria ó involución del parásito (Puig-Solanes, 1974)



FIGURA 7. Corte de los hemisferios cerebrales. se observan múltiples cisticercos (donada por el Dr. Juan E. Olivera).



FIGURA 8. Oftalmocisticercosis (donada por el Dr. A. Martuscelli).



FIGURA 9. Cisticercosis muscular (donada por el Dr. A. Martuscelli).

Los métodos de imagen son la tomografía computada (Rodríguez-Carbajal y col., 1989) y la resonancia magnética, éstos son de elección para lograr un diagnóstico preciso de la neurocisticercosis (Aluja y col., 1987). Desafortunadamente estos métodos de diagnóstico son inaccesibles para la mayoría de la población en países en vías de desarrollo debido a su alto costo ó a su ausencia.

Los métodos inmunológicos pueden ser empleados para la detección de casos individuales o para estudios epidemiológicos, siendo la sensibilidad más importante que la especificidad en el primer caso y lo opuesto para el segundo (Gemmell y col., 1983). Se han utilizado diversas pruebas para la búsqueda de anticuerpos anticisticercos tanto en el suero como en el líquido cefalorraquídeo (LCR) de los individuos con cisticercosis. Los exámenes inmunológicos en LCR permiten confirmar el diagnóstico clínico y de imagen (Alarcón de Noya y col., 1989). Sin embargo, no siempre es fácil la obtención de la muestra.

La fijación de complemento se estandarizó en Brasil en 1911 (Moses, 1911) y en México, esta técnica se empleó ampliamente desde 1948 cuando Nieto estudió a 5000 enfermos psiquiátricos y obtuvo el 0.6% de positividad en LCR (Nieto, 1956). Los principales problemas de esta técnica son que los reactivos utilizados se deben estandarizar frecuentemente, y el ensayo no es específico para suero debido a la presencia de complemento intrínseco (Flisser, 1994). En 1975 se estandarizó la inmunolectroforesis en sueros de pacientes con neurocisticercosis (Flisser y col., 1979). También se han utilizado pruebas como la hemaglutinación pasiva, la inmunofluorescencia indirecta (González-Barranco y col., 1989) y la doble inmunodifusión (Flisser y col., 1975). Sin embargo, ninguno fue mejor que la fijación de complemento, hasta el advenimiento del ensayo inmunoenzimático, ELISA. Este último, es uno de los métodos más utilizados en los últimos años y tiene una sensibilidad del 75% en suero, del 85% en LCR y del 100% si se utilizan ambas muestras del mismo individuo (Espinoza y col., 1986). Sin embargo, por el uso de homogenados crudos de cisticercos o fluidos vesiculares, existen reacciones cruzadas con otras parasitosis por helmintos, especialmente con hidatidosis (Espinoza y col., 1986; Olivo y col., 1988). Además los resultados obtenidos en ELISA son cualitativos, ya que no se ha encontrado ninguna correlación entre los valores de absorbancia con los aspectos clínicos del paciente (Flisser, 1994).

La inmunolectrotransferencia (IET) es el método de diagnóstico de uso más reciente y fué desarrollado por Tsang y col. en 1989. La IET es una técnica en la cual los antígenos del parásito se separan por su peso molecular, se transfieren a una membrana de nitrocelulosa (MNC) y se usan para identificar anticuerpos en la muestra (suero, LCR ó saliva) del paciente.

La IET para la cisticercosis, emplea como antígenos glicoproteínas (GPs) de cisticercos de *T. solium* purificadas por cromatografía de afinidad con lentil-lectina sefarosa. Originalmente se evaluaron 532 sueros y 46 LCR de enfermos con tres diferentes parasitosis confirmadas: *Echinococcus granulosus*, *E. multilocularis* y *T. solium*. Las muestras de los enfermos con cisticercosis reconocieron siete bandas específicas de GPs del parásito, estas bandas diagnósticas fueron registradas como: GP50, GP42, GP24, GP21, GP18, GP14 y GP13. Las letras GP denotan la naturaleza glicoprotéica de estos antígenos y los números corresponden a su respectivo peso molecular, analizado en geles de poliacrilamida. Para el diagnóstico de la cisticercosis no es necesario que el enfermo reconozca las siete bandas, es suficiente que la muestra que va a ser analizada reaccione por lo menos con una de las siete bandas para ser considerada como positiva. Los valores de sensibilidad y especificidad obtenidos son de 98% y 100% respectivamente. De las siete GPs, se encontró que las más frecuentemente reconocidas son la GP50, la GP42 y la GP24 (Tsang y col., 1989; Feldman y col., 1990; Wilson y col., 1992; Díaz y col., 1992).

La presencia de anticuerpos en los fluidos orgánicos no es demostración de la presencia del agente causal, sólo indica que el individuo ha estado en contacto con este u otro organismo de reacción cruzada. Debido a ésto, se han desarrollado otros métodos que detectan antígenos del parásito. Correa y col. estandarizaron un ELISA para la detección de antígenos que da una sensibilidad que oscila entre el 70% y 90%. Aunque la sensibilidad de la detección de antígenos es más baja que la obtenida en la detección de anticuerpos, los casos positivos podrían confirmar la presencia del parásito (Correa y col., 1991).

Con respecto a los antígenos empleados para las pruebas inmunológicas, vale la pena señalar que en la mayoría de los estudios realizados se usan extractos totales de cisticercos extirpados de cerdos, presentandose reacciones cruzadas con otros parásitos, por la presencia de diversos componentes protéicos así como otras macromoléculas en estos extractos que pueden interferir o bloquear las reacciones antígeno-anticuerpo, ocasionando una disminución de la sensibilidad y especificidad de las pruebas (Aluja y col., 1987; Correa y col., 1991). El uso de las GPs del cisticerco de *T. solium* ha permitido disminuir considerablemente el problema de reacciones cruzadas, por lo que Plancarte y col. (1994), aislaron la GP24, que es una de las GPs más frecuentemente reconocidas por los anticuerpos de los enfermos y la evaluaron por ELISA e inmunopunto, obteniendo una sensibilidad y especificidad del 100% (Plancarte y col., 1994). Sin embargo, la purificación de las GPs se dificulta porque depende de la obtención de cisticercos de *T. solium* extirpados de la carne de cerdo infectada y porque el proceso tiene un bajo rendimiento.

2. CLONACION Y EXPRESION DE GENES.

La transferencia de información genética de células eucariotes a organismos procaríotes por medio de la manipulación del DNA recombinante, ha facilitado la producción eficiente y controlada de proteínas seleccionadas, cuya obtención se dificulta por la baja concentración en la que se encuentran ó se obtiene, ó por el problema que representa conseguir los organismos de donde provienen (Cohen y col., 1973; Harris, 1983).

2.1. ANTECEDENTES

Inicialmente los biólogos moleculares interesados en obtener las proteínas regulatorias procaríotes, reorganizaron su síntesis para obtenerlas en grandes cantidades mediante un proceso que se llamó sobreproducción, expresión, o sobreexpresión. Las primeras técnicas se basaron en manipulaciones genéticas para seleccionar *in vivo* eventos de recombinación en los cuales insertaban el gen deseado dentro de un bacteriófago. Más tarde la tecnología del DNA recombinante se usó para crear fagos y plásmidos *in vitro*, lo cual aseguraba la síntesis de grandes cantidades de los productos de genes clonados (Ausubel y col., 1987).

En la última década los principales avances en la tecnología de la clonación permitieron mejorar marcadamente la capacidad para construir bibliotecas que expresen las proteínas deseadas y para identificar clones que codifican para cualquier producto de los genes deseados. Se han descrito muchos tipos de bibliotecas, vectores de expresión y métodos de tamizados, (Maniatis y col., 1989; Ausubel y col., 1987).

2.2 EXPRESION RECOMBINANTE

Un vector de expresión ideal es aquel de fácil manipulación y que produce grandes cantidades de la proteína deseada entera, en su conformación nativa y en forma estable; lo que permitiría usar diversos reactivos para el tamizado de la biblioteca, incluyendo ligandos de receptores y anticuerpos monoclonales en contra de determinantes conformacionales, determinantes antigénicos glicosilados ó lipídicos. Desafortunadamente, tal vector no existe, por lo que la expresión recombinante de antígenos de parásitos debe tomar en cuenta diferentes criterios dependiendo de los intereses del investigador. Las bibliotecas de expresión se pueden construir usando DNA genómico ó el mRNA para obtener el DNA complementario (cDNA) como fuente de material genético. Las ventajas relativas de ambas fuentes de DNA se enlistan en el Cuadro I.

Los investigadores en el campo de la parasitología generalmente han usado anticuerpos para realizar el tamizado de bibliotecas de cDNA construidas en el bacteriófago Lambda gt11 (λ gt11) o sus variantes como Lambda Zap (λ Zap; Coppel y col., 1993).

2.2.1 Bibliotecas de DNA genómico.

Las bibliotecas genómicas de expresión se construyen generalmente de DNA cortado o DNA que ha sido parcialmente digerido con DNAasa I y utilizan un vector de expresión. Sin embargo, la presencia de intrones interrumpen el marco de lectura de la secuencia codificadora, lo que ocasiona una terminación prematura de la traducción. Una de las ventajas de este tipo de bibliotecas es la presencia de diferentes secuencias, ya que todas las secuencias de una sola copia están por lo general presentes en la biblioteca con una frecuencia igual. En contraste, en las bibliotecas de cDNA están representadas en proporción a la abundancia de las moléculas de RNA mensajero (mRNA). Además las proteínas expresadas en diferentes estados del ciclo de vida están presentes en la biblioteca genómica. Generalmente, estas bibliotecas se construyen con menores cantidades de material del parásito.

Cuadro I. Propiedades de las bibliotecas de expresión derivadas de diferentes fuentes de DNA.

PROPIEDADES	cDNA	DNA GENOMICO
Número de clonas requeridas para representar el genoma completo	Pocas	Muchas
Interrupción de la expresión por intrones	No	Si
Cantidad de DNA necesario	Nada	Poco
Cantidad de mRNA necesario	Mucho	Nada
Construcción de la biblioteca	Difícil	Fácil
Frecuencia de clonas que expresan proteínas abundantes	Mayor	Menor
Frecuencia de clonas que expresan proteínas poco abundantes	Menor	Mayor
Contiene secuencias de proteínas de todos los estados del ciclo de vida	No	

2.2.2 Bibliotecas de cDNA.

La construcción de las bibliotecas de cDNA es más complicada que la de las bibliotecas genómicas por la dificultad que representa la obtención del mRNA, ya que es muy lábil. Sin embargo, una biblioteca de cDNA es mejor para realizar el tamizado empleando anticuerpos, pues se pueden obtener más fácil que obtener la secuencia de aminoácidos de una proteína deseada para determinar las secuencias de iniciadores específicos necesarios para realizar el tamizado. Las secuencias de intrones no interfieren con la expresión y generalmente, se necesitan muy pocas clonas para realizar el tamizado e identificar el producto deseado.

La biblioteca de cDNA representa a la población del mRNA y se construye a partir de mezclas de RNA poliadenilado (RNA poli-A) de los tejidos o tipos celulares en estudio (Huynh y col., 1985). Para la síntesis del cDNA se utiliza la enzima DNA polimerasa dependiente de RNA, comunmente conocida como transcriptasa reversa, y se puede obtener del retrovirus que causa la mieloblastosis en las aves. El RNA poli-A se emplea como molde y como iniciador un oligonucleótido sintético que contiene varias timinas (Efstratiadis y col., 1976). El producto es un híbrido del mRNA y el cDNA; al adicionar la RNAasa H se producen "huecos" en el RNA originando los fragmentos de Okazaki que funcionan como iniciadores y permiten la síntesis de la segunda cadena de DNA, empleando la DNA polimerasa I (DNA pol I) de *E. coli* (Maniatis y col., 1989). Los fragmentos de cDNA de doble cadena generados se tratan con la metilasa Eco RI y S-adenosil-metionina como fuente de grupos metilos, y de esta forma proteger los sitios de reconocimiento para Eco RI dentro del cDNA antes de la digestión con Eco RI. Posteriormente se realiza un breve tratamiento con DNA pol I que permite incrementar el número de moléculas de cDNA con extremos "rasurados" (Seeburg y col., 1977).

Los extremos del cDNA se fusionan con los oligonucleótidos sintéticos conocidos como ligandos, que tienen el sitio específico donde corta la enzima Eco RI, el exceso de ligandos se elimina a través de una columna A-50m Bio-Gel, después de haber digerido con la enzima ya que el exceso interfiere con la inserción del cDNA en el DNA del vector previamente digerido con Eco RI. La purificación a través de la columna también permite seleccionar los fragmentos de cDNA del tamaño deseado (Maniatis y col., 1989; Huynh y col., 1985, Figura 10).

2.3. HOSPEDEROS Y VECTORES.

2.3.1 *Escherichia coli*

Uno de los organismos procariontes que más se estudió durante las décadas de 1960 y 1970 fue *E. coli* y se obtuvo un gran conocimiento de su biología. La tecnología actual del DNA recombinante, es una extensión de los análisis genéticos y bioquímicos realizados en ese tiempo. Aún antes del avance de la clonación y expresión molecular, se utilizaron cepas de *E. coli* alteradas genéticamente para producir grandes cantidades de proteínas de interés científico. Cuando las técnicas de clonación se aplicaron, la mayoría de los científicos utilizaron a *E. coli* como hospedero de los diversos vectores.

La bacteria hospedero posee dos características que la hacen ideal como sistema de expresión para muchos tipos de proteínas: es muy fácil de manipular y crece rápidamente en medios de bajo costo. Estas características, aunadas a la experiencia en la expresión de genes extraños, han establecido a *E. coli* como el líder de los organismos hospederos en la mayor parte de las aplicaciones científicas de expresión de genes.

El cromosoma de *E. coli* es circular y tiene 3 millones de pares de bases (pb). Posee el operón de la lactosa (operón *lac*), que está compuesto por tres genes estructurales (*lacZ*, *lacY* y *lacA*) involucrados en la síntesis y degradación del azúcar de la leche, la lactosa, (4-O-β-D-galactopiranosil-δ-glucosa, C₁₂H₂₂O₁₁). Entre ellos es de primordial importancia el gen *lacZ* que expresa a la proteína β-galactosidasa (β-gal), enzima que corta a la lactosa originando, por un lado, glucosa y por otro galactosa (Ptashne, 1986). A estos genes les precede en dos centros de control: el promotor y el operador. El gen *lacI* que codifica para el represor Lac y cuando el represor se une al operador impide que la RNA polimerasa transcriba los genes adyacentes. Pero cuando un inductor como el isopropil-β-D-tio-galactopiranosido (IPTG) que es un derivado semejante a la lactosa, se une al represor, modifica la estructura, de tal forma que el represor pierde la afinidad por el operador y se induce la síntesis de β-gal (Lehninger, 1985).

E. coli también posee un mecanismo de protección para eliminar proteínas extrañas ó anormales: el gen *lon* expresa a la proteasa Lon, cuyas síntesis aumenta con la síntesis de péptidos recombinantes. El uso de cepas *lon*⁻ puede disminuir la degradación de proteínas de fusión (Goff y Goldberg, 1985).

Existen algunas cepas de *E. coli* que son *lon*⁻, como son las cepas RY1090 y RY1089. La cepa RY1089 se derivó de la cepa BNN103 por transformación con el plásmido pMC9. Contiene la mutación *hlf 150* (alta frecuencia en lisogenia), no lleva la supresión *supF*, lo cual la hace resistente a la lisis y carece de el operón *lac*. La expresión de proteínas extrañas está controlada por los altos niveles del represor Lac, producto del gen *lacI* expresado por el plásmido pMC9 (Young y Davis, 1983a y b). Esta cepa se utiliza para la producción lisógenos de λ gt11, los cuales crecen a 30°C antes de ser inducidos a la fase lítica a 42°C (Huynh y col., 1985).

La cepa RY1090 se utiliza para el tamizado inmunológico de las bibliotecas y para la propagación de λ gt11 y λ 18-23 (Young y Davis, 1983a y b; Jendrisak y col., 1987) y es similar a la cepa RY1090, excepto que carece de la mutación *hlf 150* y lleva la mutación *supF*, lo que permite la lisis de la célula. Por ser *lon*⁻ puede incrementar la estabilidad de los antígenos recombinantes para el tamizado por anticuerpos (Young y Davis, 1983a y b).

SINTESIS DE cDNA

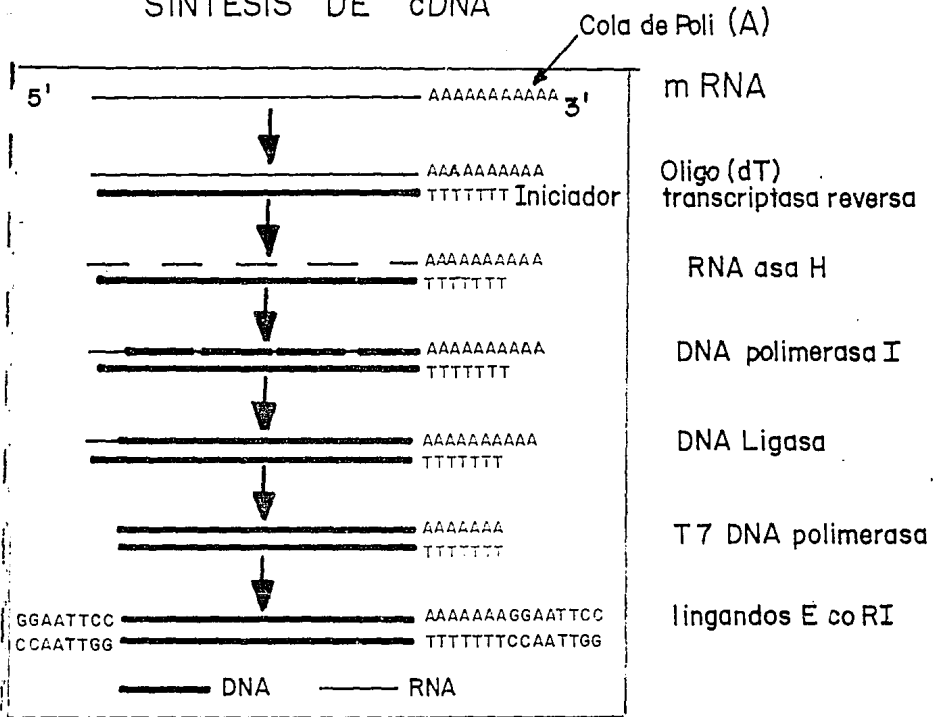


FIGURA 10. Construcción de una biblioteca de cDNA (reproducida de Maizels y col., 1991)

2.3.2 Bacteriófagos en *E. coli*

Los bacteriófagos son eficientes como vectores por el número de clonas generadas por microgramo de cDNA, que es varios órdenes de magnitud más alto que el encontrado para plásmidos. Además, los métodos empleados para manipular gran número de fagos y realizar el tamizado son mucho más fáciles (Young y Davis, 1983a y b).

Uno de los bacteriófago que más se ha utilizado para construir vectores ha sido el bacteriófago λ . Su genoma contiene múltiples sitios para muchas enzimas de restricción lo que resulta muy útil para la clonación de genes. Además, estos sitios se localizan en regiones del genoma esenciales para el crecimiento lítico de los virus. El genoma del fago λ es una molécula de DNA de doble cadena de 50Kb aproximadamente. Las partículas fágicas llevan el DNA como una molécula lineal de doble cadena con extremos complementarios de una sola cadena de 12 nucleótidos (extremos cohesivos cos). Rápidamente, después de entrar a la bacteria estos extremos son sellados por la DNA ligasa del hospedero para generar moléculas de DNA circular, que sirven como molde para la transcripción durante la fase temprana de la infección. Durante esta fase, se pueden seguir dos vías de replicación:

En la fase lítica, en la cual el DNA viral se replica muchas veces, un gran número de genes son expresados. La progenie de partículas fágicas se ensamblan y las células eventualmente se lisan, liberando nuevas partículas infecciosas. Durante esta fase se expresan dos genes cuyos productos son las proteínas S y R. Mutaciones en el gen *s* impiden la lisis, permitiendo el ensamblaje de las partículas para continuar durante un largo período. Las partículas intracelulares acumuladas se liberan por la lisis de las células con cloroformo. Por lo tanto, la mayoría de los vectores llevan una mutación *s*⁻.

En la fase lisogénica, el genoma del bacteriófago se integra en el DNA de la bacteria por recombinación sitio-específico, por lo que se replica y es transmitido a la progenie bacteriana como cualquier otro gen cromosomal (profago). Durante la lisogenia, un solo gen del bacteriófago es expresado: el gen *cI*, el cual codifica para el represor. Con la comprensión del operón Lac, simultáneamente se desarrolló la de la regulación de los genes de λ , ya que se encontró que ambos estaban controlados por represores. En los lisógenos, el represor prácticamente reprime a todos los genes del profago requeridos para la llevar a cabo la fase lítica (Ptashne, 1986).

Se han generado diversos vectores a partir de λ , entre los que se encuentran λ gt10 y λ gt11. La combinación estándar vector/hospedero es el bacteriófago λ gt11-*E. coli* cepa RY 1090 (Young and Davis, 1983a y b).

2.3.2.1 λ gt11.

El bacteriofago λ gt11 (Young and Davis, 1983a y b), es un vector de inserción diseñado para permitir la expresión de genes clonados. El DNA cromosomal de λ gt11 es de 43,700pb y se observa en la Figura 11 en forma lineal como se encuentra en partículas fágicas. El genoma se puede cerrar durante la infección a través de el apareamiento de los extremos cohesivos cos. Este vector usualmente se utiliza para realizar tamizados inmunológicos.

El genotipo de λ gt11 es:

λ *lac5* Δ *shndIII* λ 2-3 *srl* λ 3° *clts857* *srl* λ 4° *nin* 5 *srl* λ 5° *Sam100*.

lac5 indica que el gen de β -ga (*lacZ*) se insertó en el genoma del fago y sólo contiene un sitio único que es reconocido por la enzima Eco RI, localizado a 53pb antes del codón de termino de *lacZ*. Por lo tanto, el cDNA extraño se inserta en este sitio único, obteniendo una proteína fusionada a β -gal no funcional de 114 kDa.

clts857 indica una mutación sensible a la temperatura en el gen del represor del fago, lo que significa que el fago sólo producirá placas de lisis en la bacteria hospedera cuando se crezca a la temperatura permisible de 42°C .

Δ *shndIII* λ 2-3 y *nin* 5 son deleciones de regiones no esenciales del cromosoma, por lo que se pueden ligar en el vector insertos de DNA extraño hasta de 7.2kb.

Sam100 denota la presencia de una mutación ambar en el gen *S*. Esto inhibe la lisis en células hospederas normales (ó que carecen del supresor *supF*, como la cepa RY1089), permitiendo la acumulación intracelular de las proteínas recombinantes. En los hospederos que tienen la mutación *supF* (cepa RY 1090), el fago causará lisis permitiendo la propagación del bacteriofago (Maizels y col., 1991).

2.3.2.2 Otros fagos

Se han descrito numerosas variantes de fagos vectores incluyendo λ amp3 que es un derivado de λ gt11 el cual lleva un inserto de 1.7kb que contiene el gen de β -lactamasa confiriendo resistencia a ampicilina. Aún cuando se reduce la capacidad de clonación a 5.5kb con la presencia de este inserto, la resistencia a ampicilina simplifica considerablemente la selección de los lisógenos (Kemp y col., 1983).

El vector λ gt22 (Promega Corporation, Madison, WI) es un derivado de λ gt11 con un sitio múltiple de clonación sintético que contiene sitios únicos para *NotI*, *XbaI*, *Sall* y *EcoRI*. Esto permite la clonación unidireccional del cDNA y teóricamente se incrementa dos veces la expresión de clones en la biblioteca, porque todos los insertos son clonados en la dirección correcta para la expresión.

Los vectores λ Zap y λ Zap II (Short y col., 1988), son bacteriófagos λ que contienen la secuencia del fagémido pBluescript. Los insertos se clonan dentro de un sitio múltiple de clonación de este fagémido y pueden ser expresados como proteínas de fusión con β -gal con la inducción de IPTG. El fagémido se puede cortar del fago λ y empaquetarse en partículas fágicas como M13 *in vivo* superinfectando lisógenos *E. coli* con el fago ayudador parecido a M13, el cual provee funciones genéticas no presentes en λ Zap. Este fago parecido a M13, se puede usar para infectar *E. coli* dando células transformadas con el inserto clonado en el plásmido pBluescript. Este sistema elimina algunos problemas durante la subclonación de los vectores λ , pero la expresión de las proteínas de fusión es baja y variable.

2.3.3 Plásmidos en *E. coli*

Recientemente se han descrito numerosos vectores de expresión basados en plásmidos, en los cuales la secuencia extraña se expresa como polipéptido fusionado a secuencias del vector que se unen con alta afinidad a otra proteína. Los productos de expresión se pueden purificar rápidamente en grandes cantidades. Algunos ejemplos incluyen :

La serie de vectores pGEX (Pharmacia, Piscataway, N.J.) que permiten insertar genes en la región carboxilo terminal de la proteína glutatión-S-transferasa de *Schistosoma japonicum*. Los tres vectores pGEX-1, pGEX-2 y pGEX-3, permiten la subclonación de insertos *EcoRI*, *BamHI* y *Sall* e cualquiera de los tres marcos de lectura abiertos. La proteína de fusión se purifica por la adsorción a glutatión-agarosa. El vector pGEX-2, tiene un sitio sintético donde corta la trombina y pGEX-3 un sitio donde corta el Factor Xa, ambos localizados entre la glutatión-S-transferasa y la proteína insertada. Posteriormente se corta y se purifica la proteína de interés a través de una columna de afinidad (Smith y Johnson, 1988).

El plásmido pMAL (New England Biolabs, Beverly, MA) cuya proteína de interés se fusiona al extremo carboxilo terminal de la proteína que se une a maltosa, la cual tiene afinidad por la amilosa, por lo que se puede purificar con una resina de amilosa y eluirse con amilosa soluble. Una de las desventajas es la problemática de las técnicas de manipulación requeridas para realizar el tamizado de bibliotecas grandes. El proceso idóneo es clonar en λ gt11 y una vez seleccionada(s) la(s) clona(s) de expresión, subclonar en pGEX ó pMal u otros plásmidos (Coppel y col., 1993).

2.3.4 Vectores en eucariotes

Los vectores de expresión en eucariotes ofrecen mayores ventajas para identificar clonas que expresen secuencias de interés (Hyde, 1993). Las células de mamíferos se usan frecuentemente como hospederos para la expresión de genes obtenidos de eucariotes superiores porque las señales para la síntesis, procesamiento y secreción de estas proteínas son reconocidas. Muchos virus que infectan células de mamífero se han utilizado para crear vectores de expresión. Algunos ejemplos son: el virus del papiloma bovino (BPV), el virus SV40, el virus Epstein-Barr (EPV) y el virus de Vaccinia (Ausubel y col., 1987). En el Cuadro II se describen algunos sistemas de expresión en células de mamífero y los niveles de expresión.

Los sistemas de expresión virales tiene ciertas limitaciones. En primer lugar está el tamaño de las secuencias insertadas, ya que si es muy larga, no se realizará el empaquetamiento dentro del genoma viral (el tamaño máximo de los insertos para SV40 y retrovirus son 2.5 kb y 6 kb, respectivamente) y/o pueden estar sujetos a un rearrreglo durante la propagación del virus. La segunda limitación es el efecto citopático sobre algunas células hospederas, lo cual limita la expresión a períodos cortos. La tercera es la variabilidad en la expresión de genes que depende de múltiples parámetros, que no han sido bien estudiados pero que dependen de la traducción, el procesamiento y la modificación de la proteína resultante. Por lo que hay una gran variabilidad en el éxito de cualquier inserto de DNA (Ausubel y col., 1987).

Cuadro II. Usos de diferentes sistemas de expresión en células de mamífero.

LÍNEA CELULAR	VECTOR	CANTIDADES DE PROTEÍNAS OBTENIDAS (ug/ml)	USO
<i>Células de chango</i> CV1 COS	Virus SV40	1-10	Expresión de proteínas nativas y mutadas.
<i>Fibroblastos murinos</i> C127	BPV	1-5	Altos niveles de proteína constitutiva.
3T3	Retrovirus	0.1-0.5	Transferencia de genes a animales.
<i>Otras células</i> Células de primate	Virus de Vaccinia	1	Altos niveles de expresión de proteína constitutiva.
	EBV	Sin determinar	Clonación y expresión.

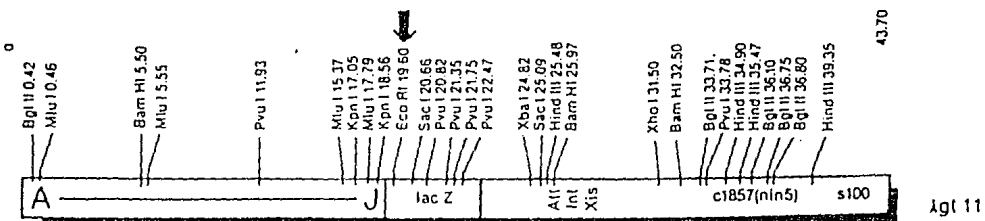


FIGURA 11. Mapa del vector λ gt11. La dirección de la transcripción está indicada por la flecha horizontal y la secuencia del sitio único para EcoRI para la clonación de fragmentos extraños se indica con la flecha vertical.

3. APLICACION DE LA INGENIERIA GENETICA AL ESTUDIO DE LOS PARASITOS

Las infecciones parasitarias son uno de los principales problemas de salud en varios países tropicales; algunas infecciones afectan a los seres humanos directamente y otras causan pérdidas en la industria ganadera de los países, por lo que se ha invertido un gran esfuerzo en buscar proteínas que permitan el diagnóstico preciso del agente causal y, en el mejor de los casos, que protejan a los individuos y que confieran inmunidad. Las proteínas puras que se necesitan para el desarrollo de vacunas y para reactivos diagnósticos no se pueden obtener en cantidades suficientes del agente patógeno, sin embargo, la clonación y expresión de genes en *E. coli*, provee una fuente abundante de antígenos. Las proteínas fusionadas, por ejemplo a β -gal, parecen ser más estables que cuando se expresan sin haber sido fusionadas a proteínas del vector (Scherf y col., 1990).

3.1 PARASITOS PROTOZOARIOS

La enfermedad de Chagas es un problema importante de salud y es endémico en América Latina: alrededor de 18 millones de individuos están infectados con *Trypanosoma cruzi*, su agente causal. Los métodos de diagnóstico basados en la detección del parásito, a pesar de su alta especificidad, son relativamente ineficientes, pues en muchos casos los resultados son falsos negativos. Los métodos basados en la detección de la respuesta inmune del hospedero en contra del parásito, tiene baja especificidad, ya que existen reacciones cruzadas con *T. rangeli*, leishmaniasis tegumental y visceral, sífilis y toxoplasmosis por el uso de extractos crudos ó parcialmente purificados de *T. cruzi* como fuente de antígeno (Krieger y col., 1992).

En años recientes, el uso de antígenos recombinantes ha provisto un nuevo reactivo para el inmunodiagnóstico de la enfermedad de Chagas. Se han clonado varios genes de *T. cruzi* y algunos de ellos se han utilizado para el diagnóstico (Affranchino y col., 1989; Levin y col., 1989; Almeida y col., 1990; Zingales y col., 1990; Krieger y col., 1992). Por ejemplo, Krieger y col., en 1992 describieron dos antígenos recombinantes expresados en *E. coli* utilizando como vector a λ gt11; se empleó una mezcla de sueros humanos positivos para la enfermedad de Chagas para realizar el tamizado de la biblioteca de cDNA. Los antígenos recombinantes identificados se usaron para la detección de *T. cruzi* por medio de IET y ELISA. Los resultados indican que los antígenos recombinantes fueron útiles y dieron mejores resultados cuando se mezclaron que cuando se usaron por separado, y además que al eliminar la porción de β -gal, aumentó la especificidad.

Recientemente se ha abordado el estudio de *Gardia lamblia* mediante la tecnología del DNA recombinante. A través del uso de bibliotecas de expresión, se han obtenido clonas de cDNA que codifican para porciones peptídicas de proteínas de *G. lamblia* de 33 kDa denominadas giardinas (Alonso, 1987; Baker y col., 1988; Aggarwal y Nash, 1989). También se ha informado de la clonación y expresión de clonas de cDNA de *G. lamblia*, que expresan epítomos reconocidos por sueros de enfermos giardiásicos, así como por sueros de ratones y conejos obtenidos en contra de proteínas del parásito. La proteína de fusión de una de las clonas positivas se analizó por IET obteniendo una proteína de 140 kDa que fue reconocida por los sueros de enfermos. La secuencia de nucleótidos del inserto que codificó para esta proteína permitió deducir una secuencia de aminoácidos altamente hidrofílicos, lo que sugiere que este péptido corresponda a una región expuesta de un antígeno de superficie (Coral, 1990).

3.2 PARASITOS ASQUELMINTOS

Se han realizado numerosos estudios sobre antígenos clonados del nemátodo *Onchocerca volvulus*. En 1990 el grupo de Lobos construyó una biblioteca de expresión de cDNA utilizando mRNA obtenido de hembras de *O. volvulus*, y el fago λ gt11 como vector. La biblioteca se tamizó con anticuerpos de pacientes con oncocercosis. Se caracterizó una clona de cDNA (Ag16) que corresponde a un antígeno de bajo peso molecular del parásito. Esta clona codifica para una secuencia de 152 aminoácidos de un péptido señal hidrofóbico que contiene tres dominios hidrofílicos y cuatro sitios potenciales de glicosilación. El antígeno recombinante Ag16 reaccionó fuertemente por IET cuando se emplearon mezclas de sueros de enfermos con oncocercosis y de igual forma cuando se emplearon muestras individuales de los mismos sueros, y no reaccionó con las mezclas de sueros obtenidos de enfermos con otros nemátodos (Lobos y col., 1990).

En ese mismo año se informó de la clonación, expresión y determinación de la estructura primaria de un antígeno de superficie presente en microfilarias de *O. volvulus*. La biblioteca de expresión de cDNA se elaboró en λ gt11, usando el mRNA de hembras adultas. La clona obtenida expresa un antígeno de 18 kDa. Este antígeno es importante en la regulación inmune y en la patogénesis de la oncocercosis, por encontrarse en contacto con el hospedero, funcionando como blanco para la respuesta inmune (Dinman y Scott 1990).

Posteriormente se empleó una mezcla de antígenos recombinantes de *O. volvulus* en un ELISA para evitar los problemas asociados con la heterogeneidad de la respuesta inmune y de esta forma incrementar la sensibilidad del inmunodiagnóstico. Las clonas de cDNA expresadas en λ gt11, que codifican para antígenos de *O. volvulus*, se seleccionaron con base en su especificidad hacia este parásito y posteriormente se subclonaron en el sistema de expresión y purificación de proteínas

pMal-p (New England Biolabs, Beverly, MA). La mezcla de tres antígenos recombinantes mostró una sensibilidad de 96% y 100% de especificidad en ELISA, comparada con 99% de sensibilidad y 59% de especificidad cuando se emplea extracto crudo de *O. volvulus* (Bradley y col., 1993).

3.3 PARASITOS PLATELMINTOS

Fasciola hepatica y *Schistosoma mansoni* son de los parásitos más estudiados en el grupo de los tremátodos. Se han usado modelos animales para llevar a cabo ensayos de vacunación contra esquistosomiasis humana obteniendo niveles de protección que van desde 20% hasta 80% (James y Sher, 1990). Se han realizado varios intentos para obtener proteínas inmunogénicas recombinantes (Colley y Colley, 1989), actualmente existen varios antígenos que son buenos candidatos para vacunas. Un ejemplo es la enzima glutatión S-transferasa (GST; Smith y col., 1986; Balloul y col., 1987). Se propuso a la GST de *F. hepatica* (FhGST) como posible candidato para la vacunación de ovejas infectadas con este parásito ya que se ha observado que induce altos niveles de inmunidad al desafío de la infección con este parásito (Sexton y col., 1990) y en ratones desafiados con *S. mansoni* (Hillyer y col., 1979). Una forma de obtener grandes cantidades de esta enzima fue por medio de la producción de antígenos recombinantes. Se construyó una biblioteca de cDNA en λ gt11 empleando el mRNA obtenido del estado adulto de *F. hepatica* aislado de hígado de bovino y en el tamizado se emplearon anticuerpos contra FhGST de conejo. Se obtuvo una clona positiva cuyo inserto se amplificó por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El producto de PCR se secuenció y se obtuvo una secuencia de 748 pb. La secuencia de aminoácidos deducida se comparó con las secuencias de GST conocidas y se obtuvo una alta homología con la GST de 26 kDa tanto de *S. mansoni* como de *S. japonicum* (Muro y col., 1993). Esta homología correlaciona con la observación de que se desarrollan anticuerpos de reacción cruzada con FhGST en ratones infectados con *S. mansoni*. Además, se ha observado la GTS de *S. mansoni* y de *S. japonicum* confiere altos niveles de inmunidad en animales experimentales, en contra de estas parasitosis (Balloul y col., 1987; Capron y col., 1990). Por lo que se propone a la enzima GST como un candidato para vacuna contra infecciones por *F. hepatica* y *S. mansoni* (Hillyer y col., 1992).

En la clase Cestoda existen varios parásitos de importancia medica. Una de las enfermedades zoonóticas conocidas como letales para el hombre es la hidatidosis alveolar causada por el metacéstodo de *Echinococcus multilocularis*. Los síntomas de esta enfermedad frecuentemente se confunden con el carcinoma hepático. El uso de extractos totales de parásitos para realizar el inmunodiagnóstico da reacciones cruzadas con otras parasitosis. Hemmings y McManus (1989), reportaron la construcción de una biblioteca de cDNA en λ gt11 empleando el mRNA de protoescólices de *E. multilocularis*; para realizar el tamizado de la biblioteca se utilizaron sueros de seres humanos con hidatidosis alveolar confirmada, previamente

adsorbidos para eliminar reacciones cruzadas con anticuerpos contra *E. coli* presentes en estos sueros. Se aislaron varias clonas, pero sólo dos de ellas, la EM4 y la II/3, fueron caracterizadas (Hemmings y McManus, 1989). Los péptidos de fusión de estas clonas se purificaron y se determinó, tanto por IET como por ELISA, su potencial como reactivos para el inmunodiagnóstico de la hidatidosis alveolar (Hemmings y McManus, 1991).

En 1984, Bowtell y colaboradores, expresaron antígenos de *Taenia taeniaeformis* en *E. coli*. Para esto construyeron una biblioteca de cDNA utilizando al fago λ Amp3 como vector. El cDNA se preparó con el mRNA de metacéstodos de 28 días. Se empleó suero hiperinmune de conejo para tamizar la biblioteca y, de esta forma, detectar los antígenos del parásito expresados y codificados en *E. coli* lisogénica. Se seleccionaron cuatro clonas que reaccionaron fuertemente con los anticuerpos al analizarlas por IET, se observó que codifican para tres antígenos parasitarios inmunológicamente distintos (Bowtell y col., 1984).

Posteriormente se estudió la vacunación contra la infección en ratas por *T. taeniaeformis* usando otras proteínas recombinantes, ya que las proteínas obtenidas en la primera biblioteca, a pesar de ser reconocidas por los anticuerpos en contra de antígenos de los estados del metacéstodo y la oncosfera, no tuvieron efecto protector en ratones vacunados; debido a que ambos estados de este parásito contienen antígenos dominantes específicos (Ito y col., 1991). Para identificar antígenos protectores específicos de la oncosfera, se construyó una biblioteca de cDNA a partir del mRNA de oncosferas en el fago λ gt11 (Johnson y col., 1989) y se empleó como sonda un suero de conejo anti-oncosfera. Se identificaron cinco familias de antígenos, y una de éstas, la número 1 mostró un fuerte efecto protector en ratas. Se caracterizó un antígeno de la familia número 1, de 21 kDa y se identificó como una proteína oncosférica protectora. Posteriormente se subclonaron varias clonas de la familia número 1 (clonas 18, 21, 49 y 53) en el vector de expresión pGEX-1 y se emplaron para vacunar ratas. Todas las ratas vacunadas mostraron una fuerte resistencia a la infección. El porcentaje de protección se determinó por la reducción del número metacéstodos enquistados y el número total de metacéstodos y fué aproximadamente de 95% y 91% respectivamente. (Ito y col., 1991).

En 1990 se describió por primera vez la construcción de dos bibliotecas de cDNA de *Taenia solium*, generadas en λ gt11 y *E. coli*. Se identificaron cuatro clonas que expresan proteínas de fusión que eran reconocidas por un suero polivalente dirigido contra el antígeno inmunodominante conocido como antígeno B. Se produjeron lisógenos de las clonas y los péptidos de fusión con β -gal se encontraban en un rango entre 135 kDa y 150 kDa. Por IET se demostró que estas proteínas recombinantes reaccionaron con una mezcla de sueros de enfermos con cisticercosis, por lo que propusieron la purificación del antígeno recombinante y su empleo en ensayos de rutina para el diagnóstico de la cisticercosis (McManus y col., 1990). Sin embargo, hasta la fecha, no se ha informado de la realización de este propósito.

En 1992 se informó de la caracterización del gen que codifica para el antígeno B de *T. solium*. A partir de un fragmento de 55 kDa obtenido por la digestión del antígeno B con tripsina, se obtuvo una secuencia de 18 aminoácidos, de los cuales se escogieron los aminoácidos QMDYDN para diseñar los oligonucleótidos que se utilizaron como sonda para tamizar la biblioteca de cDNA del cisticerco *T. solium*. Se aisló una clona con un inserto de 3.6 Kb, se secuenció y la secuencia de aminoácidos deducida a partir de la de los nucleótidos tuvo 75% de homología con la secuencia de la paramiosina de *S. mansoni*; la proteína recombinante sí fué reconocida por anticuerpos en contra del antígeno B (Landa, 1992). Entre las características que tiene el antígeno B está la de inhibir el complemento (Laclette y col., 1992), por lo que el disponer del antígeno B como proteína recombinante permitirá determinar por ensayos de vacunación si esta molécula es capaz de inducir inmunidad protectora (Landa, 1992).

Estos y otros ejemplos en los cuales se han utilizado antígenos recombinantes obtenidos a partir de bibliotecas de expresión de cDNA elaboradas en vectores como λ gt11, para el diagnóstico y en el mejor de los casos, para proteger, son enlistados en el Cuadro III.

Cuadro III. Ejemplos de algunos antígenos clonados en parasitología

PARASITO	ANTIGENOS	VECTOR	BIBLIOTECA	REFERENCIA
<i>Trypanosoma cruzi</i>	FRA y CRA	λ gt11	cDNA	Krieger y col., 1992.
<i>Gardia lamblia</i>	Giardina de 33kDa y Ag de 65kDa	λ gt11	cDNA	Nash y col., 1989; Coral, 1990
<i>Sarcocystis muris</i>	pSM/1.5 y 5.7	λ Zap	cDNA	Eschenbacher y col., 1993
<i>Leishmania major</i>	λ 1-3B	λ gt11	cDNA	Handman y col., 1993
<i>Fasciola hepatica</i>	FhGST y Ag12 kDa	λ gt11	cDNA	Hillyer y col., 1992
<i>Schistosoma mansoni</i>	31/32 kDa	λ gt11	cDNA	Klinkert y col., 1987
	21.7kDa	λ gt11	cDNA	Francis, 1992
<i>S. japonicum</i>	GST 26 kDa	λ gt11	cDNA	Muro y col., 1993
<i>Echinococcus multilocularis</i>	EM2-EM4 EM4-11/3	λ gt11	cDNA	Hemmings y McManus, 1989, 1991
<i>Taenia taeniaeformis</i>	TA10 70 kDa	λ Zap	cDNA	Bowtell y col., 1984
<i>Onchocerca volvulus</i>	Ag 16, 18 kDa y Ov-16	λ gt11 pCG808fv	cDNA cDNA	Lobos y col., 1990, 1991
	Ov 103	λ gt11	cDNA	Lustigman y col., 1992
	Mezcla, OVMBP 10, 11 y 29	λ gt11 y pMal	cDNA	Bradley y col., 1993
<i>Brugia malayi</i>	BmM5-14	λ gt11	cDNA	Chandrashekar y col., 1994
<i>Dictyocaulus viviparus</i>	DvGST3-14	λ Zap	cDNA	Schnider, 1993

HIPOTESIS

Una alternativa para facilitar el diagnóstico de cisticercosis debida a *Taenia solium* es utilizar antígenos puros que eviten reacciones cruzadas con otras parasitosis que se presentan cuando se emplean extractos totales como antígenos.

1. Se pueden producir anticuerpos dirigidos contra las glicoproteínas (GP) de *Taenia solium* a través de la inmunización de ratones con la banda de nitrocelulosa que corresponda a la GP deseada.
2. Es posible obtener clonas recombinantes que expresen GPs ya que la fracción protéica es la que tiene la actividad antigénica.
3. Los anticuerpos contra alguna GP pueden ser utilizados como sonda para tamizar la biblioteca de cDNA de *Taenia solium* y obtener clonas que expresen a la GP de interés.
4. La obtención de clonas recombinantes permite caracterizar la fracción protéica de la GP de interés.

O B J E T I V O S

OBJETIVO GENERAL:

Identificar clonas de una biblioteca de cDNA de *Taenia solium* que expresen a la GP42 y evaluarlas frente a muestras de sueros y líquidos cefalorraquídeos de enfermos con neurocisticercosis.

OBJETIVOS ESPECIFICOS:

- Producir anticuerpos contra la GP42.
- Tamizar una biblioteca de cDNA.
- Determinar si las clonas expresan a la GP42.
- Caracterizar molecularmente a las clonas antigénicas.

M A T E R I A L E S Y M E T O D O S

El diseño experimental de este trabajo se muestra en la figura 12.

Las bibliotecas de cDNA utilizadas en este trabajo, fueron construidas por el Dr. Abraham Landa del Instituto de Investigaciones Biomédicas en 1991 quien las donó al laboratorio de la Dra. Ana Flisser. Las bibliotecas de cDNA se construyeron en los vectores de expresión λ gt10 y λ gt11 (Landa, A. 1992). Entre el 60 y 70 % de los fagos de ambas bibliotecas fueron recombinantes y los títulos obtenidos para cada una de las bibliotecas fueron:

Cuadro IV. Tamaños de las bibliotecas

TIPO DE BIBLIOTECA	VECTOR	<i>E. coli</i> cepa	TITULO FAGOS/ml
cDNA TOTAL	λ gt11	Y 1090	6×10^8
cDNA TOTAL	λ gt10	C600	7×10^6

La fracción enriquecida de glicoproteínas (LLGP) con la que se prepararon los anticuerpos para el tarnizado de la biblioteca de cDNA fué donada por el M. en C. Agustín Plancarte del laboratorio de la Dra Ana Flisser, quien siguió el método descrito por Tsang y col. (1989) para su obtención.

1. OBTENCION DE SUEROS HIPERINMUNES Anti GP42

1.1 Electrotransferencia de la LLGP

La separación de las proteínas presentes en la fracción LLGP se realizó por medio de electroforesis en geles preparativos de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (PAGE-SDS) al 11%, de acuerdo con el método descrito por Tsang y col., (1989). Se colocaron 150 μ g de LLGP, previamente mezcladas con la solución desnaturizante (Studier, 1973), y se hirvieron durante 5min. También se colocaron en los carriles laterales marcadores de peso molecular altos preteñidos (Bio-Rad), que incluían a β -gal para tener la referencia del peso como testigo. La electroforesis se realizó a 30mA durante 2h a 4°C y al finalizar, las proteínas separadas en el gel se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (MNC) con tamaño de poro de 0.2 μ m (Schleicher & Schuell). La transferencia se realizó en una cámara (Idea-Scientific) con 1 amper durante 1h, siguiendo el método de Tsang y col. (1989).

1.2 Inmunización de ratones

La MNC se incubó con una solución para teñir proteínas (Auro-Dye forte, Amersham Life Sci.), durante 2h, con agitación constante. Se lavaron con varios cambios de agua destilada, se secó la MNC al aire y se cortó la banda que correspondía a la GP42. La banda se cortó en pequeños trozos y se colocó en un tubo eppendorf. Se pulverizó la MNC según el método descrito por Abou-Zeid en 1987. Se adicionó 0.5ml de dimetil sulfóxido DMSO (Baker), se agitó constantemente hasta que se pulverizó completamente la nitrocelulosa. Se mantuvo a temperatura ambiente durante 1h. Se adicionó 0.5ml del amortiguador de carbonatos (NaHCO_3 , 2mM; Na_2CO_3 , 1mM; Baker) lentamente, con agitación constante. Se centrifugó a 10,000 rpm durante 5min, se decantó y se adicionó al precipitado 1ml de la solución amortiguadora salina amortiguada con fosfatos 0.01M, NaCl 0.15M, pH 7.2 (PBS), para lavar la nitrocelulosa; se repitieron 4 veces los lavados. El precipitado se disolvió con 0.5ml de adyuvante completo de Freund y se dividió en 5 partes. Se inmunizaron 5 ratones de la cepa Balb/c con 0.1ml a cada uno. Las inmunizaciones se realizaron cada 7 días por vía intramuscular durante 4 semanas. Posteriormente se inmunizaron en dos ocasiones por vía intraperitoneal sin adyuvante a intervalos de 15 días. Se obtuvo la sangre de los ratones a través de la laguna post-orbital en tres ocasiones.

1.3 Comprobación de la producción de anticuerpos

Se realizó una IET como en el paso 1.1, la MNC se cortó longitudinalmente en tiras de 3mm de grosor, sin el carril de los pesos moleculares. Las tiras se incubaron durante toda la noche a 4°C con agitación constante en una solución bloqueadora que contenía leche descremada al 5% preparada en PBS con Tween 20 al 0.05% (PBS-T). Al día siguiente se lavaron 3 veces con PBS-T y 2 veces con PBS; cada lavado fué de 5min. Cada tira se incubó con un suero de ratón antes ó después de la inmunización diluído 1:100, durante 1h, con agitación constante y a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron y se incubaron con un segundo anticuerpo anti IgG de ratón acoplado a fosfatasa alcalina diluído 1:1,000 en las mismas condiciones que el primer anticuerpo. Se lavaron, se adicionó el sustrato, que consiste de cloruro de azul de nitrotetrazolio (NBT) y fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolil (BCIP) ambos de Gibco, BRL. Cuando las bandas fueron visibles se detuvo la reacción lavando las tiras con agua destilada (Maniatis y col., 1989).

2. ADSORCION DE SUEROS CON EXTRACTOS BACTERIANOS

Con la finalidad de eliminar los anticuerpos anti *E. coli* presentes en los LCR y sueros de pacientes con cisticercosis, así como en los de ratones hiperinmunes, se adsorbieron los sueros y LCR con extractos de bacterias *E. coli* Y1090 infectadas con el fago λ gt11 silvestre.

El extracto se obtuvo infectando 300 μ l de bacterias *E. coli* Y1090 crecidas durante toda la noche, con 5×10^4 fagos λ gt11. Se incubaron a temperatura ambiente durante 15min y se sembraron en cajas de Petri (150mm) con medio Luria Bertain. Este medio contiene Bacto-triptona (Difco) al 1%, Bacto-extracto de levadura (Difco) al 0.5%, NaCl (Baker) al 1% y Bacto-Agar (Bioxón) al 1.5% (LB-agar), se esteriliza en autoclave y cuando la temperatura alcanza 42°C, se adicionan 100 μ g/ml de ampicilina, (las cajas se pueden almacenar a 4°C durante dos semanas y antes de utilizarlas se colocan a 37°C durante 1h para eliminar residuos líquidos). Las cajas sembradas se incubaron a 42°C de 2 a 3h hasta que las placas formadoras de lisis (pfl) fueron visibles. Sobre las cajas se colocaron MNC circulares con poro de 0.2 μ m (Schleicher & Schuell), previamente sumergidas en Isopropil- β - δ -tio-galactopiranosido (IPTG) 10mM y se incubaron de 2 a 3h a 42°C. Después se colocaron las cajas a 4°C durante 10min y se quitaron las MNC cuidadosamente. Estas MNC se incubaron con la solución bloqueadora durante 1h a temperatura ambiente ó toda la noche a 4°C. Se agregaron 4ml de suero diluído 1:100 por cada 2 MNC y se incubaron durante 4h a temperatura ambiente, se separaron las MNC y se colocó un segundo grupo de éstas (Maniatis y col., 1989)

Se realizaron IET empleando como antígenos al extracto de *E. coli* Y1090 infectadas con el fago λ gt11 silvestre así como a la LLGP. Se utilizó la mezcla de los sueros de ratón y las mezclas de los sueros y LCR de enfermos con cisticercosis pre y postadsorbidos, para comprobar la eliminación de proteínas de reacción cruzada y para verificar la reactividad de los sueros y LCR.

DIAGRAMA DE FLUJO

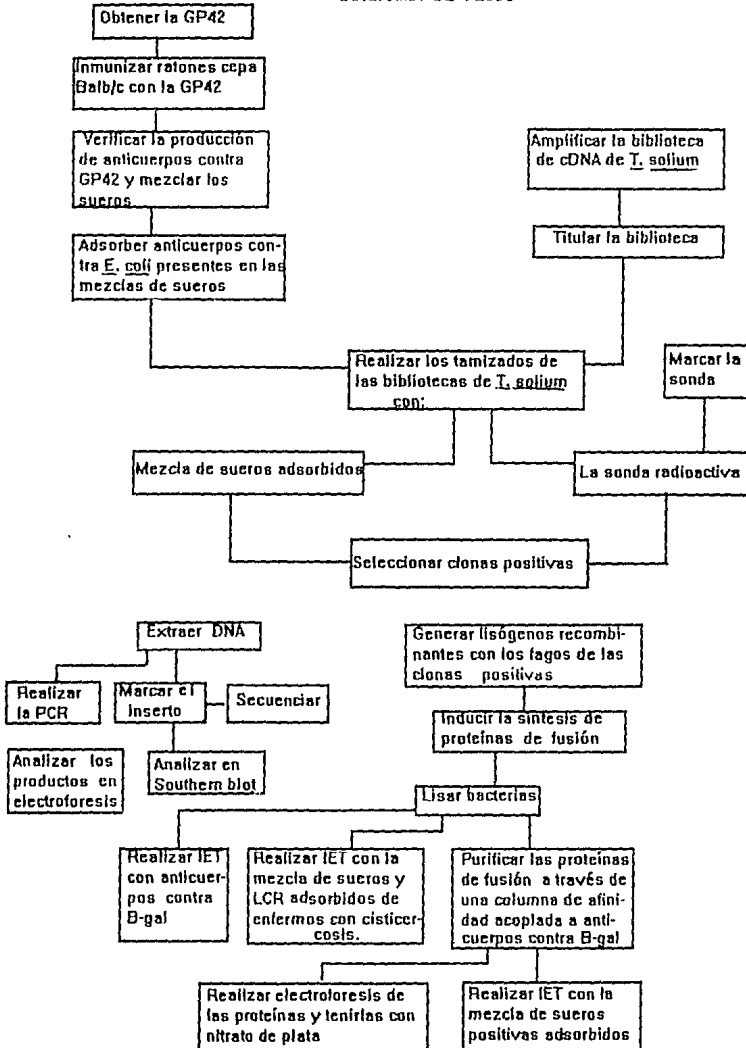


FIGURA 12. Diagrama de flujo del diseño experimental.

3. TITULACION Y AMPLIFICACION DE LA BIBLIOTECA

Para titular la biblioteca de cDNA se inoculó una colonia de *E. coli* Y1090 en 50ml de medio LB, (que es el mismo medio que LB-agar, pero sin agar), se incubó toda la noche a 30°C. Se centrifugó a 3,500 rpm durante 10min. El precipitado de bacterias se resuspendió en $MgSO_4$ 10mM a una concentración de $DO_{600} = 0.5$. Aproximadamente 200 μ l de bacterias se infectaron con 10 μ l una solución de fagos diluidos 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} ó 10^{-8} , en el amortiguador de almacenamiento que contiene NaCl 0.1M, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, Tris 0.05M, pH 7 y gelatina al 0.01% (SM); a 37°C. Posteriormente, a la mezcla de bacterias y fagos se adicionaron 3ml de top-agar a 48°C, en el que el agar del LB-agar se reemplaza por 0.75g/l de agarosa (Sigma, Chemical Co.), se mezclaron y se sembraron en cajas de Petri con LB-agar, se incubaron a 37°C toda la noche (Young y Davis, 1983; Huynh y col., 1985). Al día siguiente se contaron las pfl y se determinó el número total según la fórmula:

$$\frac{\# \text{ de placas contadas}}{\text{dilución utilizada / ml}} = \text{pfl/ml}$$

Para amplificar la biblioteca se usó una alícuota de 600 μ l de las bacterias preparadas. Se infectaron con 5×10^4 fagos en medio líquido y se sembraron en cajas de Petri con LB-agar, se incubaron de 6 a 8h a 37°C. Los fagos se recuperaron de la superficie de las cajas de Petri adicionando 10ml de SM, se colocaron en agitación constante toda la noche a 4°C. Se recuperaron los 10ml de SM, se le adicionó cloroformo al 5% concentración final, se centrifugaron a 5,000 rpm durante 5min. El sobrenadante se trasladó a un tubo limpio y se almacenó a 4°C en alícuotas de 1ml con cloroformo al 3% (Young y Davis, 1983; Huynh y col., 1985). El título de las bibliotecas amplificadas se determinó como se describe arriba.

4. TAMIZADO DE LAS BIBLIOTECAS

4.1 Tamizado con anticuerpos

Con el fin de seleccionar clonas que expresen a la GP42 parcial o totalmente, se realizó el tamizado de la biblioteca de cDNA construida en λ gt11, empleando los anticuerpos producidos en ratón. Como se desconocía la abundancia relativa del mRNA de esta GP, se realizó el tamizado de 200,000 a 300,000 placas formadoras de lisis en promedio (20-30 cajas de Petri de 150mm con 10,000 fagos cada una; Maizels y col., 1991).

Se infectaron 300 μ l de *E. coli* Y1090 con 1×10^4 fagos en medio líquido durante 30min a 37°C, se adicionaron 6ml de top-agar, se mezclaron y se sembraron en cajas de Petri con LB-agar. Se incubaron a 42°C durante 4h, después se colocó sobre las cajas MNC circulares previamente humedecidas con IPTG 10mM y se incubaron a la misma temperatura durante 3h más. Antes de quitar las MNC se marcaron asimétricamente con puntos de tinta china para orientarlas posteriormente. Las MNC se lavaron tres veces durante 15min con Tris-base 50mM pH 8 (Sigma, Chemical Co.), NaCl 150mM (Baker) y Tween 20 0.3% (TBS-Tween).

Las MNC se incubaron en la solución bloqueadora a 4°C toda la noche y con agitación constante, se lavaron tres veces durante 5min con TBS-Tween 20 al 0.05% y cada lavado fue de 5min. Se adicionó el primer anticuerpo diluido 1:100 durante 2h con agitación constante, a temperatura ambiente. Se lavaron 3 veces con TBS-Tween durante 10min cada vez y por último un lavado con TBS durante 10min. Se incubaron con el segundo anticuerpo diluido 1:1,000, durante 2h, a temperatura ambiente y con agitación constante. Se repitieron los lavados y la reacción se reveló después de adicionar el sustrato.

Para comprobar la reactividad de cada clona positiva se realizaron un segundo y un tercer tamizado. Para ésto se obtuvieron las placas de fagos positivas con la parte ancha de una pipeta Pasteur y se colocó cada una en 1ml de SM, se amplificaron, se titularon y se realizó el segundo tamizado similar al primero, utilizando 1×10^3 fagos en cajas de 90mm.

El tercer tamizado se realizó siguiendo el método descrito por Cogley y col., (1991). Se emplearon 200 μ l de *E. coli* Y1090 y se mezclaron con 6ml de top-agar, se sembraron en una caja de Petri con LB-agar, la caja se incubó a 42°C durante 3h. Después se tomaron los fagos colocados en una placa de posos para ELISA, con un replicador de colonias (Sigma, Chemical Co.), se colocaron sobre la caja de Petri donde se crecieron las bacterias, durante 20seg para permitir que los fagos las infectaran y la caja se incubó a 42°C durante 3h. Se continuó con el procedimiento descrito para el tamizado primario. (Young y Davis, 1983; Huynh y col.,1985).

4.2 Tamizado con la sonda radioactiva

Se emplearon *E. coli* cepa C600: SupE44, thi⁻¹, leuB6, lacY1, tonA21, L-(r_k+m_k+) mcrA⁻, mcrB⁺. La biblioteca de *T. solium* que se utilizó, fué construida en λ gt10. Se infectaron 300 μ l de bacterias con 1×10^4 fagos a 37°C se sembraron en cajas de Petri con LB-agar, se incubaron a 37°C durante toda la noche. Las cajas se colocaron a 4°C una hora, en lugar de las MNC se usaron membranas de nylon Hybond (MNH; Amersham Life Sci.) que se colocaron sobre las cajas durante 10min, ésto se hizo por duplicado. Se marcaron asimétricamente y se retiraron las MNH de las cajas; el DNA se fijó con una solución desnaturalizante de NaOH 0.5M adicionado

con NaCl 1.5M, durante 10min y se transfirieron a una solución neutralizante de Tris-HCl 1.5M (pH 8) y NaCl 1.5M, durante 10min, se dejaron secar a temperatura ambiente y finalmente se fijó el DNA impregnado en las MNH, empleando 1,200 μ Joules de luz ultravioleta (UV) en una cámara de irradiación (Stratagen).

Las MNH se colocaron a 65°C durante 3h con agitación constante en solución de prehibridación que contiene 6X de SSC (SSC 20X: NaCl 3M, citrato de $\text{Na}_3\cdot\text{H}_2\text{O}$ 0.3M, pH 7.0); 5X solución de Denhardt's [(Sol. de Denhardt's 50X: 5gr de ficoll 400 (Pharmacia), 5gr de polivinilpirrolidona (Sigma, Chemical Co.), 5gr de albúmina sérica bovina (Sigma, Chemical Co.)], SDS al 0.5% y DNA de esperma de salmón 100 μ g/ml previamente hervido durante 2min y puesto en hielo inmediatamente. Posteriormente se adicionó a la solución de prehibridación la sonda marcada radioactivamente (ver sección 11), previamente hervida durante 2min y colocada en hielo y se llevó a cabo la hibridación a 65°C durante 3h con agitación constante.

Las MNH se lavaron tres veces durante 10min con la solución SSC 2X y SDS al 0.5% a 65°C, se secaron a temperatura ambiente, se cubrieron con una envoltura autoadherible transparente y se expusieron con placas fotográficas (X-Omat, Kodak), en presencia de una pantalla amplificadora durante toda la noche a -70°C (Young y Davis, 1983; Huynh y col., 1985; Sambrook y cols, 1989).

5. GENERACION DE LISOGENOS RECOMBINANTES

Para la generación de lisógenos recombinantes, se empleó *E. coli* cepa Y1089, Cada una de las siete clonas positivas y con la testigo negativa se picaron con un palillo esterilizado, se le asignó un número y se sembró en cajas con LB-agar (Grupo A). Con el mismo palillo se volvió a sembrar en otra caja de LB-agar, en la misma posición y numeración que a la primera (Grupo B). Esto se realizó con 25 clonas aproximadamente. Las cajas del grupo A y B se incubaron toda la noche a 42°C y a 32°C respectivamente. El experimento se repitió hasta obtener clonas que crecieron exclusivamente a 32°C, las cuales son lisogénicas, ya que el fago insertado lisa a las bacterias al crecer a 42°C pero no a 32°C (Young y Davis, 1983; Huynh y col., 1985).

6. SINTESIS DE LAS PROTEINAS DE FUSION

6.1 Crecimiento de las clonas lisogénicas e inducción de β -gal

Las clonas lisogénicas seleccionadas se crecieron en 10ml del medio LB-amp con agitación constante durante toda la noche a 30°C. Estos cultivos se diluyeron 1:50 con LB fresco y se incubaron a la misma temperatura durante aproximadamente dos horas, hasta obtener una absorbancia de 0.2 a 0.3 a 580nm, lo que corresponde a la fase logarítmica de crecimiento (Young y Davis, 1983; Huynh y col., 1985).

Para inducir la síntesis de β -gal, y por consiguiente la proteína de fusión, al cultivo se les adicionó el inductor IPTG (Sigma, Chemical Co.) a una concentración final de 10mM y se colocó lo más rápido posible a 42°C durante 15min con agitación constante lo que permite inhibir al represor para que la RNA polimerasa inicie la transcripción del gen que codifica a β -gal. Después de este tiempo se transfirió el cultivo a 38°C durante 2h sin permitir que disminuyera la temperatura. En este estado los lisógenos se lisan algunas veces, aún cuando la cepa Y 1089 contiene la mutación que causa lisis defectiva (S100) en λ gt11 (Huyhn y col., 1985).

6.2 Lisis celular.

Para la obtención del paquete celular, el cultivo se centrifugó a 3500 rpm durante 15min a 4°C. Para lisar a las células, el precipitado obtenido se congeló a -70°C y se descongeló a 4°C, se adicionó lisozima (Sigma, Chemical Co.) a una concentración final de 25 μ g/ μ l y se incubó a 4°C durante 30min. La lisozima se preparó en Tris-base 10mM (Sigma, Chemical Co.), NaCl 50mM previamente esterilizado por autoclave (TBS). Posteriormente se adicionó 1ml de TBS suplementado con ácido etileno-dinitrotetra-acético (EDTA, Merck) 2mM y el inhibidor de proteasas parahidroximercuribenzoato (PHMB, Sigma, Chemical Co.) y parametilsulfoxido (PMSF, Sigma, Chemical Co.), ambos a una concentración final 1mM. El precipitado se congeló y descongeló una vez más y se adicionó DNAasa (Sigma, Chemical Co.) a 1 μ g/ml y se incubó a temperatura ambiente durante 30min. Se centrifugó a 10,000 rpm durante 5min y el precipitado se disolvió en 1ml de TBS (Young y Davis, 1983; Huyhn y col., 1985).

6.3 Purificación de las proteínas de fusión

Las proteínas de fusión se purificaron de los precipitados de algunas clonas positivas. Las proteínas se precipitaron con sulfato de amonio concentrado (Merck) durante 24h a 4°C con agitación constante y se centrifugaron a 3,000 rpm durante 10min a 4°C. El precipitado se disolvió en PBS y se dializó en un tubo (Spectrapor) durante 72h con cambios de PBS cada 24h. La muestra dializada se centrifugó a 7,000 rpm durante 15 min a 4°C, el precipitado se disolvió en Tris-HCl 0.5M pH 7.4 EDTA 0.05M y PMSF 0.00 1M frío y se llevó a una concentración de 4mg/ml con Tris-HCl 0.5M, NaCl 0.05M y Nonidet-40 (Sigma, Chemical Co.) al 0.01% (TBS). Se pasó a través de una columna de inmunoadinidad ProtoSorb lacZ (Promega) de anticuerpos contra β -gal a 4°C. La proteína se eluyó con 3ml de la solución amortiguadora de NaCO₃ 0.1M y Na₂CO₃ 0.1M y un último lavado con 1ml de TBS. La proteína se concentró utilizando vacío y una columna de ultrafiltración Inmersible CX30 (Millipore).

7. IDENTIFICACION DE LAS PROTEINAS DE FUSION

7.1 Identificación con tinción de plata

La purificación de las proteínas de fusión se verificó mediante la electroforesis realizada como en la sección 1.1. El gel se preparó al 7.5% y se analizaron 10 μ g de la clona negativa y de la clona 7. Después de la electroforesis el gel se tiñó con nitrato de plata, para lo cual se realizó lo siguiente: el gel se incubó durante 2h con 100ml de ditioneitol (DTT; Sigma, Chemical Co.) al 25% diluido en etanol al 50% con agitación constante. se lavó durante 1h con agua destilada con agitación constante. Se incubó durante 1min con tiosulfato de sodio pentahidratado (Baker) a una concentración de 200 μ g/ml y después el gel se lavó tres veces durante 20seg cada una. El gel se incubó durante 30min con nitrato de plata (Baker) 8mg/ml, hidróxido de amonio (Baker) al 0.4% e hidróxido de amonio (Baker) al 0.01%. Se hicieron cinco lavados de 5min cada uno con agua destilada y después el gel se incubó durante 30min con ácido cítrico (Baker) al 0.025%, formaldehído (Baker) al 0.015% y tiosulfato de sodio pentahidratado a una concentración de 13 μ g/ml. Finalmente el gel se lavó durante 10min con metanol (Baker) al 50% y ácido acético al 5%.

7.2 Identificación por IET

Para la identificación de las proteínas de fusión se analizaron los precipitados, los sobrenadantes de las clonas lisogénicas y las proteínas de fusión purificadas en geles de poliacrilamida al 7.5% por IET (como se describió en la sección 1.1). Una de las MNC completa se incubó con suero de ratón anti- β -gal, como primer anticuerpo, diluido 1:500 (Sigma, Chemical Co.) y anticuerpos contra IgG de ratón acoplados a fosfatasa alcalina diluidos 1:1,000, como segundo anticuerpo. Otra de las MNC se incubó con una mezcla de sueros de pacientes con cisticercosis comprobada, diluida 1:100; una última MNC se incubó con la mezcla de LCR positivos, diluida 1:10; ambas mezclas fueron previamente adsorbidas según se describió en la sección 2. Como segundo anticuerpo de estas dos últimas MNC se utilizaron anticuerpos contra IgG humana producidos en cabra, acoplados a fosfatasa alcalina diluidos 1:1,000. Todas las MNC se revelaron con NBT y BCIP.

Las proteínas purificadas de las clonas 7. 9. 12. 13 y la negativa, se analizaron por IET y se emplearon como anticuerpos, la mezcla adsorbida de sueros de enfermos con cisticercosis.

8. PURIFICACION DEL DNA DE LOS FAGOS RECOMBINANTES

Se infectaron en medio líquido 300 μ l de *E. coli* Y1090 con 5 X 10⁸ fagos que resultaron positivos en el tamizado, durante 30min a 37°C. Se adicionaron 6ml de top-agar, se mezclaron, se sembraron en cajas de Petri con LB-Agar y se incubaron a 37°C toda la noche. Se adicionó a cada caja de Petri 10ml de SM y se agitaron durante 2h a temperatura ambiente, se recuperó el volumen de SM, se adicionaron 5 μ l de cloroformo (Merck) y se centrifugó a 3,000 rpm durante 10min a 4°C. Esto se repitió tres veces. Al sobrenadante se le adicionó NaCl al 10% y polietilen glicol 8,000 (Sigma, Chemical Co.) al 10% concentración final, se agitaron durante 4h a 4°C y se centrifugaron a 10,000 rpm durante 20min a 4°C. El precipitado se resuspendió con 500 μ l del amortiguador Tris-HCl 10mM pH 7.5, MgCl₂ y β -mercaptoetanol (Bio-Rad) 1mM. Se adicionaron 50 μ l de DNAasa I (Sigma, Chemical Co.) y RNAasa (Sigma, Chemical Co.) a una concentración de 10mg/ml y se incubó a 37°C durante 30min. El DNA se extrajo con fenol-cloroformo y se precipitó con NaOAc (Baker) 0.3M concentración final y 2 volúmenes de etanol al 100% toda la noche a -20°C, se centrifugó a 14,000 rpm durante 15min y el precipitado se lavó dos veces con etanol al 70% frío. Finalmente se secó y se resuspendió en 50 μ l del amortiguador Tris-HCl 10mM pH 7.6 y EDTA 1mM pH 8 (TE; Maniatis y col., 1989).

9.0 OBTENCION DEL INSERTO DE cDNA DE LOS FAGOS RECOMBINANTES

9.1 Obtención con la enzima de restricción EcoRI

Con la finalidad de obtener los insertos de cDNA de los fagos recombinantes seleccionados, el DNA de éstos se digirió con la enzima de restricción EcoRI (BRL), que reconoce la secuencia G-AATTC. Las condiciones empleadas para la digestión con esta enzima corresponden a las recomendadas por la casa comercial. La concentración de la enzima fue de una unidad (U) por 1 μ g de DNA digerido.

En un tubo eppendorf se agregó 1 μ g de DNA, 2 μ l de la solución amortiguadora de la enzima: NaCl 100mM, Tris-HCl 50mM, MgCl 10mM, DTT 1mM; agua destilada en el volumen necesario para completar 25 μ l y por último 1U/ μ g de la enzima. Se incubó a 37°C y la reacción se detuvo calentando a 65°C durante 10min. Para comprobar la digestión, la mezcla se corrió a 0.15 voltios/cm en un gel de agarosa de bajo punto de fusión (Sigma, Chemical Co.) al 1% con el amortiguador de corrida Tris-acetato 1X [la solución concentrada 50X contiene 242g/l de Tris-base, 51.7ml/l de ácido acético glacial (Merck) y 100ml de EDTA 0.5M pH 8(TAE)]. El gel se tiñó con bromuro de etidio (Sigma, Chemical Co.) a una concentración de 0.5 μ g/ml. El DNA se visualizó con la ayuda de un transiluminador (Hoeffer) de UV de onda corta (Maniatis y col., 1989).

9.2 Obtención por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se emplearon dos clases de iniciadores específicos para λ gt11 (Cuadro V, Figura 13), los primeros fueron de 23 nucleótidos (Gibco-BRL), los segundos se sintetizaron en el Instituto de Investigaciones Biomédicas (UNAM) y fueron donados por el Dr. Juan Pedro Lactette. De estos últimos, el iniciador 5' de 28 nucleótidos, contiene las secuencias de reconocimiento de las enzimas PstI y EcoRI, y el iniciador 3' de 29 nucleótidos, las secuencias para BamHI y HindIII.

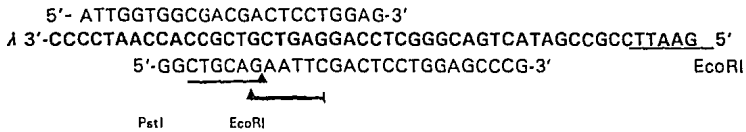
La reacción de amplificación del DNA de las clonas positivas se llevó a cabo con ambos pares de iniciadores, en 100 μ l de reacción que contenía amortiguador de amplificación para la enzima Taq polimerasa: Tris-HCl 25mM pH 9.0, MgCl₂ 6mM, KCl 50mM, 0.1mg/ml albúmina sérica bovina, libre de nucleasas (BSA; Perkin-Elmer), mezcla de desoxinucleótidos trifosfatados (dNTP) 100mM (Perkin-Elmer), 30pmol de los iniciadores 5' y 3', 10ng de DNA, adicionando el volumen necesario de agua destilada y esterilizada para tener los 100 μ l. La reacción se desnaturalizó durante 5min a 94°C y se colocó inmediatamente en hielo, después se centrifugó durante 10seg a 14,000 rpm y se adicionaron 2.5 U de Taq polimerasa (Perkin-Elmer); este volumen se cubrió con 100 μ l de aceite mineral (Sigma, Chemical Co.). La reacción de amplificación se realizó en un termociclador Perkin-Elmer durante 25 ciclos, cada uno de los cuales comprendió 1min a 95°C, 2 min a 50°C y 3 min a 72°C con una amplificación final de 10min a 72°C (Maizels y col., 1991). Como testigo negativo se preparó otra reacción pero sin adicionar DNA.

Diez μ l de cada reacción se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa al 1% en TAE y como marcador de peso molecular se utilizó DNA del plásmido pUCBM21 digerido con HpaII y DNA de pUCBM21 digerido con DraI y HindIII (Boehringer Mannheim). Se cortó la banda del producto identificada con luz UV y se purificó el DNA por el método de Vogelstein y Gillespie (1979) empleando el estuche de polvo de vidrio: se fragmentó el gel y se disolvió la agarosa con NaI 2ml por gramo de gel y se incubó a 55°C durante 10 min. Se adicionó 2 μ l de la suspensión de polvo de vidrio por 1 μ g de DNA a eluir y se agitó en el vortex, se incubó a 4°C durante 1h y se centrifugó durante 30seg a 14,000 rpm, se decantó el sobrenadante y se adicionó al precipitado 500 μ l de la solución de lavado del mismo estuche. Se centrifugó durante 30seg a 14,000 rpm y se decantó el sobrenadante, este lavado se repitió dos veces más. El precipitado se secó con vacío y se resuspendió con 20 μ l de Tris-HCl 10mM pH 7.6 y EDTA 1mM pH 8. Se incubó a 37°C durante 30min para solubilizar el DNA y se centrifugó 1min a 14,000 rpm antes de tomar la alícuota de DNA. El volumen restante se almacenó a -20°C.

Cuadro V. Secuencia de los iniciadores.

Iniciadores	5'	3'
	5' PstI EcoRI 3'	5' BamHI HindIII 3'
UNAM	GGCTGCAGAATTCGACTCCTGGAGCCC G	GGGGATCCAAGCTTGGTAGCGACCGGCG C
Gibco	ATTGGTGGCGACGACTCCTGGAG	CAGACCAACTGGTAATGGTAGCG

a.



b.

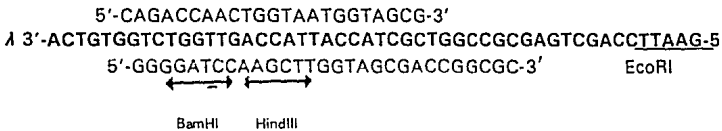


Figura 13. Secuencias de los iniciadores. a). Secuencias de los iniciadores 5' y b). secuencias de los iniciadores 3'. La región de complementaridad de los iniciadores de Gibco BRL se observa en la parte superior de la secuencia de λ gt11 (secuencia resaltada), y los de la UNAM en la parte inferior. Las secuencias subrayadas indican los sitios de corte de las enzimas de restricción.

10. MARCAJE RADIOACTIVO DEL INSERTO DE cDNA

10.1 Método de "random priming"

Para llevar a cabo el tamizado de las bibliotecas y el Southern blot, el inserto de cDNA de la clona positiva se marcó radioactivamente con ATP α -³²P. Se mezclaron 2 μ l del amortiguador de marcaje: Tris-HCl 0.5M pH 7.2, MgSO₄ 0.1M, DTT 1mM, BSA 500g/ml, 5ng del DNA del inserto purificado (2 μ l), previamente desnaturizado a 94°C durante 2min y colocado en hielo inmediatamente, 1 μ l de dGTP 1mM, 1 μ l de dTTP 1mM, 1 μ l de dCTP 1mM y 10 μ l de dATP α -³²P (Amersham Life Sci., 10 uCi/ μ l), 2 μ l de agua destilada y 1 μ l de enzima Klenow (New England Bio-Labs; 10 U/ μ l). La mezcla se incubó a 37°C durante 30min y se colocó a 65°C durante 10min para detener la reacción. Los nucleótidos no incorporados se separaron a través de una columna de Sepharosa 4B (Amersham Life Sci.) (Feinberg y Vogelstein 1983 y 1984)

10.2 Método de marcaje en un extremo (con polinucleótido cinasa)

La reacción se realizó con los iniciadores 5' y 3' sintetizados en la UNAM. El volumen de la reacción fue de 25 μ l en total y contenía 10.5pmol del iniciador 5' ó 3', 7 μ l σ -³⁵S ATP (Amersham Life Sci., 3,000 Ci/mmol, 5 mCi/ml), 13.5 μ l de agua destilada, 1 μ l de enzima T4 polinucleótido cinasa (New England Bio-Labs; 10 U/ μ l) y 2.5 μ l del amortiguador para T4 polinucleótido-cinasa 10X (500mM Tris-HCl, pH 7.6, MgCl₂ 100mM, DTT 50mM). La mezcla se incubó a 37°C durante 30min y se transfirió a 95°C durante 5min para detener la reacción, se centrifugó brevemente a temperatura ambiente y se almacenó a -20°C (Rigby y col., 1977).

11. TRANSFERENCIA DE DNA A MEMBRANA DE NYLON (SOUTHERN BLOT)

El DNA de *Taenia solium* y *Taenia saginata* (5 μ g) se digirió con las endonucleasas de restricción HindIII y EcoRI, siguiendo las instrucciones de la casa comercial (BRL). Se realizó la electroforesis del DNA a 0.15 V/cm en un gel de agarosa al 1% en TAE con bromuro de etidio (Sigma, Chemical Co.) a una concentración de 0.5 μ g/ml. El marcador de peso molecular fue DNA de λ digerido con HindIII (Boehringer Mannheim). El DNA se visualizó en un transiluminador (Hoeffer) de UV de onda corta. Para llevar a cabo la transferencia, se siguió el método descrito por Southern (1975), el gel se trató con la solución desnaturizante (NaOH 0.5M y NaCl 1.5M) durante 45min y después de lavar con agua destilada, se colocó en la solución neutralizante (Tris-HCl 1.5M pH 8 y NaCl 1.5M) durante 45min, haciendo un cambio a los 30min. La transferencia a MNH se realizó durante 16h en SSC 20X, la MNH se

lavó con SSC 2X y el DNA transferido se fijó con 1,200 μ Joules de luz UV en la cámara de irradiación (Stratagen). La hibridación se llevó a cabo a 65°C durante toda la noche con el inserto de la clona positiva previamente marcado con ATP α -³²P. La MNH se lavó tres veces con SSC 2X y SDS 0.5% durante 10min cada lavado, a la misma temperatura de hibridación y se expuso la MNH con una placa fotográfica (Sambrook y col., 1989).

12. SECUENCIACION DEL INSERTO

Para conocer la secuencia del inserto se siguió el método de inhibición del crecimiento de la cadena por dideoxinucleótidos (Sanger y Coulson, 1977), empleando el estuche de secuenciación comercial CircumVent (New England Biolabs). En un tubo de microfuga se colocaron 20ng de DNA templado de doble cadena, 1.2pmol del iniciador marcado con σ -³⁵S ATP, 1.5 μ l del amortiguador de secuenciación para CircumVent 10X (Tris-HCl 200mM pH 7.5, MgCl₂ 50mM, NaCl 250mM), 1 μ l de la solución de Tritón X-100, 30X y se adicionó agua destilada y esterilizada hasta obtener un volumen final de 14 μ l. Se adicionaron 2 U de Vent (DNA) polimerasa, se mezclaron y se agregaron 3.2 μ l de esta mezcla a cada tubo con los dideoxinucleótidos marcados, la reacción se cubrió con 100 μ l de aceite mineral y se colocó en el termociclador durante 22 ciclos; cada ciclo comprendió de 30seg a 94°C, 30seg a 53°C y 30seg a 72°C. La reacción se paró adicionando 4ml de una solución de formamida 95%, EDTA 20mM, azul de bromofenol 0.05% y xilencianol 0.05% (Sears, 1992). La reacción se desnaturalizó a 92°C durante 2min, se colocó en hielo y se separó por electroforesis en geles de poliacrilamida-urea al 4% durante 2 y 4 h a 1,400 volts y en geles al 6% durante 4 y 6 h a 1,400 volts (Sanger y col., 1977). Se leyó la secuencia nucleotídica obtenida y se analizó con el programa de computadora contenido en el paquete PC/Gene (Intelligenetics, Inc; Carmenes y col., 1989).

R E S U L T A D O S

1. OBTENCION DE SUEROS HIPERINMUNES

Se inmunizaron dos grupos de cinco ratones cada uno (A y B), con la banda correspondiente a la GP42. En la Figura 14a se observa la fracción de LLGP del cisticerco de *Taenia solium* trasferida a una MNC y teñida con Auro-dye forte (Amersham Life Sci.) y se indica la banda correspondiente a la GP42 que se utilizó para inmunizar a los ratones. Como se podrá ver la banda es doble y correspondía a 42 y 43 kDa, se decidió inmunizar a los ratones con ambas bandas para asegurar que la GP42 fuera una de las dos.

Después de inmunizar durante seis semanas se obtuvieron los sueros hiperinmunes del grupo A y los del grupo B que se inmunizaron una semana después. Antes de ser empleados para tamizar la biblioteca de cDNA, se valoró la presencia de anticuerpos por IET tanto en los sueros de ratones antes de la inmunización como en los sueros de los ratones hiperinmunes, empleando como antígeno la LLGP. Los sueros de ratones no inmunizados no reaccionaron con ninguna de las glicoproteínas. La figura 14b muestra que los sueros de los grupos A y B reaccionaron con las bandas de 42 y 43 kDa, como la respuesta fue similar se juntaron todos los sueros excepto un suero del grupo A, en el que se observó una banda adicional de 16 kDa (suero 1A).

2. ADSORCION DE SUEROS

Los sueros de ratones inmunizados, así como los sueros y LCR de enfermos con cisticercosis y de individuos sanos se incubaron con un extracto de bacterias infectadas con el fago λ gt11 para adsorber los anticuerpos contra *E. coli* y de esta forma disminuir las reacciones cruzadas. Para comprobar si la adsorción fue completa se hizo una IET utilizando como antígeno a un extracto de bacterias. Como se observa en la figura 15 con la adsorción se eliminó gran parte de los anticuerpos de reacción cruzada presentes los sueros de ratón (15a) y en las mezclas de sueros y de LCR positivos de enfermos con neurocisticercosis, (15b). Después de la primera adsorción se observó una reducción de anticuerpos en las mezclas de sueros y de LCR y cuando se realizó una segunda adsorción, sí se eliminaron más anticuerpos de reacción cruzada (Figura 15b).

Para descartar la posibilidad de que el proceso de adsorción interfiriera con la reactividad de las muestras adsorbidas, se realizó una IET empleando como antígeno a la LLGP. No se alteró la actividad de anticuerpos en las mezclas de sueros y de LCR, ya que reconocieron de igual forma a las GPs tanto las mezclas sin adsorber como las adsorbidas (Figura 16).

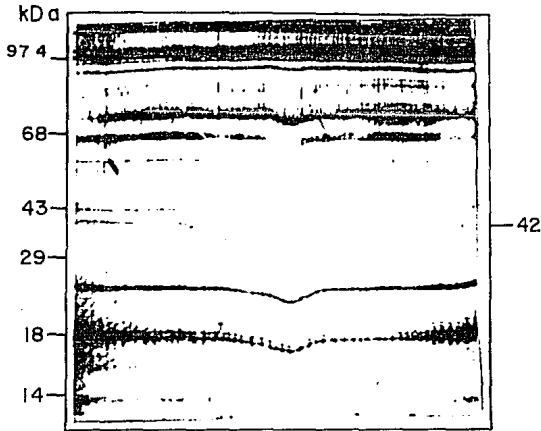
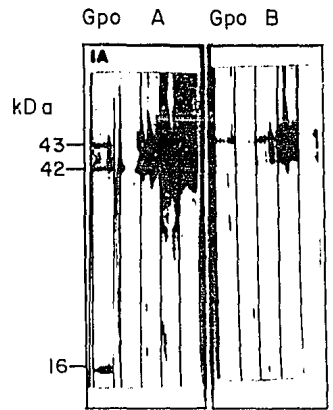
a**b**

FIGURA 14(a). Transferencia de la fracción de LLGP. Fracción de LLGP de cisticercos de *Taenia solium*, separadas en un gel de poliácridamida, transferida a una MNC y teñida con Auro-dye forte (Amersham Life Sci.). La flecha indica las bandas que se recortaron para inmunizar ratones de la cepa Balb/c. Los pesos moleculares se encuentran a la izquierda.

(b). Comprobación de la producción de anticuerpos contra GPs. Tiras de nitrocelulosa procesadas por IET de la fracción de LLGP incubadas con sueros de ratones después de la última inmunización. En el suero 1A se observa una banda adicional de 16 kDa.

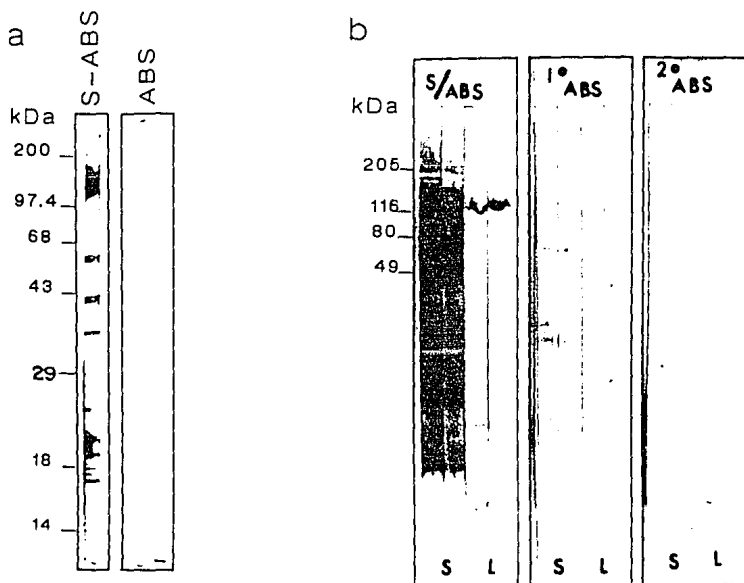


FIGURA 15. Pruebas de inespecificidad de sueros hiperinmunes contra proteínas de *E. coli*. Tiras de nitrocelulosa procesadas por IET de un extracto de bacterias infectadas con λ gt11 silvestre e incubadas con:

a) Mezcla de sueros de ratones inmunizados sin adsorber (S-ADS) y adsorbidos (ADS), para verificar la eliminación de los anticuerpos contra *E. coli* de reacción cruzada.

b) Mezclas de sueros (S) y de LCR (L) de enfermos con neurocisticercosis. Se analizaron antes (S/ADS) y después de la primera (1° ADS) y la segunda (2a ADS) adsorción. Estas muestras se analizaron por duplicado.

3. TAMIZADO DE LA BIBLIOTECA CON ANTICUERPOS

Después de amplificar la biblioteca de cDNA total de cisticercos de *T. solium* construida en λ gt11, se tituló y se obtuvieron 9×10^9 placas formadoras de lisis/ml (pfl). La biblioteca se tamizó por un lado, con la mezcla de sueros de ratón de los grupos A y B y por otro, con el suero 1A (Figura 17a); ambos a una dilución 1:100. Como testigos negativos la biblioteca se tamizó con sueros de ratones sin inmunizar y sin incubar con ningún suero así como tamizando con fagos silvestres con (Figura 17b). En el primer tamizado se obtuvieron 17 clonas positivas con la mezcla de sueros anti GP42 y 6 clonas con el suero 1A. Las clonas positivas se analizaron en un segundo tamizado y se observó que las clonas obtenidas con el suero 1A también reaccionaban con la mezcla de sueros y viceversa. En el tercer tamizado se analizaron 8 clonas que resultaron positivas en el segundo, de las cuales 7 fueron positivas con ambas muestras: clonas 1, 4, 5, 7, 9, 12 y 13, y una fue negativa: clona 2. También se analizó una clona infectada con el fago silvestre como testigo negativo: clona Y (Figura 18).

4. TAMIZADO DE LA BIBLIOTECA CON LA Sonda RADIOACTIVA

Para el tamizado con la sonda radioactiva se utilizó la biblioteca que se construyó en λ gt10, cuyo título fue de 6×10^8 pfl/ml y como sonda se empleó el inserto de la clona 5, que fue el único que se pudo purificar por su tamaño. Este tamizado se realizó con el propósito de obtener clonas con un inserto mayor y de esta forma facilitar la subclonación para realizar la secuencia. Se realizó el primer tamizado y se obtuvo una clona positiva. Sin embargo, cuando se purificó esta clona y se amplificó para realizar el segundo tamizado, no hubo señal positiva.

5. OBTENCION DE PROTEINAS DE FUSION DE LAS CLONAS LISOGENICAS Y SU IDENTIFICACION POR IET

Los fagos de las clonas que resultaron positivas en el tamizado con anticuerpos se emplearon para infectar bacterias *E. coli* cepa Y1089. Esta cepa tiene una mutación que les impide ser lisadas, esta característica permite obtener a las proteínas de fusión a partir de un extracto de bacterias y analizarlos por electroforesis. Después de realizar la infección con las siete clonas positivas y una negativa (Y, que es la cepa Y1089 infectada con λ gt11 silvestre), se realizaron numerosas subclonaciones hasta confirmar la lisogenia, esto es, que crecieran a 32°C, pero no a 42°C. Se indujo la síntesis de la enzima β -gal con IPTG en estas clonas lisogénicas y por lo tanto la de la proteína de fusión, las bacterias se lisaron y se obtuvieron tanto sobrenadantes como precipitados. Estas fracciones se analizaron por IET para verificar la producción de proteínas de fusión y su reactividad con anticuerpos.

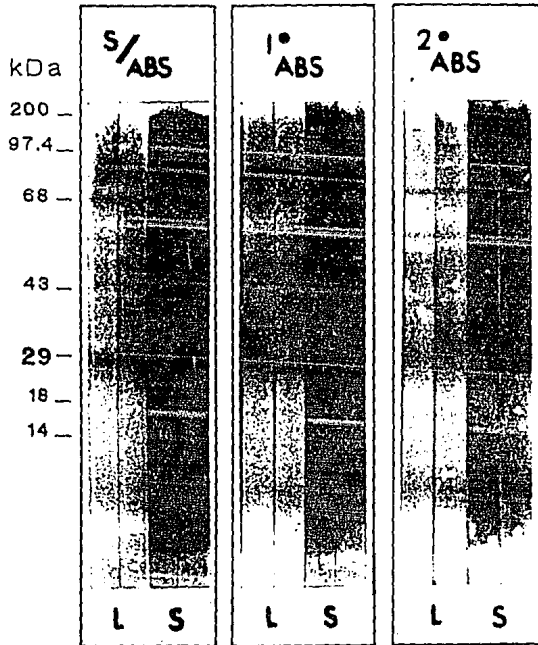


FIGURA 16. Prueba de especificidad de sueros y LCR después de la adsorción. Tiras de nitrocelulosa procesadas por IET con la fracción de LLGP e incubadas con las mezclas de sueros (S) y de LCR (L) de enfermos con neurocisticercosis antes (S/ADS) y después de la primera (1° ADS) y segunda (2a ADS) adsorción. Estas muestras se analizaron por duplicado.

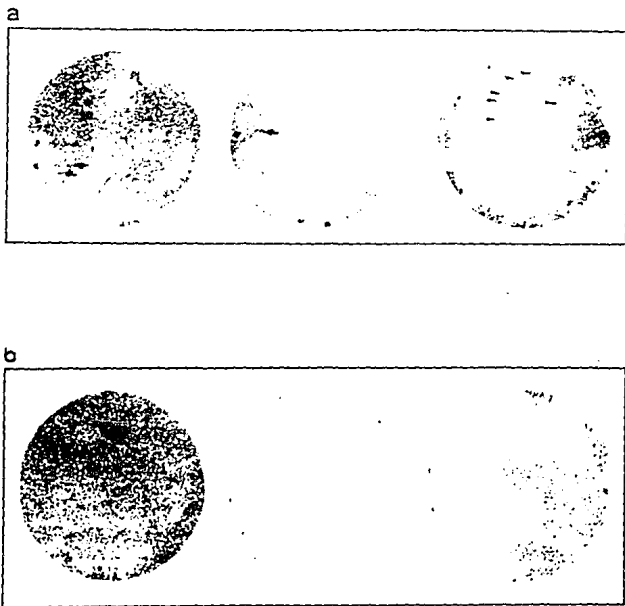


FIGURA 17. Primer tamizado de la biblioteca de cDNA de *Taenia solium*. a). MNC que muestran algunas de las clonas positivas (flechas) obtenidas cuando se emplearon sueros de ratón inmunizados con la GP42 diluïdos 1:100. Como testigos negativos (b) se emplearon: suero de ratones sin inmunizar (izquierda), sólo el segundo anticuerpo (centro) y fagos silvestres (derecha).

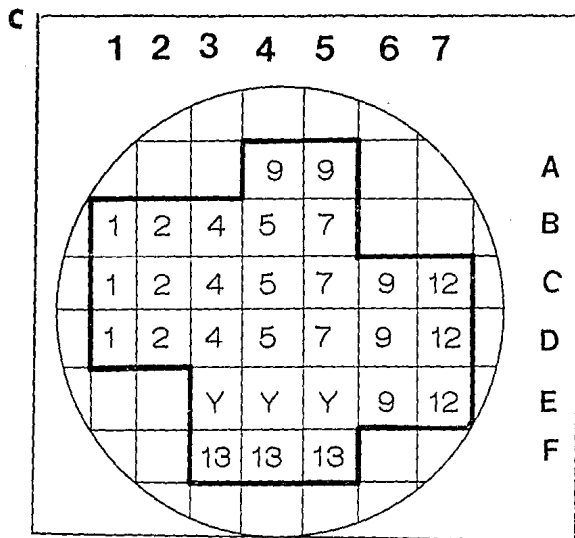
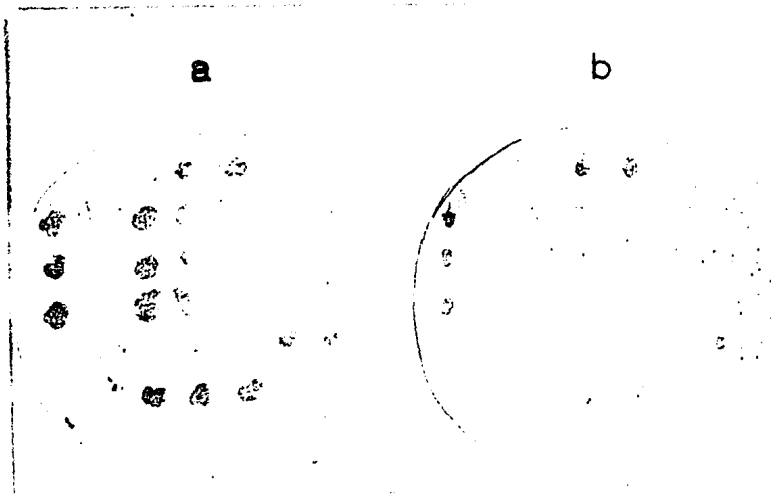


FIGURA 18. Tercer tamizado. Se analizaron ocho clonas positivas obtenidas en el segundo tamizado: a). MNC incubada con la mezcla de sueros anti GP42. b). MNC incubada con el suero 1A. c). Distribución de las clonas analizadas por triplicado: en las columnas A, B, C, D, E, F y G se colocaron por triplicado las clonas 1, 2, 4, 5, 7, 9 y 12 respectivamente. En las filas 1, 5 y 6 se colocaron las clonas 9 (por duplicado), Y (testigo negativo) y 13 respectivamente.

En la figura 19 se observa una IET de fracciones de sobrenadantes y precipitados de las clonas positivas y de la negativa así como de una muestra de β -gal como testigo positivo de la reacción; la IET se incubó con anticuerpos de ratón específicos contra β -gal. En los sobrenadantes y en los precipitados de las clonas positivas se observaron bandas de 145 y 160 kDa, pesos moleculares -mayores a 116 kDa que corresponde al peso molecular de β -gal; también se presentaron bandas de 45, 30, 16 y 14 kDa que reaccionaron con estos anticuerpos. En la clona negativa las bandas observadas son de 100, 90, 70 y 60 kDa y no se observan bandas de peso molecular mayor al de β -gal (Cuadro VI).

Después de confirmar la presencia de bandas con pesos moleculares mayores que el de β -gal en las clonas lisogénicas positivas, se verificó si estas bandas, que eran reconocidas por anticuerpos anti β -gal, también lo eran por las mezclas de sueros y LCR de enfermos con neurocisticercosis ya que se quería comprobar si la expresión de estas proteínas en *E. coli* no alteraba el reconocimiento por parte de los anticuerpos presentes en la infección natural. Para esto, se realizaron 2 IET con los sobrenadantes de las clonas positivas y la negativa y las MNC se incubaron con la mezcla de sueros ó con la mezcla de LCR, ambas previamente adsorbidas. Cuando se empleó la mezcla de sueros, el rango de pesos moleculares de las bandas era de 205 kDa a 14 kDa aproximadamente (Figura 20). Al analizar las bandas de las clonas positivas se observó una zona muy densa entre los 156 y 80 kDa que no se presentó en la clona negativa. Otras bandas específicas de la mayoría de las clonas positivas fueron las de 65, 45, 28 y 14 kDa, estas bandas no se observan en la clona negativa. Llama la atención el patrón de bandas de las clonas 4, 5 y 7 ya que comparten todas las bandas, lo que sugiere que se tratar de la misma clona. La banda de 49 kDa se encontró en todas las clonas positivas y en la negativa, por lo que no es específica (Cuadro VII).

Cuando se empleó la mezcla de LCR positivos previamente adsorbida, se obtuvieron menos bandas que con la mezcla de sueros. En la clona 1 hubo una zona que abarcó de los 116 kDa a los 85 kDa aproximadamente y bandas de 35 y 29 kDa. En las clonas 4, 5 y 7 se presentó una zona intensa comprendida entre los 205 y 80 kDa, que no se observó en la clona negativa y el patrón de bandas también se mantuvo muy semejante al obtenido con la mezcla de sueros. Aún cuando en las clonas 9 y 13 no se observaron bandas mayores a β -gal, sí se presentaron bandas de 16 y 6 kDa en la clona 9, que no se presentaron en la clona negativa. En esta misma clona se presentó la banda de 49 kDa que también se observó en la mezcla de los sueros. A diferencia de todas las clonas positivas, en la clona Y (negativa) no se presentó ninguna banda (Figura 21, Cuadro VIII).

Las proteínas de fusión de las clonas Y (testigo negativo), 7, 9, 12 y 13 se purificaron, empleando una columna de inmutioafinidad de anticuerpos contra β -gal. Las proteínas purificadas de las dos primeras clonas se analizaron en un gel de poliacrilamida teñido con plata; en la clona 7 se observó una banda de 65 kDa que no se presentó en la clona negativa Y, aún cuando ambas clonas comparten otras bandas de diferentes pesos moleculares (Figura 22a). Las proteínas purificadas se analizaron por IET, empleando la mezcla de sueros positivos usada. Se observó una banda de 65 kDa aproximadamente en las clonas positivas, mientras que en la clona negativa esta banda no estuvo presente (Figura 22b, Cuadro IX).

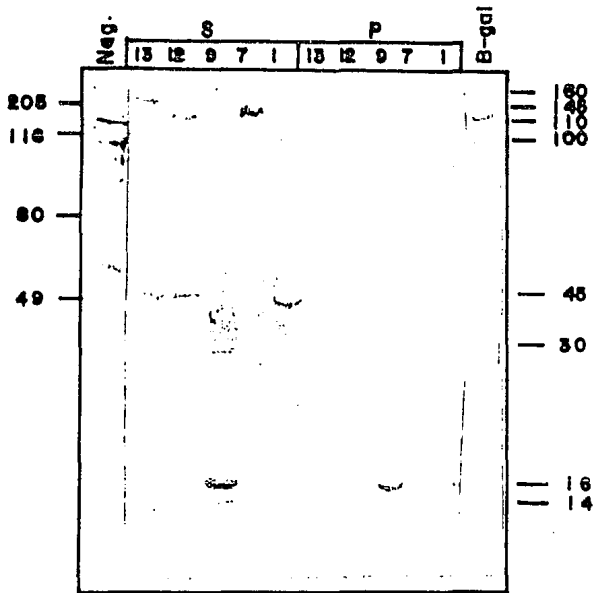


FIGURA 19. Análisis de la producción de proteínas de fusión. IET con los sobrenadantes (S.) y precipitados (P) de cinco clonas positivas (13, 12, 9, 7 y 1), la clona negativa (clona infectada con el fago silvestre; Neg) y como testigo positivo β -gal comercial, incubada con suero de ratón anti β -gal diluído 1:100. Los números superiores indican el número de la clona. Los pesos moleculares de la derecha indican los pesos de las bandas obtenidas.

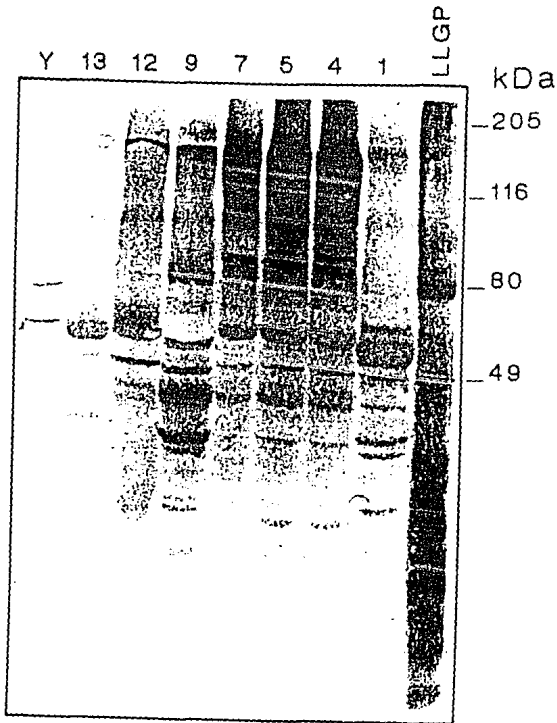


FIGURA 20. Reconocimiento de las proteínas de fusión por sueros de enfermos con neurocisticercosis. IET realizada con los sobrenadantes de las clonas positivas y de la negativa (Y), así como con la fracción de LLGP como testigo positivo. Como fuente de anticuerpos se empleó la mezcla de sueros de enfermos con neurocisticercosis, previamente adsorbida, diluída 1:100. Los números superiores indican el número de cada clona analizada.

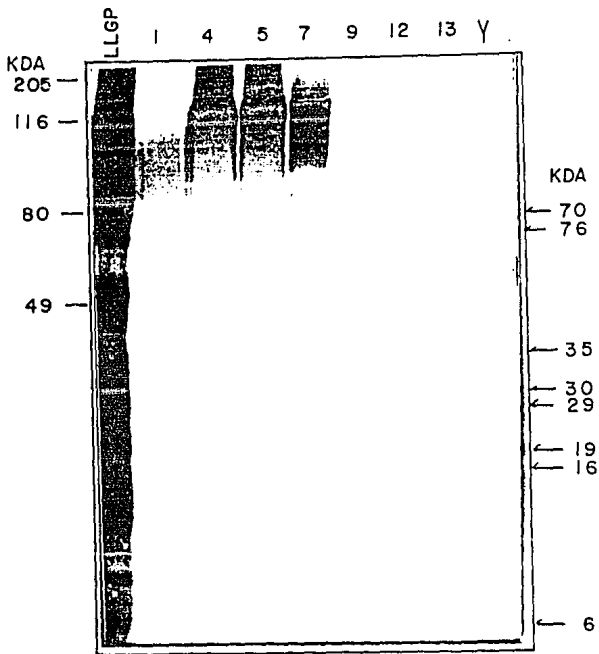


FIGURA 21. Reconocimiento de las proteínas de fusión por LCR de enfermos con neurocisticercosis. IET con los sobrenadantes de las clonas positivas y de la negativa (Y), así como la fracción de LLGP como testigo positivo. Se empleó la mezcla de LCR de enfermos con neurocisticercosis, previamente adsorbida, diluída 1:100. Los números superiores indican el número de cada clona. Los pesos moleculares de la derecha indican los pesos de las bandas obtenidas.

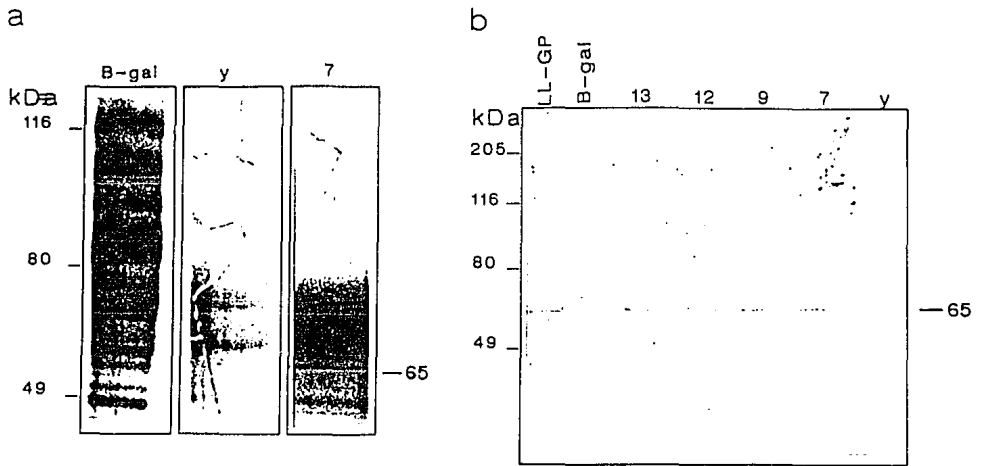


FIGURA 22 (a). Gel de poliacrilamida teñido con plata. Se analizaron las proteínas de fusión purificadas de la clona positiva 7 y de la negativa (Y). Una muestra de β -gal también se corrió como testigo positivo.

(b). Reconocimiento de las proteínas de fusión purificadas por los sueros de enfermos con neurocisticercosis. IET con las proteínas de fusión purificadas de las clonas 9, 12, 13 y Y (clona negativa). Se utilizó la mezcla de sueros de enfermos con neurocisticercosis, previamente adsorbida, diluída 1:100. Los números superiores indican el número de cada clona. Unicamente se observa una banda específica.

CUADRO VI. PRINCIPALES BANDAS OBTENIDAS EN LA INMUNOELECTROTRANSFERENCIA DE LAS CLONAS POSITIVAS EMPLEANDO ANTICUERPOS ANTI β -GAL.

CLONA No.	B A N D A S											
	160	145	116	110	100	90	70	60	45	30	16	14
1					S				S			S
7		S, P		P	S, P							
9					S					S	S, P	S, P
12		S, P			S, P				S			
13	S			P	S, P				S			
Y			S		S	S	S	S				

S indica que la banda se observó en el sobrenadante.
 P indica que la banda se observó en el precipitado.

CUADRO VII. PRINCIPALES BANDAS OBTENIDAS EN LA INMUNOELECTROTRANSFERENCIA DE LAS CLONAS POSITIVAS EMPLEANDO UNA MEZCLA DESUERO DE ENFERMOS CON CISTICERCOSIS.

BANDA (kDa)	C L O N A No.							
	1	4	5	7	9	12	13	Y
180								+
160							+	
156-80	+	+	+	+	+	+		
140								+
76					+			+
74					+			+
70	+	+	+					
65		+	+	+		+	+	
60	+				+			+
49	+	+	+	+	+	+	+	+
45		+	+	+	+	+		
43	+	+	+	+	+	+		
40							+	
30							+	
28	+	+	+		+			+
25	+				+			
18								+
14		+	+	+				+

CUADRO VIII. PRINCIPALES BANDAS OBTENIDAS EN LA INMUNOELECTROTRANSFERENCIA DE LAS CLONAS POSITIVAS EMPLEANDO UNA MEZCLA DE LCR DE ENFERMOS CON CISTICERCOSIS.

BANDA (kDa)	C L O N A No.							
	1	4	5	7	9	12	13	Y
205-80		+	+	+				
116-85	+							
76								+
49					+			
35	+							
30		+	+	+		+	+	
29	+							
19				+		+		
16					+	+		
6					+			

CUADRO IX. BANDAS OBTENIDAS AL EMPLEAR LAS PROTEINAS DE FUSION PURIFICADAS DE LAS CLONAS POSITIVAS

CLONA No.	IET EMPLEANDO SUEROS DE ENFERMOS CON CISTICERCOSIS (kDa)	GEL DE POLIACRILAMIDA TEÑIDO CON PLATA (kDa)
7	65	49, 65, 70, 75
12	65	ND
13	65	ND
Y	-	49, 70, 75

ND= NO DETERMINADAS

En el Cuadro X se resumen todos los datos de los pesos moleculares de las proteínas recombinantes para *T. solium*, como se podrá ver, cuando se emplearon anticuerpos anti β -gal, las bandas específicas son de 45 kDa para las clonas 1, 12 y 13 y de 145 kDa para las clonas 12 y 13, así como la de 160 kDa para la clona 13. La banda de 45 kDa, sigue siendo específica cuando se empleó la mezcla de sueros, pues se presenta en las clonas 4, 5, 7, 9 y 12. La banda de 65 kDa se observa en varias clonas positivas al emplear la mezcla de sueros de enfermos con neurocisticercosis y cuando se purifican las proteínas de fusión a través de la columna de afinidad acoplada a anticuerpos anti β -gal. La zona intensa que podría comprender varias bandas, se observa sólo en las clonas positivas cuando se emplearon las mezclas de sueros ó de LCR de enfermos con neurocisticercosis.

6. OBTENCION DE LOS INSERTOS DE cDNA DE LAS CLONAS POSITIVAS.

El DNA de los fagos de las siete clonas positivas y el de la clona negativa se purificó y después se digirió con la enzima de restricción EcoRI. Por éste método no fue posible determinar el tamaño de los insertos cuando se analizaron en un gel de agarosa al 1%, por lo que fue necesario realizar la PCR, empleando dos tipos de iniciadores (Figura 13): los primeros de Gibco BRL que fueron de 23 nucleótidos y los segundos se construyeron en la UNAM. Estos últimos se utilizaron para que al amplificar los insertos, éstos llevaran los sitios de reconocimiento de las enzimas PstI y EcoRI en el extremo 5' y BamHI y HindIII en el extremo 3', porque se pretendía subclonar en el fago M13 para secuenciar. Cuando se emplearon los primeros iniciadores, los insertos obtenidos fueron de 90, 190 y 360 pb (Figura 23a, Cuadro XI); cuando se utilizaron los segundos, sólo fue posible determinar el tamaño del inserto en la clona 5, obteniendo una banda de 1000 pb, otra de 600 pb y la más pequeña de 190 pb en la misma clona (Figura 23b, Cuadro XI).

7. SOUTHERN BLOT

La digestión del DNA, tanto de *Taenia solium* como de *Taenia saginata*, fue completa con las dos enzimas de restricción usadas, (EcoRI y HindIII) (Figura 24a). En los resultados obtenidos de la hibridación del DNA, empleando como sonda el inserto de la clona positiva 5, sólo reaccionó con el DNA del inserto purificado de la clona 5 (carril 9, Figura 24b).

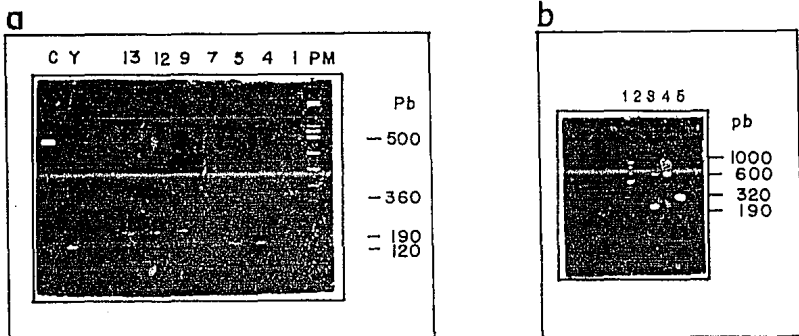


FIGURA 23 (a). Productos de PCR de las clonas positivas y la negativa, empleando los iniciadores de Gibco BRL. El testigo positivo (C) fue un inserto amplificado de 500 pb. Los números superiores indican el número de las clonas analizadas. El marcador de pesos moleculares fue DNA de pUCBM 21 digerido con HpaII, HindII y DraI.

(b) Producto de PCR de la clona 5, empleando los iniciadores sintetizados en la UNAM. El marcador de pesos moleculares fue DNA de λ digerido con HindIII y EcoRI (carril 1); productos de PCR de la clona 5, donde se observan tres bandas: la de 1000 pb muy tenue, de 600 y de 190 pb (carriles 3 y 4); un testigo de 320 pb (carril 5).

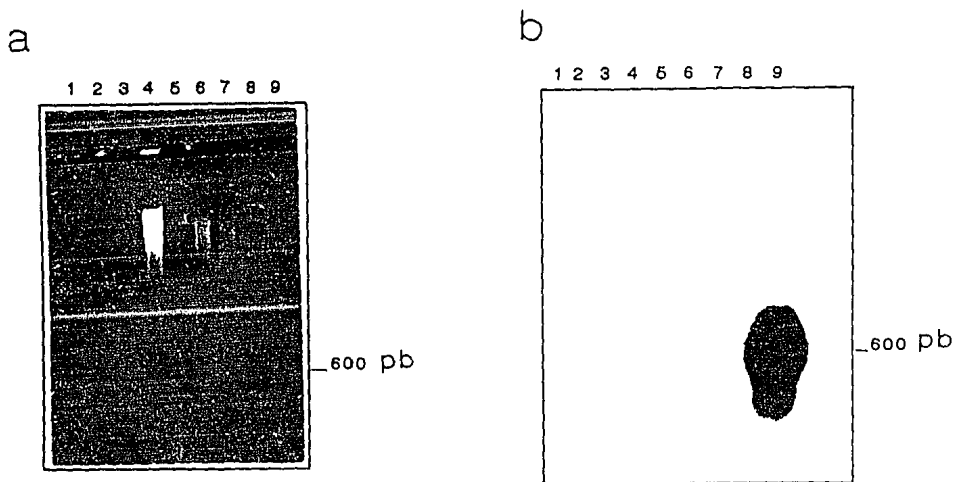


FIGURA 24 (a). Electroforesis en gel de agarosa. Se analizaron 5 μ g de DNA de *Taenia solium* digerido con las endonucleasas de restricción EcoRI y HindIII (carriles 3 y 4) y 5 μ g DNA de *Taenia saginata* digerido con las mismas enzimas (carriles 6 y 7). Como marcador de pesos moleculares se ve el DNA de λ digerido con HindIII (carril 1) y DNA del inserto purificado de la clona 5 (carril 9).

(b). Southern blot del DNA De *T. solium*, y de *T. saginata*. La disposición de las muestras es la misma que en la figura 24a. Se hibridó con la sonda del inserto de la clona 5 (carril 9), como testigo positivo) que es claramente visible.

CUADRO X. TAMAÑOS DE LAS PROTEINAS DE FUSION APARENTEMENTE ESPECIFICAS PARA *Taenia solium*

CLONA No.	ANTICUERPOS CONTRA β -GAL (kDa)	SUEROS DE ENFERMOS CON CISTICERCOSIS (kDa)	LCR DE ENFERMOS CON CISTICERCOSIS (kDa)	PROT. DE FUSION PURIFICADAS
1	-	156 70 60	116-85 35 29	
4	-	45 156-80 65	205-80 30 19	
5	-	45 156-80 65	205-80 30 19	
7	145	45 156-80 65	205-80 19 16	65
9	30	45 156-80 70 60	6 16	65
12	145 45	45 156-80 65	30 19 16	65
13	160 45	160 65	30	65

CUADRO XI. TAMAÑOS DE LOS INSERTOS DE LAS CLONAS AMPLIFICADOS POR PCR.

CLONA No.	INICIADORES DE GIBCO BRL	INICIADORES DE LA UNAM
1	360	
4	360 190 90	
5	90	1000 600 190
7	360	
9	190	
12	190	
13	190	
Y	90	

8. SECUENCIA DEL INSERTO

Para conocer la secuencia de nucleótidos del inserto de 600 pb de la clona 5, se utilizaron los iniciadores marcados en un extremo con la enzima polinucleótido cinasa con ^{32}P y la reacción se llevó a cabo por el método de Sanger, empleando un estuche de CircumVent. En la secuencia se presentaron numerosas dobles estructuras, lo que impidió leer completamente la secuencia de este inserto, aún cuando se usaron tanto el iniciador 5' como el 3' para secuenciar.

Con ambos iniciadores se obtuvieron secuencias parciales del inserto. La secuencia obtenida con el iniciador 5' se utilizó para deducir la secuencia de aminoácidos en sus tres fases. Se realizó la búsqueda de homologías con otras proteínas, cuyas secuencias se encuentran almacenadas en el programa PC-Gene. La secuencia parcial de nucleótidos y de aminoácidos del inserto de la clona 5 se muestra en la figura 25. Aún cuando la secuencia de aminoácidos empleada sólo incluía 40 aminoácidos en un marco de lectura abierto, al realizar la búsqueda, se encontró homología con un precursor de una glicoproteína de fusión del virus SV5 (VGLF-SV5). De un marcador de 320 puntos, se obtuvo el 19.5% de homología. Por lo tanto, se consideró que esta homología no era significativa.

TTGCTGGCAGGTGCCGGGGCATTAGGTGCAGCTATCTCGTTTAGTTCGNNACGCTGGNN	60
<u>LLAGAGALGRAISFSSXTLX</u>	
AAAGATATTATCACCGGGTATTTATTTCAGTTTGAGAACGGTTGCACACTGGTGATTTCG	120
<u>KDIITGVFIQXENGCTLVIS</u>	
TGACTATCGGGCCGTTGACCGGCACAGTGGAACGGACTGTCGATTGCTCCGTAGGCCGTA	180
<u>-LSGR-PAQWNGLSIRSVGV</u>	
CGCGGTACCGGGGCATACATCATTCCGTGGTCTNGGTGAACCACCTTTGCA	235
<u>R R Y R G L S H H S V V X V N H L C</u>	

Figura 25. Secuencia parcial de nucleótidos y de aminoácidos del inserto de la clona 5. Los aminoácidos subrayados corresponden a la región de homología.

D I S C U S I O N

Uno de los principales problemas prácticos de la parasitología es el diagnóstico preciso, considerando que generalmente es de gran importancia determinar el agente patológico para definir el tratamiento. Se han descrito numerosas técnicas inmunológica que diagnostican con exactitud diversas parasitosis. Sin embargo, para llevar a cabo tal procedimiento es necesario contar con proteínas antigénicas de preferencia puras, cuya obtención se dificulta por los procedimientos convencionales, o bien, porque las cantidades obtenidas son mínimas ó los parásitos necesarios para obtenerlas son difíciles de conseguir. Algunas veces el inmunodiagnóstico emplea extractos totales del parásito, lo que ocasiona reacciones cruzadas con otros parásitos.

Una de las aplicaciones más exitosas de la tecnología del DNA recombinante es la clonación de antígenos de parásitos para la producción de proteínas puras en cantidades suficientes. En el Cuadro III se describen algunos ejemplos de proteínas de parásitos que han sido clonadas y evaluadas como antígenos y que han dado altos porcentajes de sensibilidad y especificidad.

Para el inmunodiagnóstico de la cisticercosis se han descrito numerosas técnicas (Flisser y Larralde, 1986; Flisser, 1994), entre las que se encuentran el ELISA (Espinoza y col., 1986) y la IET (Tsang y col., 1989). Esta última emplea una fracción enriquecida de glicoproteínas (LLGP) del cisticerco de *Taenia solium* y tiene una sensibilidad cercana al 98% y una especificidad del 100%. Las GPs más frecuentemente reconocidas por las muestras de los enfermos con cisticercosis son la GP50, la GP42 y la GP24 (Tsang y col., 1989; Feldman y col., 1990; Díaz y col., 1992). Plancarte y colaboradores (1994), purificaron la GP24 utilizando la técnica de electroelución y obtuvieron 100% de especificidad y sensibilidad al evaluar la GP24 pura con la técnica de inmunopunto con muestras de enfermos con neurocisticercosis. Sin embargo, el proceso de purificación de la GP24, así como el de la obtención de la fracción de la LLGP, implica un enorme esfuerzo, consumo considerable de tiempo y de reactivos y las cantidades obtenidas son restringidas. Además, para su obtención es necesario contar con carne de cerdo infectada con cisticercos, cuya obtención es cada vez más problemática.

Así como en otras parasitosis se ha optado por buscar una vía alternativa de obtención de antígenos por medio de la clonación y expresión de genes en organismos procaríotes como *E. coli* (Coppel y col., 1993), para el caso de la cisticercosis se procedió a identificar las clonas de una biblioteca de cDNA de *Taenia solium* que expresaran a la GP42 para utilizarla en el inmunodiagnóstico de la cisticercosis humana, pues como se mencionó es una de las GPs más frecuentemente reconocidas por las muestras de enfermos con cisticercosis.

Una duda que surge cuando se considera la clonación y expresión de glicoproteínas en sistemas procariotes es que con esta metodología no se lleva a cabo el proceso de glicosilación por que las bacterias carecen de organelos como el aparato de Golgi, donde se realiza este proceso. Sin embargo, al eliminar la porción de carbohidratos de las siete GPs del cisticerco con diferentes tratamientos como por ejemplo el peryodato y analizar su antigenicidad, Plancarte demostró que la parte protéica era la reconocida por los sueros de los enfermos con cisticercosis (comunicación personal). Por otro lado, Hyon y colaboradores (1993) informaron la caracterización de las GPs digeridas con diferentes enzimas y tratamientos químicos y los resultados obtenidos, al igual que los de Plancarte, sugieren que la actividad antigénica depende de la parte protéica y no de los carbohidratos. Por otro lado, se realizó una traducción e inmunoprecipitación *in vitro* con el mRNA de *T. solium* con un suero de conejo anti GP24 y se obtuvo una banda que reaccionó con este suero (García-Domínguez, comunicación personal).

Handman y colaboradores (1993) reportaron la construcción de una biblioteca genómica de expresión en λ gt11 empleando DNA de promastigotes de *Leishmania major*. Se identificaron dos clones positivas que fueron secuenciadas. La secuencia nucleotídica de estas clones confirmó que se trataba de proteínas con sitios para la glicosilación. Estas clones fueron reconocidas por anticuerpos de conejo en contra de las GPs, lo que demuestra que se pueden obtener proteínas recombinantes con actividad antigénica aún sin la porción glicosídica.

Para obtener proteínas recombinantes de *T. solium* se utilizó una biblioteca de cDNA construida a partir del mRNA de cisticercos de *T. solium* en λ gt11, que incluía a los mRNA de todos los tamaños (Landa, 1992). Las ventajas de utilizar el mRNA para la construcción de bibliotecas es que se descarta la posibilidad de obtener proteínas extrañas por la presencia de intrones, ya que en los organismos procariotes no se lleva a cabo las modificaciones del RNA tales como el "splicing", además el uso de mRNA garantiza la obtención de proteínas producidas normalmente en ese estadio de vida del parásito. Para realizar el tamizado de esta biblioteca se obtuvieron anticuerpos en contra de la GP42 mediante la inmunización de ratones cepa Balb/c con la banda correspondiente a la GP42, cortada de una membrana de nitocelulosa (MNC) a la cual se habían transferido las proteínas de la fracción LLGP, ya que se ha reportado que los antisueros dirigidos en contra de material desnaturalizado, son más adecuados para el tamizado de las proteínas de fusión que no se encuentran en su conformación nativa, y los determinantes lineales predominan en los antígenos (Maizels y col., 1991). Por la proximidad de la banda de 42 kDa con una de 43 kDa, y con el propósito de asegurar que una de las dos corresponda a la inmunodominante GP42, se cortaron ambas bandas juntas. Cuando se analizó la producción de anticuerpos se observó que reconocían las bandas de 42 y 43 kDa. El suero del ratón 1A, además de presentar las dos bandas, también reconoció un antígeno de 16 kDa; como todos los ratones fueron inmunizados con el mismo fragmento de nitocelulosa, esta diferencia se debe relacionar con la respuesta inmune particular del ratón en cuestión.

Una vez obtenidos los anticuerpos contra GP42 y eliminados los anticuerpos de reacción cruzada con *E. coli*, que impedían definir claramente la banda o bandas específicas de *T. solium* por la inespecificidad debida a los anticuerpos de reacción cruzada, se realizó el primer tamizado, en el cual se obtuvieron varias clonas positivas. Estas clonas se utilizaron para realizar el segundo tamizado, obteniendo ocho clonas positivas (cinco de las cuales se obtuvieron con la mezcla de sueros de ratones y tres con el suero 1A). Sin embargo, se consideró conveniente confirmar la positividad de las mismas con un tercer tamizado, con el cual siete continuaron positivas. Cabe mencionar que todas las clonas reaccionaron igual con ambos sueros (mezcla y 1A). A partir de ésto, las clonas y los sueros se trataron indistintamente, ya que no hubo diferencias en el reconocimiento de antígenos aún con el suero 1A que reconoció una banda de 16 kDa adicional.

Coppel y colaboradores (1993) han informado que pueden existir clonas falsas positivas cuando se utiliza el segundo anticuerpo acoplado a fosfatasa alcalina. Sin embargo, este sistema es aproximadamente 10 veces más sensible que el sistema de peroxidasa (Mierendorf y col., 1987). La detección de clonas basada en el sistema de fosfatasa alcalina es más rápido, sensible y menos costoso que los sistemas de detección basados en radioactividad, además, permite la localización exacta de las placas de lisis en la MNC que al utilizar la marca radioactiva. Como testigo negativo se incluyó en el tamizado primario una MNC como las otras que contenía la biblioteca de cDNA, pero que no se incubó con los sueros de ratones anti GPs, sino únicamente con el segundo anticuerpo acoplado a fosfatasa alcalina. No se observó reacción con las clonas de la biblioteca, lo que demuestra la limpieza del sistema de revelado. Otro testigo negativo fue una MNC incubada con sueros de ratones sin inmunizar; en este caso hubo reacción inespecífica que indica que los anticuerpos contra *E. coli* no se eliminaron completamente, sin embargo, no se observó ninguna clona positiva. Ambos testigos apoyan que la positividad de las clonas es real. A pesar de que se ha informado que el uso de anticuerpos monoclonales provee mejores resultados para tamizar las bibliotecas de cDNA en lo que se refiere a reacción inespecífica, es más frecuente el uso de anticuerpos policlonales ya que se tiene la ventaja de reconocer más de un epitopo de la proteína de interés, lo que permite tener mayor posibilidad de identificar una clona positiva (Maizels y col., 1991).

Después de obtener las clonas positivas en el tercer tamizado se procedió a verificar si realmente estas clonas expresaban proteínas de fusión, por lo que se infectaron bacterias *E. coli* cepa Y1089 y después de numerosos intentos, se lograron obtener clonas lisogénicas. Aún cuando las bacterias se crecieron en un medio que contenía maltosa que induce en las bacterias la expresión de un receptor para el fago (Huynh y col., 1985), lo que facilita en teoría la obtención de clonas lisogénicas. Sin embargo, no todas las bacterias se infectaban, quizá porque no había una relación proporcional entre bacterias y fagos; después de estandarizar esta relación fué posible obtener clonas que realmente estaban infectadas, lo que se demostró cuando las clonas solo crecieron a 32°C y no a 42°C.

Se realizó una IET con los sobrenadantes y precipitados de las clonas positivas empleando anticuerpos contra β -gal para ver en qué fracción se encontraban las proteínas de fusión. Se identificaron más bandas en los sobrenadantes que en los precipitados, lo que indica que hay más proteínas de fusión solubles y las bandas que están en ambas fracciones podrían deberse a que algunas bacterias no se lisaron completamente. Con base en estos resultados se decidió utilizar los sobrenadantes en los experimentos subsecuentes.

Algunos autores han recomendado el uso de electroforesis en geles de poliacrilamida para el análisis de las proteínas de fusión (Huynh y col., 1985; Silhavy y Beckwith, 1985; Hemmings y McManus, 1989), pues como solo hay pocas proteínas de la bacteria que tienen peso molecular mayor al de β -gal, al encontrar una probablemente sea la enzima unida a la proteína recombinante (Silhavy y Beckwith, 1985). En este trabajo se realizó además la técnica de IET con las clonas positivas y anticuerpos contra β -gal para comprobar que la banda de peso mayor a 116 kDa realmente es la enzima unida a una proteína de fusión.

Aunque el peso molecular de β -gal es de 116 kDa se observaron bandas de peso molecular menor, probablemente esto se deba a que las proteínas de fusión se fragmentaron ó se degradaron por su gran tamaño, aún cuando se utilizaron inhibidores de proteasas y la cepa de bacterias empleada para la expresión de la proteína de fusión es deficiente en la proteasa Lon, que es una de las proteasas responsables de la baja estabilidad de proteínas extrañas o anormales en *E. coli* (Goldberg y St. John, 1976; Goff y Goldberg, 1985). Por otro lado, Appel y colaboradores (1965) informaron la existencia de múltiples formas de peso molecular menor al de β -gal, entre ellas de 34s y 16s, las cuales se pueden agregar entre sí y se encuentran cuando el cultivo celular es inducido con IPTG, a diferencia del cultivo sin inducir, en el cual sólo aparece la banda de 34s. Craven y colaboradores (1964) informaron que β -gal está compuesta de varios tipos de subunidades químicamente diferentes, por lo que posteriormente se propuso que las diferentes formas obtenidas podrían ser moléculas de β -gal con diferentes proporciones de los diferentes péptidos (Appel y col., 1965). La presencia de las bandas de 60 y 90 kDa que se observan aún en la clona negativa podrían corresponder a las diferentes formas de β -gal que se han descrito, por lo que son reconocidas por anticuerpos contra β -gal.

Antes de comprobar si las proteínas de fusión expresadas por las clonas positivas eran reconocidas por los anticuerpos presentes en sueros y LCR de enfermos con cisticercosis, se adsorbieron los anticuerpos contra *E. coli* ya que las proteínas de fusión fueron tamizadas *in situ*, o sea en presencia de los demás productos bacterianos, por lo que fue necesario eliminar estos anticuerpos antes de realizar el tamizado. Se ha informado que existen altos niveles de anticuerpos en contra de β -gal y otros componentes de *E. coli* en sueros humanos, pues como es una bacteria presente en la mayoría de los mamíferos, el sistema inmune la reconoce y crea una respuesta inmune

(Sthal y col., 1984; Knobloch y col., 1987). Después de la segunda adsorción si fue posible eliminar más anticuerpos de reacción cruzada que aquellos eliminados en la primera, por lo que se realizaron dos adsorciones antes de ser empleados para realizar la IET. También se demostró que el proceso de adsorción no alteró la actividad de los anticuerpos contra de las GPs, ya que reaccionaron con igual intensidad antes y después de la adsorción, demostrando que es un método seguro que permite eliminar anticuerpos de reacción cruzada sin interferir con la actividad antigénica de los anticuerpos. Sin embargo, en el proceso de adsorción se invierte tiempo por lo que es mejor o te er las proteí as de fusió puras para realizar estudios epidemiológicos.

Se realizó la IET con los sobrenadantes de las clonas positivas y se empleó la mezcla adsorbida de sueros de enfermos con cisticercosis, se observaron bandas mayores a 116 kDa. En algunas clonas se observó una zona intensa comprendida entre los 156 y 80 kDa, que no se encontraba en la clona negativa. Esto llamó la atención ya que podría tratarse de una o varias bandas comprendidas en esta región, con una fuerte actividad antigénica, o bien, que estas clonas sobreexpresaran a las proteínas de fusión lo que da un barrido por exceso de muestra ya que se colocaron las mismas concentraciones para cada clona. Otra posible explicación del por qué hay proteínas que dan una señal muy fuerte en la IET, podría ser que se tratara de genes que codifican para proteínas altamente repetidas. Se ha propuesto la existencia de genes que codifican para proteínas altamente repetidas en *Plasmodium falciparum* y *Leishmania* detectadas por inmunoensayo y se observa que dan una señal fuerte (Kemp y col., 1987; Adam y col., 1988 y Stanley y col., 1990). Estas proteínas son comunes en los organismos superiores e incluyen proteínas tan diversas como la colágena (Bornstein y Sage, 1980), la superfamilia de las inmunoglobulinas y la RNA polimerasa II (Jackson y Tjian, 1988).

En algunas clonas se observa un patrón de bandeo igual, como son las clonas 4, 5 y 7 lo que indica que estas clonas pudieran ser las mismas, pues al purificar las clonas positivas obtenidas en el primer tamizado, estas se amplificaron, dando origen a numerosas clonas derivadas de las primeras y al ser analizadas en el segundo tamizado, se obtuvieron como positivas. Con estas clonas se realizó el tercer tamizado, en el que se confirmó la positividad y por lo tanto la factibilidad de que se derivaran de la misma clona. Laurent y col., han informado de la clonación de genes del esporozoito de *Eimeria acervulina*, se obtuvieron tres clonas positivas y se secuenciaron, al analizar la secuencia nucleotídica se observó que todas tenían la misma secuencia, lo que indica que sí es posible obtener varias subclonas positivas que codifican para el mismo péptido (Laurent y col., 1993).

Existen bandas que son específicas para las clonas positivas ya que no se observan en *E. coli* Y1089 infectada con λ gt11 silvestre. Además de la zona comprendida entre los 156 y 80 kDa, estan las bandas de 65 y 45 kDa que solo se encontraron en las clonas positivas, mientras que la banda de 49 kDa se encontró en el testigo negativo. Considerando que la banda más grande es de 156 kDa, y como el péptido de *T. solium* debe estar fusionado a β -gal completa (116 kDa), se esperaría tener

un péptido de aproximadamente 40 kDa. En el caso de las clonas con bandas menores es difícil predecir el tamaño del péptido ya que no se sabe exactamente donde ocurrió el fraccionamiento de la proteína de fusión o bien, si están fusionadas a alguna de las diferentes formas de β -gal.

Cuando se utilizó la mezcla adsorbida de LCR de enfermos con neurocisticercosis, la disminución de bandas inespecíficas fue considerable, es más, en la clona negativa no se observó ninguna banda. Esta disminución de bandas inespecíficas demuestra que el LCR es un sistema más limpio que el suero, pues, como se ha informado en los trabajos de inmunodiagnóstico de la cisticercosis humana con ELISA, tiene una sensibilidad de 95% cuando se utiliza el LCR y del 85% con suero y el LCR tiene menor concentración de proteínas y células que el suero, aún en enfermos con neurocisticercosis (Espinoza y col., 1986).

También con LCR las clonas 1, 4, 5 y 7 presentaron la zona intensa comprendida entre los 205 y los 80 kDa que se observó en la IET de las clonas positivas empleando la mezcla adsorbida de sueros de enfermos con cisticercosis. Como se observa en el Cuadro IX hay varias bandas que no se presentaron en el testigo negativo, por lo que podrían considerarse como específicas. Sin embargo, no es posible deducir su tamaño probablemente porque hay un exceso de esta proteína de fusión debido a una sobre-expresión. Al usar LCR se vieron en general menos bandas, incluyendo la banda de 49 kDa, que es inespecífica. El hecho de que el sistema de LCR sea más limpio usando proteínas de fusión, sugiere que se podría realizar el inmunodiagnóstico de la cisticercosis humana con él.

La purificación de las proteínas de fusión a través de la columna de afinidad produjo cantidades muy pequeñas de éstas, por lo que para visualizarlas fue necesario teñir el gel con nitrato de plata, ya que con azul de Coomassie no fue posible observar bandas. Al analizar el gel teñido con plata, se observaron varias bandas tanto en la clona positiva como en la negativa. La presencia de bandas similares podría deberse a que β -gal se está fraccionando ó presentando en sus diferentes formas y, como fueron purificadas a través de la columna acoplada a anticuerpos contra β -gal, estas bandas también se purificaron. En la clona 7 se observó una banda de 65 kDa que no estaba presente en el testigo negativo, para comprobar que esta banda de 65 kDa era reconocida por los anticuerpos contra el cisticerco, se analizaron por IET las proteínas de fusión purificadas, empleando la mezcla adsorbida de sueros de enfermos con cisticercosis. La banda de 65 kDa fue reconocida por estos anticuerpos, lo que indica que esta proteína es un producto de expresión fusionado a β -gal y que podría ser utilizada para el diagnóstico de la cisticercosis humana.

No fue posible obtener el tamaño de los insertos de DNA de *T. solium* por medio de la digestión con la enzima EcoRI. La explicación más factible es que se produjo un daño en el sitio de clonación durante la construcción de la biblioteca. Esto ha sido

reportado por Handman y col. cuando se intentó purificar el inserto de sus clonas positivas de una biblioteca de cDNA de *Leishmania*, utilizando la enzima EcoRI. Además se observó que la secuencia de esos insertos que codificaban para epitopos de GPs contenían sitios internos de EcoRI, lo que originaba fragmentos de 700 y 300pb (Dinman y Scott, 1990; Rodríguez-Pérez y col., 1992; Handman y col., 1993). Por otro lado, en otra biblioteca de cDNA de *T. solium* tampoco fue posible extraer los insertos (E. García-Zepeda, comunicación personal), sugiriendo que esta metodología puede conllevar importantes problemas técnicos.

Al realizar la PCR con los iniciadores comerciales específicos para λ gt11 Gibco BRL, se obtuvieron bandas desde 90pb, este tamaño indica que no hay inserto, pues corresponde a la banda obtenida en la clona negativa, que aunque no tiene inserto, los sitios de unión de los iniciadores en el molde se encuentran separados originando una banda de 87pb aproximadamente durante la amplificación (Maizels y col., 1991). El inserto de 190pb se observó en las clonas 4, 9, 12 y 13, mientras que el de 360pb se presentó en las clonas 4 y 7. El hecho de que se presenten varios insertos en una sola clona sugiere que existen sitios internos de reconocimiento para EcoRI, ya que los iniciadores contienen esta secuencia, por lo que se esperaría un reconocimiento de esta secuencia y su amplificación, o bien, que hubieran dos poblaciones de fagos diferentes, con insertos diferentes. Tomando en cuenta que la banda obtenida en la clona negativa es de 90p, entonces el tamaño original del inserto de la banda de 360pb en las clonas 1, 4 y 7, sería de 270pb. Este inserto estaría codificando para un péptido de 9.9 kDa y si comparamos el peso molecular del péptido obtenido en varias clonas después de la purificación de las proteínas de fusión, éste es de 65 kDa, dato que no correlaciona con lo esperado. Sin embargo, no se puede predecir el tamaño del péptido de *T. solium*, porque no se conoce el tamaño del fragmento de β -gal al que está unido.

La presencia de los insertos de 190 y 360pb en las clonas 4, 5 y 7 confirman el hecho de que se traten de clonas derivadas de la misma clona positiva a partir del segundo tamizado, por lo que el patrón de bandeo durante la IET es muy similar. En la clona 5 solo se obtuvo un inserto de 90pb que estaría indicando que no existe inserto. Sin embargo, al utilizar los iniciadores sintetizados en la UNAM, se obtienen tres insertos de 190, 600 y 1000pb, probablemente esta clona también tiene sitios internos para EcoRI y probablemente las condiciones utilizadas para realizar la PCR con los iniciadores de Gibco no fueron óptimas para amplificar estos insertos, sin embargo, con los iniciadores de la UNAM sí fue posible. Como los insertos de 190pb siempre se perdían durante la purificación por ser pequeños, el inserto de 600pb de la clona 5 fue el que mejor se purificó, por lo que se decidió secuenciarlo, además de utilizarlo como sonda para realizar el tamizado de la biblioteca de *T. solium* construida en λ gt10 y para el Southern blot. Cuando se realizó el tamizado de la biblioteca para obtener clonas que tuvieran un inserto más grande, no se obtuvieron clonas positivas que hibridaran con este inserto. Estos resultados y los obtenidos en el Southern blot, en donde no se observó ninguna señal que indicara que dentro del genoma total de *T. solium* se encontraba este inserto, sugieren que el inserto purificado podría ser una amplificación del DNA del fago, ya que

las secuencias reconocidas por BamHI y HindIII, localizadas en el iniciador 3' sintetizado en la UNAM, se encuentran muy cercanas en el genoma del fago, por lo que se esperaría una amplificación de un inserto del él. Entonces el inserto de 190pb podría contener la secuencia de DNA de *Taenia solium*, sin embargo, dado el pequeño tamaño de este inserto no fue posible purificarlo.

A pesar de que no hubo reconocimiento de la sonda con el DNA total en el Southern blot, en el testigo positivo que es el mismo inserto purificado, se observan tres bandas, una menor a los 600pb, otra de 600pb y una más de 1000pb. A pesar de que para este ensayo se purificó la banda de 600pb cortándola del gel de agarosa, y por lo tanto no debería estar contaminada con ninguna otra, aparecen tres bandas lo que sugiere que el inserto podría estar agregado y como la electroforesis se realizó en un gel de agarosa largo, éste le permitió separarse completamente demostrando que había tres bandas.

La secuencia se realizó por el método de Circumvent, en el que se utiliza la PCR. Sólo se obtuvo una secuencia parcial de nucleótidos debido a que se presentaron numerosas dobles estructuras que impedían leer correctamente la secuencia. A pesar de que se utilizaron condiciones desnaturizantes en el gel, no fue posible evitar la formación de estas estructuras. Probablemente, como se realizó la PCR, no sólo se amplificó el inserto de 600pb, sino también los de 190 y 1000pb, por lo que se presentaron las dobles estructuras, pues como se observó en el Southern blot, aparecen tres bandas en el inserto que hibridan con el mismo inserto purificado y marcado radioactivamente.

En este trabajo se muestran los esfuerzos iniciales dirigidos a clonar secuencias codificadoras de GPs del cisticerco de *T. solium*. Las clonas obtenidas y expresadas en *E. coli* parecen mantener su reactividad como antígenos, ya que fueron reconocidas por anticuerpos presentes en los sueros y LCR de enfermos con neurocisticercosis. Sin embargo, por haber empleado un inserto que probablemente sólo era DNA del fago, no se encontró una correlación entre los datos obtenidos con las IET y los de la PCR, Southern blot y secuenciación. Por lo que se sugiere para un trabajo posterior, caracterizar y subclonar los insertos de 360pb y de 190pb para poder afirmar ó negar en definitiva la clonación de la GP42. Por último, es importante señalar que la tecnología del DNA recombinante es una herramienta muy útil en el campo de la parasitología ya que con ella es posible obtener proteínas recombinantes con actividad inmunológica.

FALTA PAGINA

No. 77 a la 82

BIBLIOGRAFIA

- ABOU-ZEID, C., FILLEY, B., STEELE, J. and ROOK, G. (1987). A simple new method for using antigens separated by polyacrylamide gel electrophoresis to stimulate lymphocytes *in vitro* after converting bands cut from western blots into antigen-bearing particles. *J. Immun. Meth.* 98, 5-10.
- ACHA, P. y SZIFRES, B. (1986). Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. 2a. edición. Organización Panamericana de la Salud. Washington D.C. *Publ. Cient.* 503.
- ADAM, R. D., AGGARWAL, A., LAL, A., DE LA CRUZ, V., McCUTCHAN, T. and NASH, T. (1988). antigenic variation of a cystein-rich protein in *Gardia lamblia*. *J. EXP. MED.* 167, 109-113.
- AFFRANCHINO, J., IBAÑEZ, D., LUQUETTI, A., RASSI, A., REYES, M., MACINA, R., ASLUND, L., PETTERSON, U. and FRASCH, A. (1989). Identification of a *Trypanosoma cruzi* antigen that is shed during the acute phase of Chagas' disease. *MOL. BIOCH. PARASITOL.* 34, 221-228.
- AGGARWAL, A. and NASH, T.E. (1987). Characterization of a 33 kDa structural protein of *Gardia lamblia* and localization to the ventral disc. *UNFECTED. IMMUN.* 57, 1305.
- ALARCON, F., ESCALANTE, C., DUEÑAS, G., MONTALVO, M. and ROMAN, M. (1989). Neurocysticercosis: short course of treatment with albendazole. *Arch. Neurol.* 42, 1231-1236
- ALARCON DE NOYA, B., BERRO, O. J., COLTORTI, E., FLISSER, A., STRAUSS, W. y VAZ, A. (1989) Informe de la reunión técnica sobre normatización y estrategias para la implementación del inmunodiagnóstico de la cisticercosis humana. *Rev. Inst. Med. Tropical Sao Paulo* 31: 291-293.
- ALBORES, S. y ALTAMIRANO, M.(1971). Algunas consideraciones sobre 9412 autopsias realizadas en el Hospital General de México. *Rev Inst. Salud Publ.* 31, 1.
- ALMEIDA, E., KRIEGER, M., CARVALHO, M., OELEMANN, W. and GOLDENBERG, S. (1990). Use of recombinant antigens for the diagnosis of Chagas' disease and blood bank screening. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 85, 513-517.
- ALONSO, M. R. (1987). Aislamiento y caracterización del material genético de *Gardia lamblia*. Clonación y expresión de genes que codifican antígenos que participan en la relación hospedero-parásito. Tesis Doctoral. CINVESTAV, Instituto Politécnico Nacional. México. 101pp
- ALUJA, A., ESCOBAR, A., ESCOBEDO, F., FLISSER, A., LACLETTE, J. P., LARRALDE, C., MADRAZO, I., VELAZQUEZ, V. y WILLMS, K. (1987). Cisticercosis: Una recopilación actualizada de los conocimientos básicos para el manejo y control de la cisticercosis causada por *Taenia solium*. Biblioteca de la Salud. Ins. Nal. Salud Publ. Fondo de Cultura Económica. México, D. F.
- ANDREWS, P. (1985). Praziquantel: mechanisms of antischistosomal activity. *Pharmacol. Therapeut.* 29, 129-156.

- APPEL, H., ALPERS, D. and TOMKINS, G. (1965). Multiple molecular forms of β -galactosidase. *J. Mol. Biol.* 11, 12-22.
- AUSUBEL, F. M., BRENT, R., KINGSTON, R., MOORE, D., SEIDMAN, J., SMITH, J. and STRUHL, K. (1987). Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley and Sons, New York, Section 6.7.
- BAKER, D. A., HOLBERTON, D. and MARSHALL, J. (1988). Sequence of a giardin subunit cDNA from *Gardia lamblia*. *Nucl. Acids. Res.* 16, 717-720.
- BALLOUL, J., SONDERMEYER, P., DREYER, D., CAPRON, M., GRZYCH, J., PIERCE, R., CARVALLO, D., LECOCO, J. and CAPRON, A. (1987). Molecular cloning of a protective antigen of schistosomes. *Nature.* 326, 149-153.
- BERMAN, J. D., BEAVER, P. C., CHEEVER, A. W. and QUINDLEN, E. A. (1981). Cysticercus of the 60-milliliter volumen in human brain. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 30, 616-619.
- BORNSTEIN, P. and SAGE, H. (1980). Structurally distinct collagen types. *Annu. Rev. Genet.* 9, 305-353.
- BOWTELL, D., SAINT, R., RICARD, M. and MITCHELL, G. (1984) Expression of *Taenia taeniaeformis* antigens in *Escherichia coli*. *Mol. Bioch. Parasitol.* 13:173-185.
- BRADLEY, J., TRENHOLME, K., GUILLERSPIE, J., GUDERIAN, R., TITANJI, V., HONG, Y. and McREYNOLDS, L. (1993). A sensitive serodiagnostic test for onchocerciasis using a cocktail of recombinant antigens. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 48(2): 198-204.
- BRICEÑO, C., BIAGI, F. y MARTINEZ, B. (1961). Cisticercosis: observaciones en 97 casos de autopsia. *Prensa Med. Mex.* 26: 193.
- CAPRON, A., BALLOUL, J., GREZEL, D., GRZYCH, J., WOLOWCZUK, I., AURIALT, C., BOULANGER, D., CAPRON, M. and PIERCE, R. (1990). Progress toward vaccine against schistosomiasis. En: Molecular aspects of immune response and infectious disease. H. Kiyono, E. Jirillo and C. DeSimone (Eds). Vol.21, pp183-191, Raven Press. New York.
- CARDENAS, F., QUIROZ, H., MEZA, A., PLANCARTE, A., DALMA, A. y FLISSER, A. (1989). Cisticercosis intraocular. En: Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives. Flisser, A., Willms, K., Laclette, J. P., Larralde, C., Ridaura, C. y Beltran, F. (Eds). Academic Press. N.Y. pp 69-75.
- CARMENES, R., FREIGE, J., MOLINA, M. and MARTIN, J. (1989). Predict, A program for protein structure prediction. *Biochem. and Biophysical Research Communications.* 159(2), 687.
- CHANDRASHEKAR, R., CURTIS, K., RAMZY, R., LIFTIS, F., LI, B. and WEIL, G. (1994). Molecular cloning of *Brugia malayi* antigens for diagnosis of lymphatic filariasis. *Mol. Bioch. Parasitol.* 64. 261-271.
- COHEN, S., CHANG, A., BOYER, H. and HELLING, R. (1973). Construction of biologically funtional bacterial plasmid *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 70(11): 3240-3244.
- COLLEY, D. G., and COLLEY, M. (1989). Protective immunity and vaccines to schistosomiasis. *Parasitol. Today.* 5, 350-354.

- COPPEL, R. L., SMITH, F. and PETERSEN, C. (1993). Antibody Screening of Expression Libraries. En: Protocols in Molecular Parasitology. Hyde, J. (Ed). Humana Press. New Jersey. pp 277-296.
- CORAL, V. R. (1990). Identificación y caracterización de clonas de una biblioteca de expresión que codifican para antígenos de superficie de *Giardia lamblia* relevantes en la relación hospedero-parásito. Tesis de Maestría. CINVESTAV, Instituto Politécnico Nacional. México. 101pp
- CORREA, D., MORALES, Z., MEDINA, Y., GARCIA, C., MEDINA, E., MANDUJANO, M., ORTIZ, D. y MEZA, A. (1991). Teniasis y cisticercosis por *Taenia solium*. Una revisión de viejos y nuevos descubrimientos.
- COUGLE, W., LIGHTOWELERS, M., BOGH, H., RICKARD, D. and JOHNSON, K. (1991). Molecular cloning of *Taenia taeniaeformis* oncosphere antigen genes. *Mol. Bioch. Parasitol.* 45, 137-146.
- CRAVEN, G., STEERS, E. Jr. and ANFINSEN, B. (1965). Purification, composition, and molecular weight of the β -galactosidase of *Escherichia coli* K12. *J. Mol. Chem.* 240. 2468-2473.
- CHENG, C. T. (1978). Parasitología General. Editorial Delta A. C. España.
- DIAZ, J. F., VERASTEGUI, M., GILMAN, R., TSANG, V. C., PILCHER, J. B., GALLO, C., GARCIA, H. H., TORRES, P., MONTENEGRO, T. and MIRANDA, E. (1992). Immunodiagnosis of human cysticercosis (*Taenia solium*): a fiel comparison of an antibody-enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and antigen-ELISA, and an enzyme-linked immunoelectrotransfer blot (EITB) assay in Peru. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 46, 610-613.
- DINMAN, J. and SCOTT, A. (1990). *Onchocerca volvulus*: Molecular cloning, primary structure, and expression of a microfilarial surface-associated antigen. *Exp. Parasitol.* 71, 176-188.
- DIXON, A. and LIPSCOMB, F. (1961). Cysticercosis: an analysis and fellowup of 450 cases. Privi Council. *Med. Res. Special Rep. Ser.* 229, 1-58
- EFSTRATIADIS, F., KAFATOS, C., MAXAM, A. and MANIATIS, T. (1976). Ensymatic *in vitro* syntesis of globin genes. *Cell.* 7: 279-288.
- EHLERS, U. (1985). Das phylogenetics system der platyhelminthes. Gustav Fisher Verlag, Stuttgart, New York.
- EHLERS, U. (1986). Comments on a phylogenetics system of Platyhelminthes. *Hydrobiologia.* 132, 1-12.
- ELLIOTT, J. F., ALBRECHT, G. R., GILLADOGA, A., HANDUNNETTI, S. M., NEEUAYE, J, LALLINGER, G., MINJAS, J. and HOWARD, R. (1990). Genes for *Plasmodium falciparum* surface antigens cloned by expression in COS cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87, 6363-6367.
- ESCHENBACHER, K., KLEIN, H., SOMMER, I., MEYER, H., ENTZEROTH, R., MEHLHORN, H. and RUGER, W. (1993). Characterization of cDNA clones encoding a major microneme antigen of *Sarcocystis muris* (Apicomplexa) cyst merozoites. *Mol. Bioch. Parasitol.* 62:27-36.

- ESCOBAR, A. (1983). The pathology of neurocysticercosis. En: Cysticercosis of the central nervous system. Palacios, E., Rodríguez-Carbajal, J. Taveras, J. (Eds). Thomas, Springfield, Illinois; pp 27-54.
- ESCOBEDO, F., GONZALEZ-MARISCAL, G., REVUELTAS, R. and RUBEN, M. (1982). Surgical treatment of cerebral cysticercosis. En: Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives. Flisser, A., Willms, K., Lacleste, J. P., Larralde, C., Ridaura, C. y Beltrán, F. (Eds). Academic Press. N.Y. pp 201-205.
- ESCOBEDO, F., PENAGOS, P., RODRIGUEZ, J. and SOTELO, J. (1987). Albendazol therapy for neurocysticercosis. *Arch. Intern. Med.* 147, 738-741.
- ESCOBEDO, F. (1989). Tratamiento de cisticercosis/teniasis humana. En: Cisticercosis humana y porcina. Su conocimiento e investigación en México. Flisser, A. y Malagón, F. (Eds). Limusa-Noriega. México. pp 199-204.
- ESPIÑOZA, B., RUIZ-PALACIOS, G., TOVAR, A., SANDOVAL, M., PLANCARTE, A. and FLISSER, A. (1986). Characterization by enzyme linked immunosorbent assay of the humoral immune response in immunodiagnosis. *J. Clin. Microbiol.* 24: 536-541.
- FEINBERG, A., and VOGELSTEIN, B. (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragment to high specific activity *Anal. Biochem.* 132, 6-13.
- FEINBERG, A., and VOGELSTEIN, B. (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragment to high specific activity *Anal. Biochem.* 137, 226-267.
- 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 diagnosis of neurocysticercosis. *Trans. Royal. Soc. Trop. Med. Hyg.* 84: 559-562.
- FLISSER, A., TERRAB, B., WILLMS, K. y LARRALDE, C. (1975). Inmunolectroforesis y doble inmunodifusión en el diagnóstico de la cisticercosis cerebral humana. *Arch. Invest. Med. México.* 6:1-12.
- FLISSER, A., PEREZ-MONFORT, R. and LARRALDE, C. (1979) The immunology of human and animal cysticercosis: A review. *Bull WHO* 57: 839-856.
- FLISSER, A., WOODHOUSE, E. and LARRALDE, C. (1980). Human Cysticercosis: antigens, antibodies and no-responders. *Clin. Exp. Immunol.* 39, 27-37.
- FLISSER, A., and LARRALDE, C. (1986). Cysticercosis, En: Immunodiagnosis of Parasitic Diseases. Walls, K. W. and Schantz, P. (Eds). Vol.I: Helminthic diseases. Academic Press, New York, pp 109-161.
- FLISSER, A. (1988). Neurocysticercosis in Mexico. *Parasitol. Today.* 4: 131-137.
- FLISSER, A., PLANCARTE, A. and CORREA, D. (1991). *Taenia solium* cysticercosis: a review. *Res. Rev. Parasitol.* 51(1-4), 17-23.
- FLISSER, A. (1994). Taeniasis and Cysticercosis due to *Taenia solium*. En: Progress in Clinical Parasitology. Tsieh Sun, M. D. (Ed). CRC Press, Inc. New York. Vol 4. pp.77-116.

- FRANCIS, P. and BICKLE, Q. (1992). Cloning of a 21.7-kDa vaccine-dominant antigen gene of *Schistosoma mansoni* reveals an EF hand-like motif. *Mol. Bioch. Parasitol.* 50, 215-224.
- FROHBERG, H. (1989). The toxicological profile of praziquantel in comparison to others antihelminthic drugs. *Acta Leidensia.* 57, 201-215.
- GEMMELL, M., MATYAS, Z., PAWLOWSKI, Z. and SOULSBY, E. (1983). Guidelines for surveillance, prevention and control of Taeniasis/cysticercosis. WHO publication VPH/83.49. Switzerland.
- GOFF, S. and GOLBERG, A. (1985). Production of abnormal proteins in *E. coli* stimulates transcription of *lon* and other heat shock genes. *Cell.* 41: 587-595.
- GOLDBER, A. and ST. JOHN, A. (1976). Intracellular protein degradation in mammalian and bacterial cells: Part 2. *Annu. Rev. Biochem.* 45, 747-798.
- GONZALEZ-BARRANCO, D., VILLANUEVA, G., SANDOVAL, M., TRUJILLO, V., PEREZ, O., PASCOE, D., ESTAÑOL, B., LANDA, L. (1989). Inmunodiagnóstico de la cisticercosis humana por IFI, HAI y ELISA. En: Cisticercosis humana y porcina. Su conocimiento e investigación en México. Flisser, A. y Malagón, F. (Eds). Limusa-Noriega. México, pp 169-174.
- HANDMAN, E., BARNETTE, L., OSBORN, A., GODING, J. and MURRAY, P. (1993). Identification, characterization and genomic cloning of a O-linked N-acetyl glucosamine containing cytoplasmic *Leishmania* glycoprotein. *Mol. Bioch. Parasitol.* 62: 61-72.
- HARRIS, T. J. R. (1983). Expression of eucariotic genes in *E. coli*. En: Genetic Engineering. Williamson, R. (Ed). Academic Press, London, U. K. Vol. 4, pp 127-183.
- HEMMINGS, L. and McMANUS, D. P. (1989). The isolation, by differential antibody screening, of *Echinococcus multilocularis* antigens clones with potential for immunodiagnosis. *Mol. Bioch. Parasitol* 217:129-135.
- HEMMINGS, L. and McManus, D. P. (1991). The diagnostic molecular characterization of an *Echinococcus multilocularis* antigen clone. *Mol. Bioch. Parasitol.* 44, 53.
- HILLYER, G. (1979). *Schistosoma mansoni*: Reduced worm burdens in mice immunized with isolated *Fasciola hepatica* antigens. *Exp. Parasitol.* 48, 287-295.
- HILLYER, G., SOLER DE GALANES, M. and BATTISTI, G. (1992). *Fasciola hepatica*: host responders and nonresponders to parasite glutathione S-transferase. *Exp. Parasitol.* 75:176-186.
- HYDE, E. J. (1993). Protocols in Molecular Parasitology. Humana Press. New Jersey. Vol. 21. 470 pp.
- HYON S., PILCHER, J. and TSANG, V. (1993). Further characterization of *Taenia solium* (cysticercosis) glycoprotein antigen. [Abstract]. *Bull. Join Ann. Met. Am. Soc. Trop. Med. Hyg.* 346.
- HUYNH, T., YOUNG, R. and DAVIS, R. (1985). Constructing and screening cDNA libraries in λ gt10 y λ gt11. En: DNA cloning: A practical Approach. Glover, D. M. (Ed). IRL Press, Oxford. Vol. 1 pp 49-78.

- IBAÑEZ, C., AFFRANCHINO, L. and FRASCH, A. (1987). Antigens determinants of *Trypanosoma cruzi* defined by cloning of parasite DNA. *Mol. Bioch. Parasitol* 25, 175-184.
- ITO, A., BOGH, H., LIGHTOWLERS, M., MITCHELL, G., TAKAMI, T., KAMIYA, M., ONITAKE, K. and RICKARD, M. (1991). Vaccination against *Taenia taeniaeformis* infection in rats using a recombinant protein and preliminary analysis of the induced antibody response. *Mol. Bioch. Parasitol.* 44, 43-48.
- JACKSON, P. and TJIAN, R. (1988). O-glycosylation of eukariotic transcription factors: Implication for mechanisms of transcriptional regulation. *Cell.* 55, 125-133.
- JAMES, S. L. and SHER, A. (1990). Cell-mediated immune response to schistosomiasis. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 155, 21-31.
- JENDRISAK, J., YOUNG, R. and EGEL, J. (1987). Cloning cDNA into λ gt11 and λ gt10. *Methods. Enzymol.* 152, 359.
- JOHNSON, A., HARRISON, G. B., LIGHTOWLERS, M., O'HOY, K., COUGLE, W., DEMPSTER, R., LAWRENCE, S., VINTON, J., HEATH, D. and RICKARD, M. (1989). Vaccination against ovine cysticercosis using a defined recombinant antigen. *NATURE.* 338, 585-593.
- JUNG, R. C., RODRIGUEZ, M. A., BEAVER, P. C., SCHENTHAL, J. E. and LEVY, R. W. (1981). Racemose cysticercus in human brain. A case report. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 30, 620-624.
- KEMP, D., COPPEL, R., COWMAN, A., SAINT, R., BROWN, G. and ANDERSON, R. (1983). Expression of *Plasmodium falciparum* blood-stage antigen in *Escherichia coli*: detection with antibodies from immune humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 80, 3787/3791.
- KEMP, D., COPPEL, R. and ANDERSON, R. (1987). Repetitive protein and genes of malaria. *Annu. Rev. Microbiol.* 41, 181-208.
- KLINKERT, M., RUPPEL, A. and BECK, E. (1987). Cloning of diagnostic 31/32 kilodalton antigens of *Schistosoma mansoni*. *Mol. Bioch. Parasitol.* 25, 247-255.
- KNOBLOCH, J., SCHREIBER, M., GROKHOVSKY, S. and SCHERF, A. (1987). Specific and nonspecific immunodiagnostic properties of recombinant and synthetic *Plasmodium falciparum* antigens. *Eur. J. Microbiol.* 6, 547-551.
- KRIEGER, M., ALMEIDA, E., ORLEMAN, W., LAFAILLE, J., BORGES, J., KRIEGER, H., CAIVALHO, M and GOLDENBERG, S. (1992). Use of recombinant antigens for the accurate immunodiagnosis of Chaga's disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 46(4) 427-434.
- LACLETTE, J. P., ORNELAS, Y., MERCHANT, M. T. and WILLMS, K. (1982). Ultrastructure of surrounding envelopes of *Taenia solium* eggs. En: Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives. Flisser, A., Willms, K., Laclette, J. P., Larraalde, C., Ridaura, C. y Beltrán, F. (Eds). Academic Press. N.Y. pp 375-388.

- LACLETTE, J. P., SHOMAKER, C., RITCHER, D., ARCOS, L., PANTE, N., COHEN, C., BING, D. and WELLER, N. (1992). Paromyosin inhibits complement C1. *J. Immunol.* 148, 124-127.
- LANDA, A. (1992). *Taenia solium*: Clonación, caracterización y expresión del gen para el antígeno B. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. México. 61pp.
- LAURENT, F., BOUDIEU, C., KAGA, M., CHILMONCZYK, S., ZGRZEBSKI, G., YVORE, P. and PIERR, P. (1993). Cloning and characterization of an *Eimeria acervulina* sporozoite gene homologous to aspartyl proteinases. *Mol. Bioch. Parasitol* 62, 303-312.
- LEOPOLD, G., UNGETHUM, W., GROLL, E., DICKMANN, H. NOWAK, H. and WEGNER, D. (1978). Clinical pharmacology in normal volunteers of parziquantel, a new drug against schistosomes and cestodes. An example of a complex study covering both tolerance and pharmacokinetics. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 14, 281-291.
- LEVIN, M., MESRI, E., BENAROUS, R., LEVITUS, G., SCHIJMAN, A., LEVY-YEYATI, P., CHIALE, P., RUIZ, A., KAHN, A., ROSENBAUM, M., TORRES, H. and SEGURA, E. (1989). Identification of major *Trypanosoma cruzi* antigenic determinants in chronic Chagas' disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 41, 530-538.
- LOBOS, E., ALTMANN, M., MENGOD, G., WEISSE, N., RUDIN, W. and KARMAN, M. (1990). Identification of an *Onchocerca volvulus* cDNA encoding a low molecular weight antigen uniquely recognized by onchocerciasis patient sera. *Mol. Bioch. Parasitol.* 39: 135-146.
- LOBOS, E., WEISS, N., KARAM, M., TAYLOR, R., OTEESEN, E. and NUTMAN, T. (1991). An immunogenic *Onchocerca volvulus* antigen: a specific and early marker of infection. *Science.* 251, 1603-1605.
- LUMSDEN, R. D., VOGEL, M. and SOGANDERES-BERNAL, F. (1982). The metacystode tegument: fine structure, development, topochemistry, and interaction with the host. En: Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives. Flisser, A., Willms, K., Laclette, J. P., Larralde, C., Ridaura, C. y Beltrán, F. (Eds). Academic Press. N.Y. pp 307-362.
- LUSTIGMAN, S., BROTMAN, B., JOHNSON, E., SMITH, A., HUIMA, T. and PRINCE, A. (1992). Identification and characterization of an *Onchocerca volvulus* cDNA clone encoding a microfilarial surface associated antigen. *Mol. Bioch. Parasitol.* 50, 79-94.
- MADRAZO, I. and FLISSER, A. (1992). Parasitic infestations of the cerebrum, Cysticercosis. En: Brain Surgery. Complication avoidance and management. Apuzzo, J.M.L., (Ed). Churchill Livingstone, New York. 1419-1430.
- MAHAJAN, R. C. (1982). Geographical distribution of human cysticercosis. En: Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives. Flisser, A., Willms, K., Laclette, J. P., Larralde, C., Ridaura, C. y Beltrán, F. (Eds). Academic Press. N.Y. pp 39- 46.

- MAIZELS, R. M., BLAXTER, M. L., ROBERTSON, B. and SELKIRK, M. (1991). Parasitic Antigens, Parasite Genes. A laboratory Manual for Molecular Parasitology. Cambridge University Press. Cambridge. 224pp.
- MANIATIS, T., FRITSCH, E.F. and SAMBROOK, J. (1989). Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. N.Y. 545 pp.
- MARRINER, S. E., MORRIS, D., DICKSON, B. and BOGAN, J. A. (1986). Pharmacokinetics of albendazol in man. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 30, 705-708.
- MARTUSCELLI, A. (1975). La cisticercosis. *Bol. Med. IMSS* 17:149.
- MAZZOTTI, L. (1944). Datos sobre las cisticercosis en México. *Revista del Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales*. México. 5: 283.
- McMANUS, D.P., GARCIA-ZEPEDA, E., REID, A., RISHI, A. K., and FLISSER, A. (1990). Human cysticercosis and taeniasis; molecular approaches for specific diagnosis and parasite identification. *Acta Leidensia*. 57(2): 81-92.
- MIERENDORF, R., PERCY, C. and YOUNG, R. (1987). Gene isolation by screening λ gt11 libraries with antibodies. *Meth. Enzymol.* 152, 458-469.
- MILLER, B., GRINELL, V., GOLDBERG, M. and HEINER, D. (1983). Spontaneous radiographic disappearance of cerebral cysticercosis: three cases. *Neurology*. 33, 1377-1379.
- MOSES, A. (1911). Dos métodos de diagnóstico nas cisticercozes. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 3, 322-326.
- MURO, A., RODRIGUEZ-MEDINA, R. and HILLYER, G. (1993). Sequence analysis of *Fasciola hepatica* glutathione S-transferase cDNA clone. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 48(3): 457-463.
- NIETO, D. (1956). Cysticercosis of nervous system. Diagnosis by means of spinal fluid complement fixation test. *Neurology* 6: 725-738.
- OLIVO, A., PLANCARTE, A. and FLISSER, A. (1988). Presence of antigen B from *Taenia solium* cysticercus in other platyhelminthes. *Int. J. Parasit.* 18, 543-545.
- PENE, P., MOJON, M., GARIN, J., COULAUD, J. and ROSIGNOL, J. (1982). Albendazol: a new broad spectrum antihelminthic. Double-blind multicenter clinical trial. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 31, 253-266.
- PEREZ-TAMAYO, R. y FLORES, F. (1958). Datos generales de 2202 autopsias. *Prensa Med. Mex.* 24: 117.
- PEARSON, R. D. and GUERRANT, R. L. (1983). Praziquantel: a major advance in antihelminthic therapy. *Ann. Intern. Med.* 99, 195-198
- PLANCARTE, A., FEXAS, M. and FLISSER, A. (1994). Reactivity in ELISA and Dot blot of purified GP24, an immunodominant antigens of *Taenia solium*, for the diagnosis of human neurocysticercosis. *Int. J. Parasitol.* 24, 733-738.
- PTASHNE, M. (1986). A Genetic Switch Gene Control and Phage Lambda. Cell Press & Blackwell Scientific Publications. Oxford. 119 pp.
- PUIG-SOLANES, M. (1974). Consideraciones clinicopatológicas acerca de la cisticercosis intraocular cisticercosis viable y cisticerco en involución. *Arch. Soc. Española Oftalmol.* 34, 341-364.
- RABIELA, M. T., LOMBARDO, L. y FLORES BARROETA, F. (1972). Cisticercosis cerebral: analisis de 68 casos de autopsia. *Patología*. 10: 27.

- RABIELA, M. T., RIVAS, A. y RODRIGUEZ, I. J. (1979). Consideraciones anatomopatológicas de la cisticercosis cerebral como causa de muerte. *Patología (Mex)*. 10, 27-40.
- RABIELA, M. T., RIVAS, A., CASTILLO, S. and CANCINO, F. (1982). Anatomopathological aspects of human brain cysticercosis. En: Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives. Flisser, A., Willms, K., Laclette, J. P., Larralde, C., Ridaura, C. y Beltrán, F. (Eds). Academic Press. N.Y. pp 179-200.
- RABIELA, M. T., RIVAS, A., CASTILLO, S. González-Angulo, A. (1985). Pruebas morfológicas de que *C. cellulosa* y *C. racemosus* son larvas de *T. solium*, *Arch. Invest. Med. (Mex)*. 16, 83-86.
- RABIELA, M. T., RIVAS, A. and FLISSER, A. (1989) Morphological types of *Taenia solium* cysticerci. *Parasitol. Today* 5, 357-359.
- RAMIREZ-BON, E., MERCHANT, M. T., GONZALEZ-DEL PLIEGO, M. and CAÑEDO, L. (1982). Neural and escretory structures of *Cysticercus cellulosa*. En: Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives. Flisser, A., Willms, K., Laclette, J. P., Larralde, C., Ridaura, C. y Beltrán, F. (Eds). Academic Press. N.Y. pp 261-280.
- RIGBY, P. W., DIECKMANN, M., RHODES, C. and BERG, P. (1977). Labeling deoxyribonucleic acid to high specificity *in vitro* by nick translation with DNA polymerase. *J. Mol. Biol.* 113. 237-251.
- RODRIGUEZ-CARBAJAL, J., BOLEAGA-DURAN, B., and DORFSMAN, J. (1989). El diagnóstico de la cisticercosis humana por tomografía computada En: Cisticercosis humana y porcina: su conocimiento e investigación en México. Flisser, A. y Malagón, F. (Eds). Limusa-Noriega. México. 77-86.
- RODRIGUEZ-PEREZ, J., RODRIGUEZ-MEDINA, J., GARCIA-BLANCO, M. and HILLYER, G. (1992). *Fasciola hepatica*: Molecular cloning, nucleotid sequence, and expression of a gene encoding a polypeptide homologous to a *Schistosoma mansoni* fatty acid-binding protein. *Exp. Parasitol.* 74, 400-407.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F. and MANIATIS, T. (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.
- SANGER, F., NICKLEN, S. and COULSON, A. (1977). DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 74, 5463.
- SARTI, E. (1989). Epidemiología de la teniasis-cisticercosis. En: Cisticercosis humana y porcina. Su conocimiento e investigación en México. Flisser, A. y Malagón, F. (Eds). Limusa. México. pp 233-242.
- SCHENONE, H., VILLARROEL, F., ROJAS, A. and RAMIRES, R. (1982). Epidemiology of Human Cysticercosis in Latin America. En: Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives. Flisser, A., Willms, K., Laclette, J. P., Larralde, C., Ridaura, C. y Beltrán, F. (Eds). Academic Press. N.Y. pp 25-38.
- SCHERF, A., MATTEI, D. and SCHREIBER, M. (1990) Parasite antigen expressed in *E. coli*. *J. Immunol. Method.* 128: 81-87.

- SCHNIDER, T. (1992). Use of recombinant *Dictyocaulus viviparus* antigen in an enzyme-linked immunosorbent assay for immunodiagnosis of bovine dictyocaulosis. *PARASITOL. RES.* 78, 298-302.
- SEARS, L. E. (1992). Thermal cycle sequencing and alternative DNA sequencing protocols using the highly thermostable Vent_rTM (exo-) DNA polymerase. *BIO. TECHNIQUES.* 13, 623-633.
- SEEBURG, P., SHIN, J MARTIAL, J., BAXTER, J. and GOODMAN, H. (1977). Nucleotide sequence and application in bacteria of structural gene for rat growth hormone. *Nature.* 270: 486-490.
- SEXTON, J. L., MILNER, A., PANACCIO, M., WADDINGTON, J., WIJFELLS, G., CHANDLER, D., THOMPSON, C., WILSON, L., SPITHILL, T., MITCHELL, G. and CAMPBELL, N. (1990). Glutathione S-transferase: Novel vaccine against *Fasciola hepatica* infection in sheep. *J. Immunol.*
- SHORT, J., FERNANDEZ, J., SORGE, J. and HUSE, W. (1988). λ Zap: a bacteriophage λ expression vector with *in vivo* excision properties. *Nucl. Acids. Res.* 16, 7583-7600.
- SILHAVY, T. J. and BECWITH, J. (1985). Uses of lac fusion for the study of biological problems. *Microbiol. Rev.* 49(4), 398-418.
- SILVERMAN, P. (1954). Studies on the biology on some tapeworms of the genus *Taenia*. II. The morphology and development of the taeniid hexacanth embryo and its ecdysis membranes, with some notes on the state of development and propagation of gravid segment. *Ann. Trop. Med. and Parasitol.* 48, 536.
- SMITH, D. B., DAVERN, K., BOARD, P., TIU, W., GARCIA, E. and MITCHELL, G. (1986). Mr 26,000 antigen of *Schistosoma japonicum* recognized by resistant WEHI 129/J mice is a parasite glutathione S-transferase. *PROC. NATL. ACADE. SCI. USA.* 83, 8703-8707.
- SMITH, D. B. and JOHNSON, K. S. (1988). Single step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusion with glutathione S-transferase. *Gene.* 67. 31-40.
- SOTELO, J, ESCOBEDO, F., RODRIGUEZ-CARBAJAL, J., TORRES, B. and RUBIO-DONNADIEU, F.(1984). Therapy of parenchymal brain cysticercosis with praziquantel. *N. Engl. J. Med.* 310, 1001-1007.
- SOTELO, J., TORRES, B., RUBIO-DONNADIEU, F. and ESCOBEDO, F., RODRIGUEZ-CARBAJAL, J. (1985). Praziquantel in the treatment of neurocysticercosis: long-term follow-up. *Neurology.* 35. 752-755.
- SOTELO, J., PENAGOS, P., ESCOBEDO, F. and DEL BRUTO, O. H. (1988). Short course of albendazole therapy for neurocysticercosis. *Arch. Neurol.* 45: 1130-11133.
- SOTELO, J., ESCOBEDO, F. and PENAGOS, P. (1989). Albendazol vs praziquantel for therapy for neurocysticercosis. A controlled trial. *Arch. Neurol.* 46: 1231-1236.
- SOUTHERN, E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98, 503-509.

- SQUIMUX, J. A., and FERNANDEZ, V., (1989) Hayazgos patológicos en la neurocisticercosis. En: Cisticercosis. Aguilar, F., Maselli, R., y Samayoa, A. (Eds). Asociación Guatemalteca de Parasitología y Medicina Tropical, pp 16-25.
- STAHL, H., COPPEL, R., BROWN, G., SAINT, R., LINGELBACH, K., COWMAN, A., ANDERS, R. and KEMP, D. (1984). Differential antibody screening of cloned *Plasmodium falciparum* sequences expressed in *Escherichia coli*: procedure for isolation of definite antigens and analysis of human antisera. *PROC. NATL. ACAD. SCI. USA.* 81, 2456-2460.
- STANLEY S., BECKER, A., KUNZ-JENKINS, C., FOSTER, L. and LI, E. (1990). Cloning and expression of membrane antigen of *Entamoeba histolytica* possessing multiple tandem repeats. *PROC. NATL. ACAD. SCI. USA.* 87, 4876-4880.
- STUDIER, F. E. (1973). Analysis of bacteriophage T7 early RNAs and protein on slab gels. *J. MOL. BIOL.* 79, 237-248.
- TSANG, V., BRAND, J. and BOYER, A. (1989) An enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay and glycoprotein antigens for diagnosing human cysticercosis (*Taenia solium*). *J. Inf. Dis.* 159: 50-59.
- VASCONCELOS, D., CRUZ-SEGURA, H., MATEOS -GOMEZ, H. AND ZENTENO-ALANIS, G. (1987). Selective indication for the use of praziquantel in the treatment of brain cysticercosis. *J. Neurol. Neurosurg. Psych.* 50, 382-388.
- VOGELSTEIN, B. and GILLESPIE, D. (1979). Preparative and analytical purification of DNA from agarosa. *PROC. NATL. ACAD. SCI. USA.* 76, 615-119.
- WILSON, M., BRYAN, R. T., FRIED, J. A., WARE, D. A., SCHANTZ, P. M., PILCHER, J. B. and TSANG, V. C. W. (1991). Clinical evaluation of the cysticercosis enzyme-linked immunoelectrotransfer blot in patients with neurocysticercosis. *J. Infect Dis.* 164, 1007- 1009.
- XIONG, C., GRIEVE, R., KIM, K. BOOTHROYD, J. (1993). Expression of *Toxoplasma gondii* P30 as fusions with glutathione S-transferase in animal cells by Sindbis recombinant virus. *Mol. Bioch. Parasitol.* 61, 143-148.
- YOSHINO, K. (1933a). Studies on the post-embryonal development of *Taenia solium*. II. On the development of cellulosa within the definite intermediate host. *J. Med. Ass. Formosa.* 32:155-158, 1933.
- YOSHINO, K. (1933b). Studies on the post-embryonal development of *Taenia solium*. III. On the development of cellulosa within the definite intermediate host. *J. Med. Ass. Formosa.* 32:166-169, 1933.
- YOUNG, R. A. and DAVIS, R. W. (1983a). Yeast RNA Polymerase II genes: Isolation with antibody probe. *Science* 222: 778-782.
- YOUNG, R. A. and DAVIS, R. W. (1983b). Efficient isolation of genes by using antibody probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 80: 1194-1198.
- ZENTENO-ALANIS, G. (1966). Frecuencia de la cisticercosis en México. *Prensa Med. Mex.* 31: 156.
- ZENTENO-ALANIS, G. (1982). A clasificación of human cysticercosis. En: Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives. Flisser, A., Willms, K., Lacleite, J. P., Larralde, C., Ridaura, C. y Beltrán, F. (Eds). Academic Press. N.Y. pp 107-126.

ZINGALES, B., GRUBER, A., RAMALHO, C., UMEZAWA, E. and COLLI, W. (1990).
Use of two recombinant proteins of *Trypanosoma cruzi* in the serological
diagnosis of Chagas' disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 85, 519-524.