

03062

19  
20

**Universidad Nacional Autónoma de México**

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

**Distribución de epítopes para células T y B en el Antígeno B de  
*Taenia solium***

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

**Lic. en I.B.B. José Vázquez Talavera**

**1996**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

**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 esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

**A pesar de lo poco  
que es y significa mi tesis,  
me atrevo a dedicársela a:**

**Dora y Diana,  
mis dos amores.**

**A mi Madre, Padre y  
mi familia,  
por su paciencia  
y comprensión.**

## Agradecimientos.

Esta tesis fue realizada en el Depto. de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, bajo la dirección del Dr. Juan Pedro Laclette San Román, a quien le agradezco la oportunidad y la formación recibida durante el desempeño del presente trabajo.

Agradezco la revisión de trabajo de tesis por parte del Jurado para examen de Maestría formado por: Dra. Bertha Espinoza Gutiérrez, Dra. Gohar Gevorkian, Dr. Juan Carlos Almagro, Dr. Rafael Saavedra Durán y Dr. Juan Pedro Laclette, quienes amablemente aportaron comentarios y sugerencias para el mejoramiento de la presentación del trabajo.

Agradezco al Dr. Alejandro García Carrancá, al Dr. Edmundo Lamoyi y al Dr. Juan Pedro Laclette por su labor como miembros de mi Comité Tutorial durante la maestría.

Les agradezco a la M. en C. Patricia de la Torre, al Q.F.B. Carlos Castellanos y al M. en C. Alejandro Padilla por el asesoramiento técnico recibido durante la realización del presente trabajo.

Les agradezco a Isabel y Amada por las facilidades brindadas en la impresión de esta tesis.

Agradezco a mis amigos de fuera y dentro del Instituto, quienes con su agradable presencia, compañía y amistad han contribuido a que mi estancia en el laboratorio sea placentera.

## Índice

Abreviaturas.....	2
I. Resumen.....	3
II. Introducción	
1. Biología de <i>T. solium</i> .....	4
2. Importancia socio-económica de la cisticercosis humana.....	6
3. Importancia de la cisticercosis porcina.....	6
4. Inmunología de la cisticercosis .....	6
5. Antecedentes del proyecto .....	11
6. Objetivos del proyecto .....	15
III. Materiales y Métodos	
1. Materiales .....	17
2. Métodos .....	17
IV. Resultados	
1. Expresión de las proteínas recombinantes.....	22
2. Purificación de las proteínas recombinantes.....	23
3. Ensayos de ELISA.....	24
4. Ensayos de proliferación de linfocitos.....	25
5. Ensayos de protección.....	27
V. Discusión .....	28
VI. Apéndice	
A. Vector pRSET .....	34
VII. Bibliografía.....	36

## Abreviaturas

AgB	Antígeno B
$\alpha$ -ratón	anticuerpo anti-IgG, IgD, IgA e IgM de ratón
$\alpha$ -ratón-HPRT	anticuerpo de cabra anti-IgG, IgD, IgG e IgM de ratón unido covalentemente a peroxidasa
$\alpha$ -rTPmy	suero de ratón inmunizado con la proteína recombinante completa VW7-3
$\alpha$ -TPmy	anticuerpos anti-paramiosina
APC	célula presentadora de antígeno
BSA	albúmina sérica bovina
cDNA	cadena complementaria de ácido desoxirribonucleico
Con-A	concanavalina A
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
ELISA	ensayo inmunoenzimático
Fc	región constante de la cadena pesada de las inmunoglobulinas
IPTG	isopropiltio- $\beta$ -D-galactósido
kDa	kilodaltones
LCR	liquido cefalorraquídeo
LPS	lipopolisacáridos
OPD	dihidrocloruro de o-fenilendianina
paramiosina- $\alpha$ -rTPmy	complejos antígeno-anticuerpo formado por paramiosina y anticuerpos anti-paramiosina
PBS	solución salina amortiguadora de fosfatos
PBS-NaCl	PBS con 0.5M de NaCl
PBS-Tween	PBS con 0.3% de Tween 20
PCR	reacción en cadena con polimerasa
PMSF	floruro de fenilmetilsulfonilo
Pmy	paramiosina
rpm	revoluciones por minuto
SDS	lauril sulfato de sodio
SDS-PAGE	electroforesis en gel de poliascrlamida con SDS
TPmy	paramiosina de la <i>T. solium</i> .

## RESUMEN

La paramiosina o antígeno B de la *Taenia solium* (TPmy) es un antígeno inmunodominante en la cisticercosis humana que inhibe la cascada del complemento a través de una interacción con el C1q. Hemos clonado y expresado el gen de esta proteína y mostrado que el producto recombinante mantiene las propiedades de la proteína natural. Asimismo, por técnicas de DNA recombinante se ha mostrado que la unión con el C1q se lleva a cabo a través del extremo amino-terminal de la TPmy. También se ha propuesto a la paramiosina como candidato para vacuna contra infecciones helmínticas.

El objetivo del presente proyecto es el de caracterizar a nivel submolecular las regiones de la TPmy que son reconocidas por el sistema inmune humoral y celular del huésped murino, así como estudiar su utilización como inmunógeno contra la infección por *Taenia crassiceps*. Se amplificaron tres regiones así como la secuencia codificadora total de la TPmy, por medio de PCR usando una clona de cDNA como templado. El producto de PCR VW7-3 codifica para la proteína completa, el producto VW2-1 codifica para el tercio amino-terminal, el producto VW4-1 para el tercio carboxilo-terminal y el VW3-3 para el tercio central. Los fragmentos se subclonaron en el plásmido pRSET y se expresaron en *E. coli*. Los péptidos recombinantes fueron purificados y se utilizaron en la inmunización de ratones, en ensayos de detección de anticuerpos (ELISA) y ensayos de proliferación de linfocitos. Mediante una técnica modificada de ELISA que permite fijar cantidades equimolares de antígeno a la placa se encontró que los sueros reconocieron preferencialmente al tercio VW4-1 y al tercio VW3-3 y que no fue reconocido el tercio VW2-1. Por otro lado se realizaron dos tipos de ensayos de proliferación celular. En los ensayos donde se estimularon células mononucleares de bazo de ratones inmunizados con proteína recombinante completa VW7-3, los resultados sugieren que hay cierta preferencia hacia el tercio carboxilo-terminal VW4-1 a los cinco días de cultivo. Sin embargo, cuando se realizaron los ensayos sólo con linfocitos T suplementados con células adherentes al plástico, hay mayores niveles de proliferación en respuesta al tercio amino-terminal (VW2-1). Finalmente, los ensayos de protección con VW7-3 disminuyeron a un 50% la carga parasitaria. Pensamos que estudios inmunológicos similares, a nivel submolecular, pueden proporcionar conocimientos aplicables en el desarrollo de vacunas.

## II. Introducción.

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

Esta enfermedad es causada por el establecimiento de la forma larvaria, también conocida como cisticercos, de la *T. solium* en los tejidos del hombre y del cerdo. La *T. solium* tiene por huésped definitivo al ser humano y como intermediario al cerdo o al hombre mismo. Por ello, la propagación de la cisticercosis depende de la relación que el hombre establece con el cerdo y los medios de transmisión de huevecillos (por ejem., heces y agua contaminada) y cisticercos (por ejem, carne de cerdo) que existan entre ellos.

### I. Biología de la *T. solium*

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

*Desarrollo en el huésped intermediario:* La primera etapa se inicia con la ingestión de los huevecillos de *T. solium* por el huésped intermediario. Los huevecillos presentan una serie de envolturas protectoras que capacitan al embrión para sobrevivir en el medio ambiente (Laclette *et al.*, 1982). Estas envolturas han sido estudiadas por microscopía de luz o por microscopía electrónica de transmisión y barrido (Fig. 2). La capa más externa, denominada vitelo, está constituida por células que el gusano adulto aporta al sostenimiento del embrión. Debajo del vitelo se encuentra el embrióforo formado por bloques proteicos unidos entre sí por un material cementante. Estos bloques le dan la apariencia estriada al huevecillo y son sintetizados por una capa celular sincicial que se encuentra debajo de las células embrióforales. La siguiente envoltura es la membrana oncosferal, que recubre a la oncosfera o embrión hexacanto que cuenta con un complejo muscular que acciona los tres pares de ganchos (Gemmel *et al.*, 1982).

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

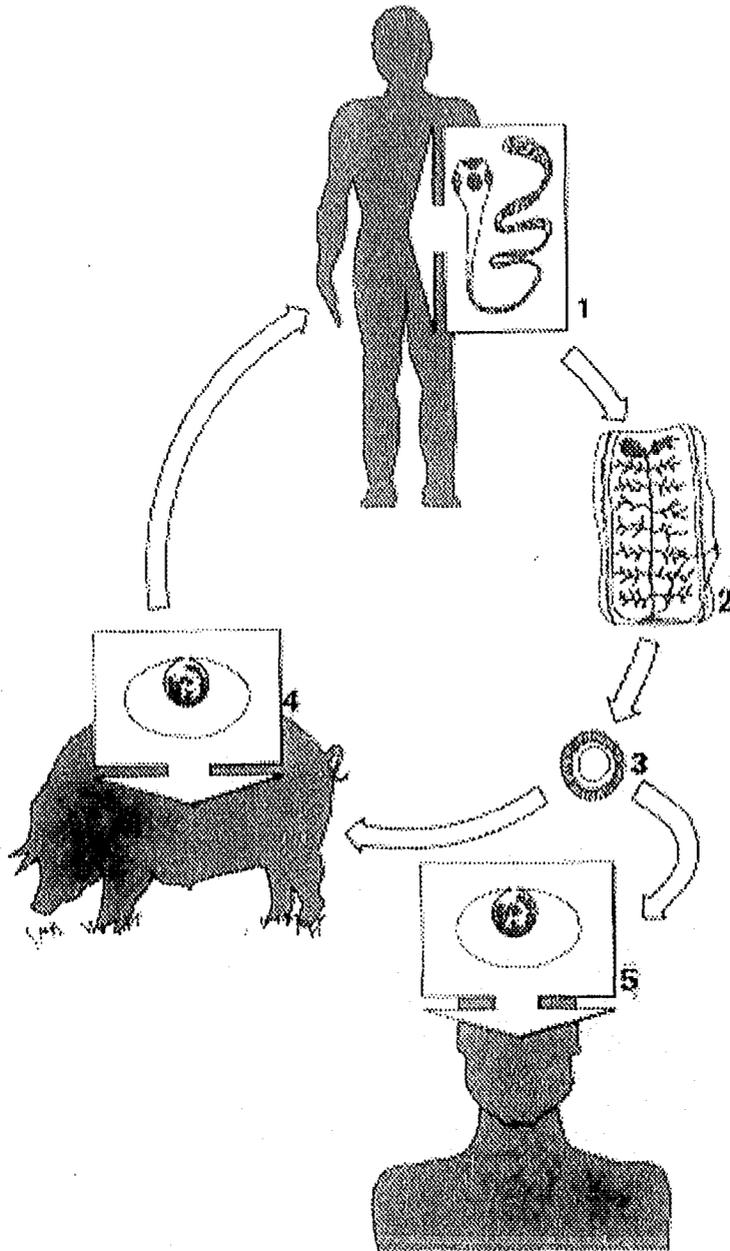


Figura 1. Ciclo de vida de *Taenia solium*.

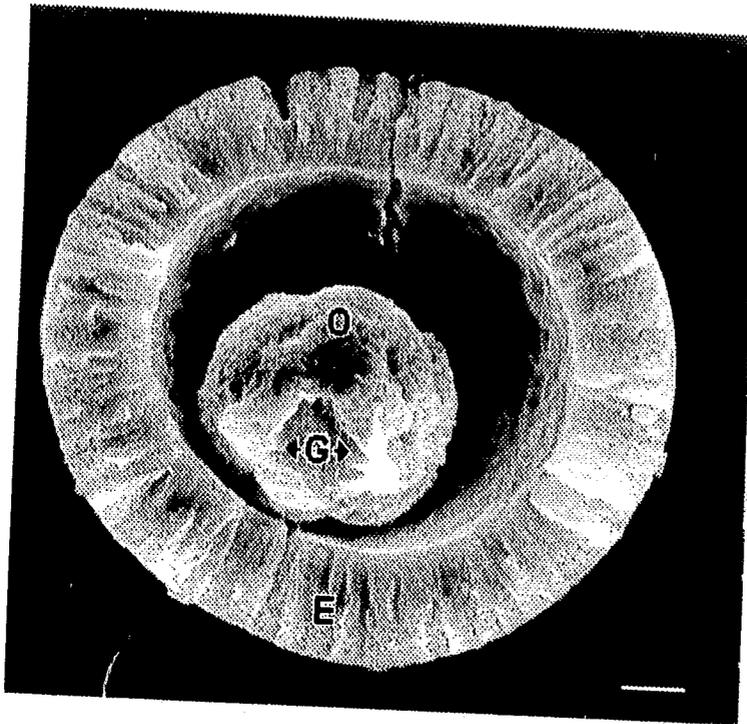


Figura 2. Micrografía electrónica de barrido de un huevecillo de *Taenia solium*. E: embrión, G: ganchos oncosferales, O: oncosfera (tomada de Lactette *et al.*, 1982).

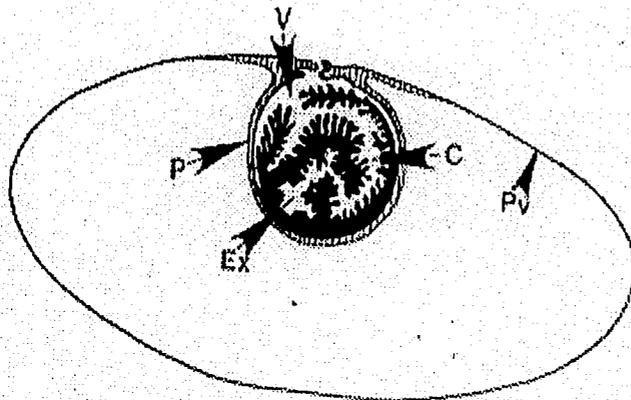


Figura 3. Morfología del cisticerco de *Taenia solium*. Ilustración esquemática de la larva. C: canal espiral, Ex: escólex, P: pared vestibular, Pv: pared vesicular y V: espacio vestibular (tomada de Slaiss, 1970).

Posteriormente, el embrión alcanza los capilares sanguíneos y linfáticos que lo llevan a diferentes órganos, en donde se desarrolla hasta convertirse en un cisticerco.

El metacéstodo o cisticerco (Fig. 3) es una vesícula translúcida, ovoide o circular, de 5 a 10 mm de diámetro con un pequeño gusano o escólex metido hacia dentro (invaginado). El escólex invaginado tiene un rostelo con una doble hilera de ganchos y cuatro ventosas, semejante al de la etapa adulta. La vesícula está llena de un fluido transparente que contiene proteínas del parásito y del huésped (Ambrosio Hernández, 1991). La pared vesicular es un tejido sincicial cuya superficie externa muestra un epitelio cubierto de microvellosidades o microtricas (Fig. 4) conocido como tegumento (Ramírez-Bon *et al.*, 1982). El tegumento también es llamado citoplasma distal y se conecta con los citones tegumentales a través de puentes citoplásmicos llamados procesos internunciales. Por debajo del tegumento se encuentran varias capas de músculos lisos, bolsas de almacenamiento de glucógeno y grasas así como un sistema protonefridial constituido por varios tipos celulares tales como las células flama y las células de los canales (Ramírez-Bon *et al.*, 1982). El cisticerco puede permanecer en los tejidos del huésped intermediario durante un buen número de años (Dixon *et al.*, 1944; Dixon *et al.*, 1961), rodeado por una cápsula de tejido conectivo. Cabe hacer notar que el tegumento es el sitio de contacto del parásito con el huésped por lo que debe desempeñar un papel central en el mantenimiento de la relación huésped-parásito.

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

La tenia adulta mide entre 1.5 y 5 m de longitud y su cuerpo está formado por el escólex, el cuello y el estróbilo (Fig. 5). El escólex o cabeza presenta cuatro ventosas y un rostelo armado con una corona doble de ganchos, que posibilitan su fijación a la mucosa intestinal. A continuación del escólex se encuentra el cuello, que es la región que da origen al estróbilo y que presenta una alta actividad mitótica. Finalmente, el estróbilo es una cadena de proglótidos que se desarrollan a partir del cuello. Cada proglótido posee genitales masculinos y femeninos y su grado de diferenciación está relacionado con la posición que ocupa en el estróbilo; los proglótidos más lejanos al cuello y al escólex son más maduros que los más cercanos. Los proglótidos maduros poseen varios cientos de testículos y un ovario trilobulado, por lo que se piensa que se autofecunda para producir hasta 50,000 huevecillos (Fig. 6). Estos proglótidos grávidos se liberan del estróbilo a un ritmo de cinco por día, descargando cantidades enormes de huevecillos potencialmente infectantes al medio ambiente. Los huevecillos pueden estar maduros o inmaduros; los inmaduros pueden madurar en el medio ambiente y permanecen viables e infectantes por semanas o meses (Aluja *et al.*, 1987). La contaminación de aguas y alimentos con los huevecillos es favorecida por el fecalismo al aire libre, el hacinamiento y la falta de higiene. En general se acepta que los huéspedes intermediarios se infectan por ingestión de los huevecillos que contaminan alimentos y agua. Recientemente, se ha encontrado que la cohabitación con un individuo teniásico aumenta el riesgo de adquirir la cisticercosis, lo que significa que la

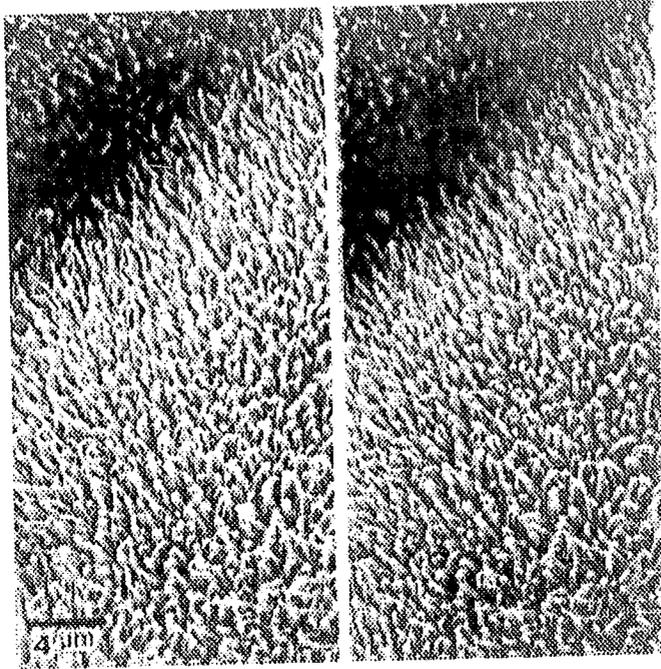


Figura 4. Superficie externa de la pared vesicular de un cisticerco de *Taenia solium* en la cual se pueden distinguir las microtricas (tomada de Ramírez-Bon *et al.*, 1982).

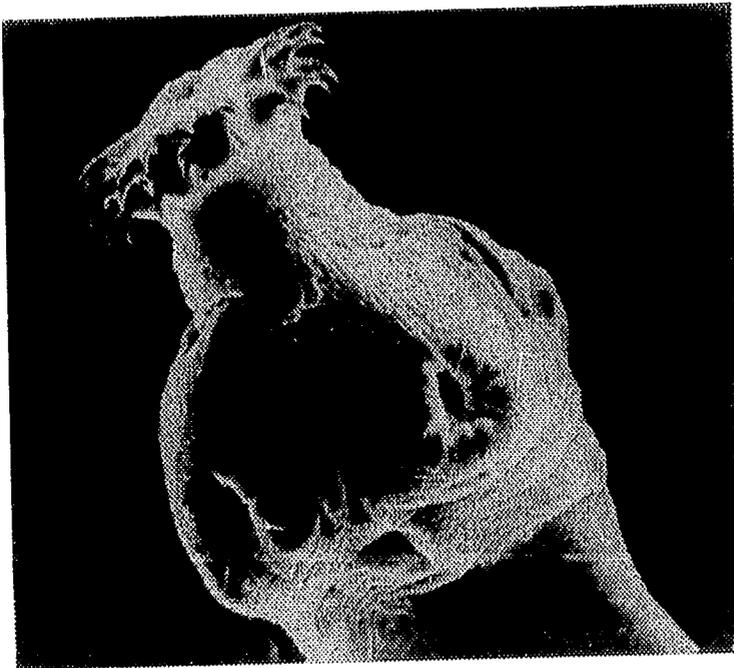


Figura 5. Micrografía electrónica de barrido del escólex de un cisticerco evaginado de *Taenia solium* (cortesía del Dr. Juan Pedro Laclette).

transmisión también ocurre directamente por un individuo teniásico (Díaz-Camacho *et al.*, 1989).

## 2. Importancia socio-económica de la cisticercosis humana

La cisticercosis humana es una parasitosis importante desde el punto de vista económico y social en México y otros países. A pesar de ello, se trata de una infección casi siempre benigna puesto que sólo una pequeña proporción (10-20%) de los individuos infectados muestran algún síntoma.

En un estudio hecho en 1982, Velasco-Suárez calculó pérdidas económicas anuales de 2,500 a 5,900 millones de pesos (equivalentes a 350 millones de dólares americanos), debidas a la incapacidad laboral de individuos con cisticercosis. Las pérdidas económicas por gastos de atención médica a pacientes con neurocisticercosis en 1986 fueron de 14.5 millones de dólares al atender a 2,700 casos de neurocisticercosis (Flisser, 1988). Por último, el 75% de los individuos adquieren la cisticercosis en edad productiva (Velasco-Suárez *et al.*, 1982; Flisser, 1988).

## 3. Importancia de la cisticercosis porcina

Se puede decir que la cisticercosis es un problema de conducta humana que se mantiene por ignorancia, negligencia, corrupción y falta de recursos. La costumbre de crianza de los cerdos en libertad incrementa el riesgo de que adquieran la cisticercosis por alimentación con heces humanas, alimentos y agua contaminadas con huevecillos de *T. solium* (Fig. 7). Los animales cisticercosos detectados en la inspección *post-mortem* deberían ser decomisados y procesados adecuadamente para evitar destruir la carne. Sin embargo, en nuestro país un gran número de animales infectados son distribuidos clandestinamente y no pasan inspección veterinaria.

Existen diversos estudios que han tratado de estimar la prevalencia de la cisticercosis porcina en diferentes regiones del país. El estudio más completo es el realizado con los registros de 75 rastros en 22 estados de la república, el cual se puede ver en la Tabla I (Aluja, 1982).

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

## 4. Inmunología de la cisticercosis.

La presencia del cisticerco en los tejidos de su huésped humano o porcino induce la formación de una respuesta inmune. La respuesta inmune del huésped cisticercoso ha sido estudiada principalmente de una manera indirecta en trabajos relacionados al inmunodiagnóstico. Se ha encontrado que la respuesta inmune no se relaciona con la destrucción del parásito. Los humanos cisticercosos tienen anticuerpos contra el cisticerco y a pesar de ello, el cisticerco sobrevive por periodos relativamente prolongados. Se ha

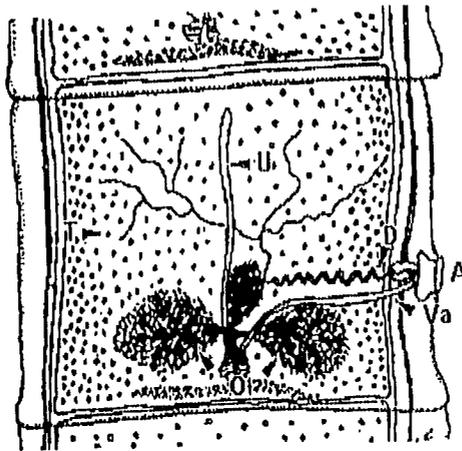


Figura 6. Representación esquemática de un proglótido de *Taenia solium*, enfatizando al aparato reproductor. A: atrio genital, D: ducto genital, Ot: ovario trilobulado, T: testículos, U: útero y Va: vagina.



Fig. 7. Cerdo en libertad alimentándose con desechos en una población rural (tomado de Aluja, 1982).

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

<i>Estado</i>	<i>Localidad</i>	<i>Frecuencia</i>	<i>Año</i>
Aguascalientes	Aguascalientes	0.52	1980
Chihuahua	Chihuahua	0.49	1980
	Chihuahua	3.32	1980
	Chihuahua	1.65	1981
Colima	Varios	2.4	1980
Coahuila	Torreón	2.37	1981
Distrito Federal	México, Ciudad	0.16	1981
Durango	Durango	2.21	1980
Guanajuato	Ocampo	10.0	1981
	San Felipe	3.0	1981
Jalisco	Guadalajara	0.005	1981
Michoacán	La Piedad	10.0	1980
Morelos	Varios	1.9	1980
	Cuernavaca	0.37	1980
Nuevo León	Monterrey	0.016	1981
Querétaro	Querétaro	0.74	1981
Sonora	Hermosillo	0.07	1980
Tamaulipas	Ciudad Victoria	0.37	1980
Tlaxcala	Huamantla	0.63	1980
	Apizaco	3.3	1980
Veracruz	Jalapa	0.11	1980
	Veracruz	0.75	1980
	Tuxpan	1.08	1980
Yucatán	Mérida	0.04	1980
Zacatecas	Jerez	0.75	1980
	Fresnillo	2.10	1980
	Zacatecas	1.26	1980
Tabasco	No se encontró información		
Campeche			

demostrado que el tiempo promedio para la aparición de los síntomas en los individuos cisticercosos es de 7 años y puede llegar hasta los 20 años (Dixon, *et al.*, 1961).

La IgG es la inmunoglobulina predominante entre los anticuerpos anti-cisticercos (Flisser *et al.*, 1980, Correa *et al.*, 1989). Los sueros reconocen en inmunoelectroforesis hasta 8 antígenos y en Western blot más de 20 (Flisser, *et al.*, 1983). En la cisticercosis humana los cisticercos presentan abundante IgG del huésped asociada a la superficie, sin embargo, estas moléculas tampoco se relacionan con el daño en los cisticercos (Correa *et al.*, 1989). También, se ha informado que hay anticuerpos humanos contra glicocáliz integumental, componentes del citoplasma de los citones tegumentales, antígenos del estroma y del sistema ductular, pero no hay en contra del tegumento del canal espiral, ni del músculo de las ventosas del escolex (Shankar *et al.*, 1995). De manera similar, en la cisticercosis porcina, la superficie del cisticercos así como la cápsula inflamatoria formada por el hospedero están cubierta por inmunoglobulinas del cerdo (Sealey *et al.*, 1982). También se ha descrito una molécula de 55 kDa que se une a la región Fc de las inmunoglobulinas (Mandujano *et al.*, 1992).

Las personas infectadas pudieran tener mayor susceptibilidad a otras enfermedades (Correa *et al.*, 1989). Aparentemente la proliferación celular a mitógenos se encuentra disminuida en pacientes con cisticercosis (Willms *et al.*, 1980; Correa *et al.*, 1989), pero la evidencia es contradictoria (Sealey *et al.*, 1982; Correa, comunicación personal); sin embargo, es consistente el hecho de que en dos estudios se encontró disminuida la respuesta celular al derivado proteico purificado de *Mycobacterium tuberculosis* (PPD) (Sealey *et al.*, 1982; Correa *et al.*, 1989). La disminución de la proliferación celular también ha sido descrita en la cisticercosis porcina (Molinari *et al.*, 1987; Tato *et al.*, 1987; Molinari, *et al.*, 1993; Herrera *et al.*, 1994), cisticercosis murina por *T. crassiceps* (Sciutto, *et al.*, 1995) y por *T. taeniaformis* (Letonja *et al.*, 1987). Incluso se ha informado un factor de RNA que inhibe la activación de linfocitos humanos por fitohemaglutinina (Molinari *et al.*, 1990). Por otro lado también se ha encontrado que los extractos de *Cysticercus cellulosae* pueden ser mitogénicos para linfocitos de ratón (Sealey *et al.*, 1982).

Se ha propuesto que el cisticercos emplea varios mecanismos para evadir la respuesta inmune del huésped y sobrevivir por largos periodos (Correa *et al.*, 1989). Entre los mecanismos propuestos se pueden mencionar: 1). secreción de antígenos inmunodominantes para desviar a los anticuerpos lejos de la superficie ("pantalla de humo"), 2). enmascaramiento de la superficie con moléculas del huésped, 3). modulación o supresión de la respuesta inmune del huésped, 4). establecimiento del parásito en huéspedes inmunosuprimidos y 5). alojamiento en lugares inmunológicamente privilegiados tales como el sistema nervioso (Correa *et al.*, 1989).

Apesar de lo anterior, el huésped es capaz de producir un infiltrado inflamatorio, cuyo perfil puede ser complejo y puede eventualmente eliminar al parásito. Por ejemplo, en la cisticercosis meníngea, una de las formas benignas de la enfermedad, la reacción inflamatoria es en general escasa y el infiltrado está compuesto por linfocitos, células plasmáticas y epitelioides, pocas veces células gigantes y rara vez se observan eosinófilos. En contraste, en el caso de la cisticercosis meníngea cisternal, una de las formas más graves, la reacción inflamatoria está constituida por numerosas células inflamatorias entre las que se identifican linfocitos, células plasmáticas, algunos cuerpos de Russell, células epitelioides, numerosas células gigantes, ocasionalmente polimorfonucleares y algunos eosinófilos (Rabiela, 1989).

El caso de la respuesta del cerdo es diferente. En la cisticercosis porcina natural en músculo esquelético, los eventos celulares durante la destrucción del parásito sugieren un proceso secuencial iniciado por los eosinófilos. Una vez iniciada la destrucción, se incrementan los macrófagos, células epiteloides, así como las células gigantes que invaden la cavidad para fagocitar el exudado y los restos de la larva. Las células linfoides forman agregados similares a folículos, simultáneamente los eosinófilos parecen retirarse de la región más interna de el proceso inflamatorio y se observan dispersos entre los demás alimentos de la reacción granulomatosa (Aluja *et al.*, 1988). Cabe señalar que un punto discordante radica en el tipo de infiltrado celular de la cisticercosis humana y de la porcina, ya que en el padecimiento humano casi no hay eosinófilos, lo cual ha sido explicado por el hecho de que la eosinofilia es un fenómeno temprano.

Por otro lado, se puede inducir inmunidad en cerdos con antígenos de excreción/secreción obtenidos en cultivos de oncosferas (Pathak *et al.*, 1990), con extractos antigénicos del cisticerco de *T. solium* (Molinari *et al.*, 1993, Nascimento *et al.*, 1995) o de *T. crassiceps* (Sciutto *et al.*, 1995a), o con fracciones antigénicas de *Taenia crassiceps* (Manoutcharian *et al.*, 1996). También se puede proteger ratones de la infección por *T. solium* y *T. saginata* con antígenos oncosferales de estos parásitos (Molinari *et al.*, 1988). En el caso de la *T. ovis* y de la *T. taeniaeformis*, se ha demostrado una alta protección utilizando proteínas de excreción secreción oncosferal o sus formas recombinantes (Johnson *et al.*, 1989; Ito *et al.*, 1991). También, se han detectado antígenos que pueden correlacionarse con la respuesta inmune protectora, en cerdos vacunados con antígenos totales de *T. crassiceps* (Sciutto *et al.*, 1995a).

Aparentemente el establecimiento de un protocolo de inmunización no es simple. Al respecto se ha informado que la vacunación con altas dosis de antígenos de *T. crassiceps* en cerdos (Sciutto *et al.*, 1995a) y en ratón (Sciutto *et al.*, 1990) parecen no ser protectoras o incluso podrían facilitar la infección, mientras que bajas dosis inducen la reducción de la carga parasitaria; también, se ha sugerido que el adyuvante empleado podría alterar la eficiencia de la protección en cerdos (Sciutto *et al.*, 1995a). Asimismo, se ha propuesto que algunos anticuerpos podrían facilitar la infección de *T. solium* en cerdos (Sciutto *et al.*, 1995a) y de *T. crassiceps* en ratón (Sciutto, 1990) y se ha encontrado que el genotipo puede influenciar la respuesta inmune a la infección por *T. crassiceps* en ratón (Sciutto *et al.*, 1991) y lo mismo se ha sugerido en la cisticercosis porcina (Sciutto *et al.*, 1995a).

Los estudios sobre el mecanismo inmune de protección se han realizado principalmente en los modelos experimentales de rata y ratón. En estos modelos se ha encontrado que este mecanismo de protección dependerá de la etapa de desarrollo del parásito. En rata y ratón se ha visto que la resistencia natural a la infección por oncosferas de *T. taeniaeformis* tiene por lo menos componentes humorales. Esta resistencia se detecta en suero a partir de la segunda semana de infección. En el ratón los isotipos más relevantes en la resistencia son el IgG1 y el IgG2, mientras que en rata es el IgG2a; pero conforme la infección progresa son involucrados más isotipos. Existe evidencia que el mecanismo de resistencia depende del complemento. Sin embargo, después de la primera semana se pierde parte de la susceptibilidad del parásito a este mecanismo humoral de ataque. No obstante, después de esta etapa es posible inducir resistencia con extractos de cisticercos; la resistencia, si bien es humoral, parece que depende de un perfil de isotipos diferente al

producido después de la infección oral. Por otra parte, la IgA se ha involucrado en la resistencia natural pasiva transferida de ratas madres a sus crías durante la lactancia (Williams *et al.*, 1982).

No ha sido muy estudiada la participación de la inmunidad celular en la resistencia y los mecanismos protectores en contra de la cisticercosis. Incluso, los diferentes modelos han proporcionado diferentes conclusiones. Por ejemplo, el mecanismo de protección contra *T. taeniaformis* en ratones parece no depender de la participación de linfocitos T, ya que ratones atímicos desnudos pueden ser protegidos de la infección por el parásito tan solo con suero inmune. Por otro lado, se ha publicado que poblaciones enriquecidas de linfocitos B y T pueden causar reducción significativa de la carga parasitaria, en menos tiempo del esperado para el mecanismo humoral (Williams *et al.*, 1982; Asano *et al.*, 1993). Además, se ha informado que larvas maduras de *T. taeniaformis* pueden sobrevivir por largos periodos en la cavidad peritoneal de ratas tratadas con grandes dosis de suero inmune protector (Williams *et al.*, 1982). Y, finalmente, en la infección intraperitoneal de ratones con larvas de *T. crassiceps*, la resistencia se ha relacionado más claramente con la inmunidad celular que con el total de anticuerpos (Bojalil, *et al.*, 1993).

Por otra parte, los eosinófilos han sido frecuentemente relacionados con la destrucción del parásito. Este es el caso de la cisticercosis porcina. Como se describió anteriormente, en la infección natural del cerdo por el cisticerco de *T. solium*, los eventos celulares durante la destrucción del parásito sugieren un proceso secuencial iniciado por los eosinófilos (Aluja *et al.* 1988). Similarmente, en cerdos inmunizados con extractos de cisticerco de *T. solium* se han descrito varios tipos celulares en el proceso inflamatorio que destruye al parásito, tales como: eosinófilos, monocitos, linfocitos, macrófagos y células epiteloides. Sin embargo, nuevamente los eosinófilos aparentemente participan en la destrucción del cisticerco, ya que se ha encontrado que la inmunización induce eosinofilia, forman la capa más interna de la reacción granulomatosa que rodea a la larva, degranulan en las cercanías del parásito, se infiltran en el tegumento y rodean a los restos del parásito destruido (Molinari *et al.*, 1983; Molinari *et al.*, 1983a; Molinari *et al.*, 1993; Nascimento *et al.*, 1995). En el modelo murino de cisticercosis por *T. taeniaformis* se ha encontrado que después de que las oncosferas llegan al hígado, aparentemente los eosinófilos se convierten en elementos prominentes de la respuesta inflamatoria que rodea y elimina las oncosferas (Williams *et al.*, 1982). Al respecto, cabe señalar que la participación de los eosinófilos en la defensa del huésped contra parásitos helmintos está siendo reevaluada, ya que ratones deficientes de eosinófilos (por medio del tratamiento con anticuerpos anti-IL-5) fueron igualmente susceptibles a la infección con diferentes helmintos que los ratones controles. No se puede concluir que en estos modelos los eosinófilos no participan en la defensa del huésped, ya que no se puede descartar que otros mecanismos de defensa puedan substituir a la función del eosinófilo durante la infección; sin embargo, sí sugieren la posibilidad de que los eosinófilos no tengan una función predominante en la defensa del huésped contra el parásito (Weller, 1994).

## 5. Antecedentes del Proyecto

El antígeno mejor caracterizado del cisticerco de la *T. solium* es sin duda el antígeno B (AgB). Este antígeno fue caracterizado inicialmente como un arco de precipitación sin carga neta aparente, identificado por inmunoelectroforesis al confrontar un extracto de cisticercos contra sueros de pacientes neurocisticercosos (Fig. 8). En esta prueba, fue el antígeno reconocido con mayor frecuencia por anticuerpos en sueros de pacientes neurocisticercosos, es decir, se trata de un antígeno inmunodominante (Woodhouse *et al.*, 1982; Espinoza *et al.*, 1986).

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

Accidentalmente se encontró que el AgB se une a la colágena (Plancarte *et al.*, 1982), lo que dio la pauta para desarrollar un procedimiento de purificación por afinidad a colágena (Fig. 9). El uso de este nuevo método de purificación mostró que el péptido de 85 kDa era en realidad un producto proteolítico del de 95 kDa (Laclette *et al.*, 1990).

La localización de AgB en el cisticerco ha sido llevada a cabo por métodos de inmunofluorescencia e inmunoperoxidasa indirecta, así como por métodos de yodación radioactiva de superficie (Laclette *et al.*, 1987). El antígeno se encontró ampliamente distribuido en el tejido del cisticerco, con una fluorescencia más intensa en los citones tegumentales (Laclette *et al.*, 1987; 1989)(Fig. 10). Dado que estas células participan activamente en la producción de proteínas y glicoproteínas que se envían al citoplasma distal (Lumsden, 1966; Oaks *et al.*, 1971; Trimble *et al.*, 1975), se propuso que el AgB podría ser sintetizado en los citones tegumentales y enviado al tegumento para su liberación hacia los tejidos del huésped (Laclette *et al.*, 1987; 1989). Los resultados de experimentos con inmunoperoxidasa indirecta e yodación radioactiva de superficie, indicaron que el AgB no era una proteína de superficie por lo que se propuso que se trataba de un producto de excreción-secreción parasitario (Laclette *et al.*, 1987; 1989). Además, se puede coleccionar AgB en el sobrenadante de cultivo *in vitro* de cisticercos (Laclette *et al.*, 1989) y se le puede detectar en el LCR de pacientes neurocisticercosos (Correa *et al.*, 1989). Cabe señalar que recientemente se ha cuestionado la localización del AgB en el tegumento de helmintos (Laclette *et al.*, 1995).

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

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

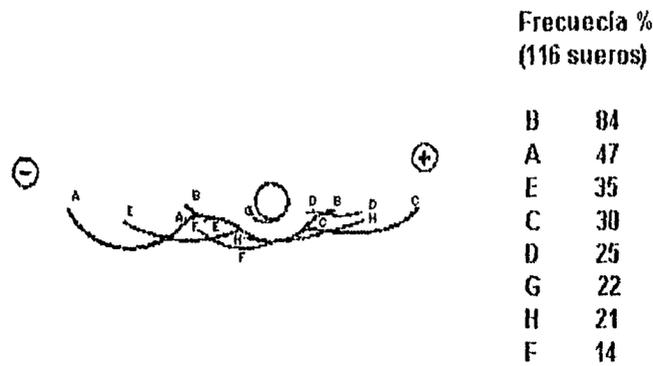


Figura 8. Diagrama de las 8 bandas de precipitación reconocidas por anticuerpos en sueros humanos enfrentados contra un extracto de cisticercos de *Taenia solium* mediante la técnica de inmunoelectroforesis (tomado de Flisser *et al.*, 1983).

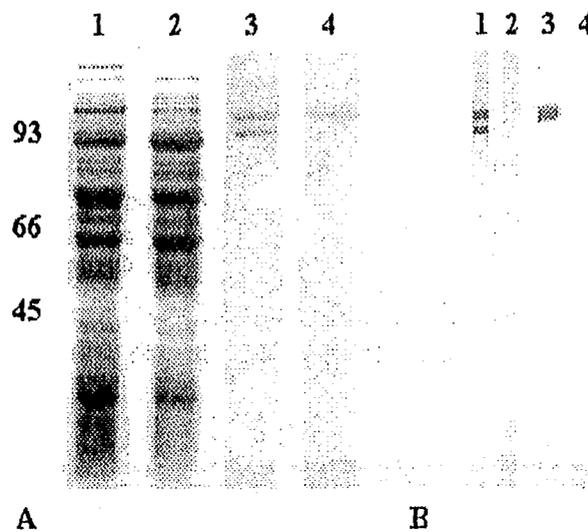


Figura 9. Purificación del AgB de *Taenia solium* a partir de un extracto crudo de cisticercos por afinidad a colágena. A: Gel de poliacrilamida teñido con azul de Coomasie de: 1) extracto crudo de cisticercos, 2) extracto crudo de cisticercos después de incubación con colágena polimérica. Fracciones unidas a la colágena cuando el extracto crudo se incubó en ausencia (3) o en presencia (4) de inhibidores de proteinasas. B: Western blot de la fracción A3 (carriles 1 y 2) y A4 (carriles 3 y 4) incubadas con IgG de conejo anti-AgB (líneas 1 y 3) y con suero normal de conejo (líneas 2 y 4) (tomada de Lacleite *et al.*, 1989).

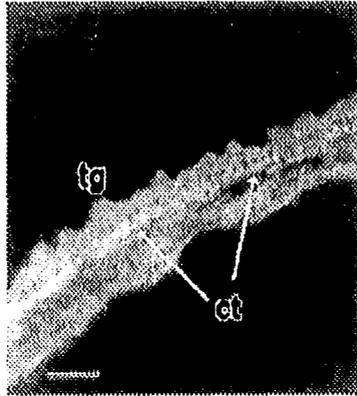


Figura 10. Inmunofluorescencia indirecta de un corte de cisticerco de *T. solium* incubado con la fracción de IgG de un suero anti-AgB. Como segundo anticuerpo se usó un suero de chivo  $\alpha$ -conejo acoplado a isotiocianato de fluoresceína. tg:tegumento y ct:citoses. Barra:  $80\mu$  (tomada de Lacleite *et al.*, 1987).

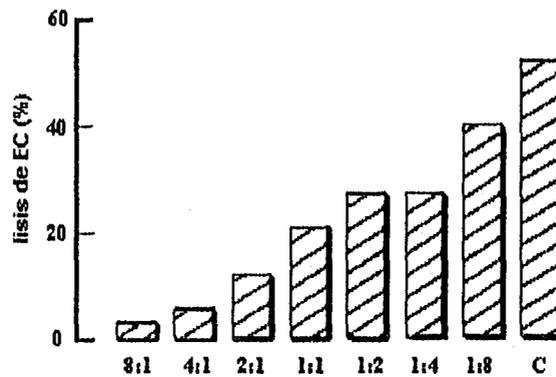


Figura 11. Inhibición de la actividad del complemento (C) por el AgB. Suero humano normal precalentado a  $50^{\circ}\text{C}$  por 20min, se incubó, por 60min a  $37^{\circ}\text{C}$ , con diferentes cantidades de AgB purificado. Este suero fue usado como una fuente de C para inducir la lisis de eritrocitos de camero (EC) mediada por anticuerpos específicos ( $\alpha$ -EC). En el eje de las abscisas se encuentra porcentaje de lisis de EC y en el eje de las ordenadas la relación C:AgB (tomada de Lacleite *et al.*, 1989).

Ensayos iniciales mostraron que una preincubación de suero humano con AgB purificado, disminuye los niveles de complemento funcional en el suero (Laclette *et al.*, 1989). Recientemente, nuestro grupo ha informado que la disminución de los niveles funcionales del complemento se debe a una inhibición del C1, posiblemente debida a la unión del AgB con el C1q, tal como se muestra en la figura 11 (Laclette *et al.*, 1992).

Se ha logrado obtener clonas de cDNA que contienen la secuencia codificadora completa del AgB de *T. solium*, tal como se muestra en la figura 12 (Landa, 1992; Landa *et al.*, 1993). La secuencia de aminoácidos deducida a partir de la secuencia nucleotídica codifica una proteína de 863 residuos de aminoácidos con un peso molecular de 98,000. El análisis de la secuencia de aminoácidos ha mostrado un 75% de similitud con la paramiosina del tremátodo *Schistosoma mansoni* y un 35% con paramiosinas de nemátodos como *Caenorhabditis elegans* y *Diraphilaria immitis* o de artrópodos como *Drosophyla melanogaster* (Landa, 1992). También se demostró identidad inmunológica de la proteína recombinante, expresada en *Escherichia coli*, con el Antígeno B (Landa, 1992), además de identidad inmunológica entre paramiosina *S. mansoni* y AgB. Estos resultados demuestran que el AgB es la paramiosina de la *T. solium* (TPmy), por lo que ambas denominaciones serán usadas indistintamente en la presente tesis.

En una publicación reciente se informa de un receptor para Fc asociado a la superficie tegumental de la *T. crassiceps*, que muestra homología completa con el AgB (Kalinna *et al.*, 1993). Este hallazgo es especialmente interesante ya que apoya la idea de una asociación del AgB con la superficie tegumental, además de que este hallazgo puede ser explicado en base a una unión con el C1q. Es decir que la función receptora de Fc podría estar mediada por un complejo AgB-C1q.

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

Cabe mencionar que la paramiosina es también candidato para el desarrollo de una vacuna contra infecciones helmínticas tales como esquistosomiasis (Lanar *et al.*, 1986; Pearce *et al.*, 1986; Pearce *et al.*, 1988; Flanigan *et al.*, 1989; Richter, *et al.*, 1993; Richter, *et al.*, 1993a) y filariasis (Nanduri *et al.*, 1989; Ben-Wen Li, *et al.*, 1991; Ben-Wen Li, *et al.*, 1993). Además, se puede inducir protección parcial con un anticuerpo monoclonal IgE anti-paramiosina contra *Schistosoma japonicum* (Naram, *et al.*, 1994) y se ha sugerido que la respuesta inmune a la paramiosina se relaciona con la resistencia natural a la esquistosomiasis en humanos (Correa-Oliveira, *et al.*, 1989). Incluso se ha logrado producir anticuerpos anti-paramiosina en ratón al vacunar con fragmentos de DNA que codifican para paramiosina de *Schistosoma japonicum* (Yang, *et al.*, 1995). Resultados preliminares obtenidos en el laboratorio muestran que la inmunización con TPmy recombinante induce protección en la cisticercosis murina.

Finalmente, se ha encontrado que un anticuerpo monoclonal dirigido contra un antígeno de superficie de 14 kDa de *Onchocerca microfilariae* reconoce una molécula que parece ser la paramiosina en un extracto de gusano adulto (Conraths, *et al.*, 1992).

-236 CTCTCCAGCTTTTGATCCCTTGCACCGGTTTGTG

TTCTTCCAATAGACTGSAACCGTGTATAACTTTTGAATTTTCCCTGTGACTGCTTTGACTAGGAAAGGAATTTTCTGAGCGGTTCGATTCATTTGAAATC  
 CGGTCCGTTTTCTGACTTTTGAATCTACTTCACGACACACCAACATCCATTTGCGACGTCGCGTATTCACACAAACCGGACCTATCAGAGACGGAAGAC

**TPhyX1** 1 ATGCTGTGAATCACACAGTCAAAAATTTCTGTACCATCATACGCGGGACTTCCCAAGTACTGTTGCGACTTGAGAGTGGGTACGAGAAGTGGAGACCTGCT

M S E S H V K I S R T I I R G T S P S T V R L E S R V R E L E D L L 34

102 CGATCTTGAGCGAGATGCTCGCTCCGGGCTGAACGCAATGCCAAGGATGAGCATTCAGCTGGACACCATGGCTGAACGCTTTCAGCAATTCAGTGGTA  
 D L E R D A R V R A E R N A N E M S I Q L D T M A E R L D L E L S G 67

203 CTCTCTCAGACTCAGGATGCTATTCGCGTAAGGATATGGAGATCGAAGCTGCGCAAGGATCTGGAAATGCCAACGCTGCTTTGGAAACTGCCGAG  
 T S S Q T H D A I R R K D M E I S K L R K D L E N A N A F T A E 101

304 GCCACTCTGCGCCGCAACACACACCATGATCTCCGAGATCTCCAGCGAGTTGAGAAATTCGAGAAGCAGAAAGGCGAGGAGGAGGACAAGAGCC  
 A T L R R K H N T M I S E I S S E V E N L Q K Q K G R A E K D K S Q 135

405 GCTCATGCTTGAATCGATAACGCTTCTGGTCAACTGTATGGCGCTTTAAAGCCAAAGGCTCAGCGGAGAGCAACTGGAGGCTTGGACAGCCAGCTGA  
 L H L E I D N V L G Q L D G A L K A K A S A E S K L E G L D S Q L 168

506 CGCGCTTGAAGGCGTGAACGACGATCTCAACGCCAAATGGCGGACTAACCTGCGCAAGTCCGCTTTGGCCGAGAGAACTTCGAATGGTTCGCGTA  
 T R L K A L T D D L Q R Q M A D A N S A K S R L A A E N F E L V R V 202

607 AATCAGGATGATGAGCACAGTCTGCTCCTTAAAGCAAAAGCCGCTTGAAGCCAGCTGGATGACCTAAACGGCCATGGATGAGATGCAG  
 N Q E Y E A Q V V T F S K T K A A L E S Q L D D L K R A M D E A R 236

**TPhyX6** 708 CAATCGCTTAAACACAGTGTGCGAGTCTGCAATGGACTACGCAACTGCAAGCAGTTCAGGAGGAAAGCCGAGCCAGCCGAAAATCTGC

N R L S L Q T Q L S S L Q L M D I Y D N L Q A R Y E E E A E A G N L 269

**TPhyX4** 809 GCAACCAAGTTGCAAAATTCACGCGGATATGGCTGCGCTCAAGCCGCTTGAAGAGAACTTATGGCCAGACTGAAGAGTTTGAAGAACTCAAGCC  
 R N Q V A R F N A D M A A L K T R L E R E L M A K T E E K R Q 303

910 AAGTGTACTGTTGCGATTACCGAGTGGAGGATATGCTGAACATGAGCGGACTGCTGCCAACACCTGGAGAAAGCAAGTTAAGCTGACTTGTGAT  
 K L T V R I T E L E D M A E H E R T R A N N L E K T K V K L T L E I 337

1011 CAAGGATCTACAGGCTGACGACGATCTTCAACGCCAAATGGAGGATTAACGCTTGGGGGAAACGAGGAGAGAACTTGGCCATGAGCTGCAGGCTC  
 K D L Q A E N E A L A A E N G E L T H R A N E A E N L A N E L Q R 370

1112 GAATCAGGATGATGAGCACAGTCAACACCTCAACTCGGCCAAGCGCTTGAAGCCGCAACACTCAAGGGCAGCTGAGTGGATGACCTCAC  
 R I D E M T V E I N T L N S A N S A L E A D N M R L K G Q V G D L T 404

1213 GACCGCATCGCAATCTCGACCGGAAAACCGCAACTTGGCGATCACTGAAGGAGAGCAATCAGCCCTGCGTATGCGAATCTGCGACTGACCGATTT  
 D R I A N L D R E N R Q L G D Q L K E T K S A L R D A N R R L D L 438

1314 GGAGCCCTCGCCAGTCAAGTGGAGGAGAGCTGACAACTCGCCCTGCTTCCATGATGCTGAGGAGGCACTGAAGGAGATGGAAGCGAAGTACGTTG  
 E A L R S Q L E A E R D N L A S A L H D A E E A L K E M E A K Y V 471

1415 CCTCCGACAGGCTCTTAATCACTCAAGTCCGAGATGGAAACAGTCTGCGTGAAGGAGCAGGAACTGGAGAACTCGAAGAAAGCAGCAGCTCCGACG  
 A S Q N A L N H L K S E M E Q R L R E K D E E L E N L R K S T T R 505

1516 ATTGAGGATGAGCAACCACTCTCAGAGATGGAGGTTCCGTTCAAGTCGGAATATGCTGCTGAAGAAAGAACTGAGGAGGCACTCAGGAGCTCAG  
 I E E L T T T I S E M E V R F K S D M S R L K K K Y E A T I S E L E 539

**TPhyX7** 1617 GGTGAACATAGAGCTGGCGACAGCGGCAAGCTCAACTCAACCGCGAGAACAAACCTGGCTCAACGAGTTCAAGAGCTGACGGCTGCGTGGAGGACG

V Q L D V A N K A N V N L N R E N K T L A Q R V Q E L Q A A L E D 572

**TPhyX5** 1718 AGGACGAGCTCGCAAGCTGCAAGAGCAACTTGCAGGTGAGCGAGCGCAACCGCATCGCCCTTGCCTGGAAAGTGAAGAGATTCGAGCCCACTGGAA  
 E R R A R E A A E S N L Q V S E R K R I A L A S E V E E I R S Q L E 606

1819 CTCAGTACCGGCTCGCAAGAACGCGAGTCCGAAGCTCAACGATGCCAATGGAGTATCTCGGAGCTCACCTATCGGTCAACACTCTTACCANTGACAA  
 L S D R A R K N A E S E L N D A N G R I S E L T L S V N T L T N D K 640

1920 ACCTGACTTGAAGCGATATTTGCGTATGCGAGGGGATCTCGATGAGGCGCTCAATGCGCGCAAGGCTGCTGAGGATAGAGCTGACCGCTGACCGCTG  
 R R L E G D I G V M Q G D L D E A V N A R K A A E D R A D R L N A 673

2021 AGTACTCCCGCTGGCTGATGAGCTGCGACAGGAACAAGAAAATACAAAGCGTCTGAGACTCTGCGCAAGCAACTTGAGATCGAGATCCGCTGAGATCAG  
 E V L R A G L A D E L R Q E Q E N Y K R A E T L R K Q L E I E I R E I T 707

2122 GCAAGTTGGAGGAGCTGAGGCTTCTGCTACTGTTGAGGCTCGCGTATGGTTCAAAAGCTCCAGAACTCGGTGAGGAGGTTGAGCGGACGTTGAGCGG  
 V K L E E A E A F A T R E G R R M V Q K L Q N R V R E L E A D V D G 741

2223 AGAAATCGTCCGCGCAAGGAGGCTTCCGCAAGCGCGCAAAATACGAGCTCAATTCAGGAACTGCAGACACAGAGCGAGGATTAACGCATGATTT  
 E I R R A K E A F A N A R K Y E R Q F K E L Q T Q S E D K R M I 774

2324 TGGAGTTCAAGACCTGTAGACAGACTCAGATCAAGATGAAAGCTTACAAACGCTCAGCTGAGGAAACAGGAGGTTGCTCAGCTGACGATGAGCAG  
 L E L Q D L D K T Q I K M K A Y K R Q L E E Q E E V S Q I T M S K 808

2425 TACCGTAAGCGCAGCAACAGATTGAGGAGCGGAACATCGTGTGACATGGCGGAGAGGACGATCACCATTAGAGGACAATTTGGTGAACCGGTTCCCG  
 Y R K A Q Q Q I E E A E H R A D M A E R T I T I K R T I G G P G S R 842

**TPhyX2** 2526 CGCGGTTTCGCTGGTTCGGGAGATCAACAGTGTCTCCCGTGGTAACCGTGCAACCAAGCATCATGTAAGATGTCTCAAAAAGGCGAGAATCGTGACTTTTTT 863

2627 TAGGCTTTATCC /APPROX. 0.85 kb

CCITTTGTTCAATTCGCGTTTTTCTCTCTTCCACCATCTCGGTTCTTCCCTTACCTGAACTGTTCCTGCCGCCACAGAAGACTTAGGGTGTITTTCT  
 CTACCACCTGCTACCACCTAAGCAGGTGGCTTCTTGGTTTCGACTGCGCAGTTTGCACCCTCTTCCCTATTTCAAGTTTGGCTTTATTTGAATGTCTCT  
 GCTGCCAATCAATCACACCCTGCCACCAACGCTGCCACTTACCCTCTGAGTGTATGTTTTATGATTAAGAAATGTTTCAGAAAAA

Figura 12. Secuencia nucleotídica y de aminoácidos de la región codificadora de la clona de cDNA de la paramiosina de la *Taenia solium*. La secuencia subrayada corresponde a la región homóloga con la obtenida por secuenciación directa de AgB purificado. El codón de iniciación (ATG) y de terminación (TAG) se encuentran tachados. Las secuencias subrayadas y en negritas señalan las secuencias correspondientes a los oligonucleótidos descritos en la Tabla II (ver adelante) (tomada de Landa, 1993).

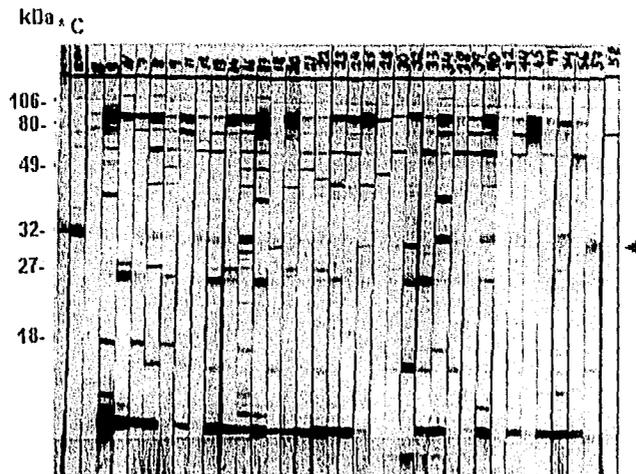
El papel inmunomodulador de la TPmy y su potencial como vacuna no son los únicos atractivos para caracterizar su interacción con C1q. Una proteína que se une al C1q e inhibe la cascada del complemento tiene también potencial biotecnológico. Por un lado cabe la posibilidad de aprovechar sus propiedades anti-inflamatorias, en caso de que la actividad inhibitoria de C1q resida en un péptido pequeño de la molécula. Por el otro lado, la TPmy podría ser utilizada para el atrapamiento de complejos inmunes en soportes sólidos, en el desarrollo de pruebas inmunológicas diagnósticas de enfermedades por complejos inmunes, tales como enfermedades autoinmunes y varias enfermedades parasitarias.

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

Desde los primeros ensayos se determinó que la interacción con C1q se lleva a cabo a través del extremo amino-terminal de la paramiosina. Esto nos llevó a realizar cinco series más de construcciones de expresión, que han permitido localizar el sitio de unión con C1q en fragmentos peptídicos cada vez menores, siempre asociado al extremo amino del AgB. El número total de construcciones de expresión exitosas obtenidas para el gen de TPmy durante el año pasado se aproxima a 30. Se ha logrado expresar TPmy en cantidades preparativas incluso en sistemas eucarióticos glicosilantes. En la actualidad se tiene una idea razonable de la región de la TPmy que se une al C1q y este proyecto del grupo se encuentra en una situación investigativa especialmente interesante (Laclette, comunicación personal).

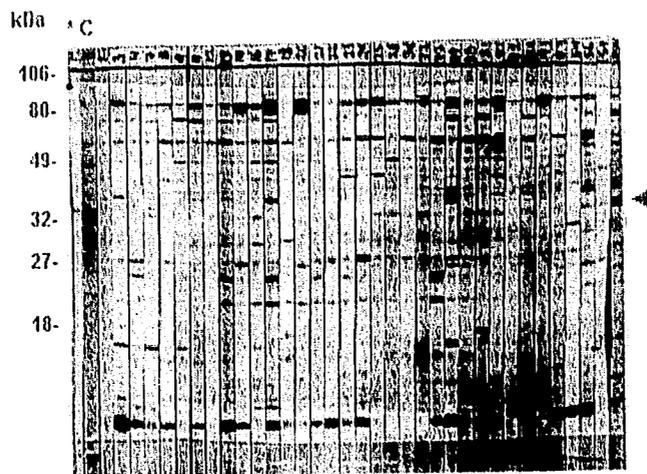
La expresión de TPmy recombinante también ha permitido estudiar hacia que regiones de la proteína se dirige la respuesta inmune humoral y celular del huésped. En estos estudios se utilizaron los mismos fragmentos recombinantes mencionados arriba. Por ejemplo, resultados de ensayos de Western blot en los cuales se enfrentan sueros de pacientes cisticercosos con cada uno de los fragmentos recombinantes, indican que los anticuerpos reaccionan principalmente con el extremo carboxilo terminal de la TPmy (Vázquez, J. 1993). Estos resultados sugieren que el parásito oculta la región que une C1q al reconocimiento por anticuerpos (Fig. 13).

El caso anterior es un ejemplo de la aplicación de la ingeniería genética para identificar las regiones de una molécula que son relevantes en su interacción con otras moléculas. Debido a que la paramiosina es un antígeno natural, inmunodominante e inmunógeno es especialmente interesante determinar cuáles son las regiones de la molécula que interaccionan directamente con el sistema inmune. El estudio de esto puede ayudarnos a comprender qué características debe reunir una molécula para ser inmunodominante o inmunógeno. En el presente proyecto nos propusimos caracterizar a nivel submolecular las regiones de la paramiosina de la *Taenia solium* que son esenciales para su inmunodominancia, así como de estudiar su posible aplicación como inmunógeno. Los objetivos específicos son: determinar cuál(es) es(son) la(las) regiones inmunodominantes para células B, cuál(es) es(son) la(las) regiones inmunodominantes para células T y estudiar

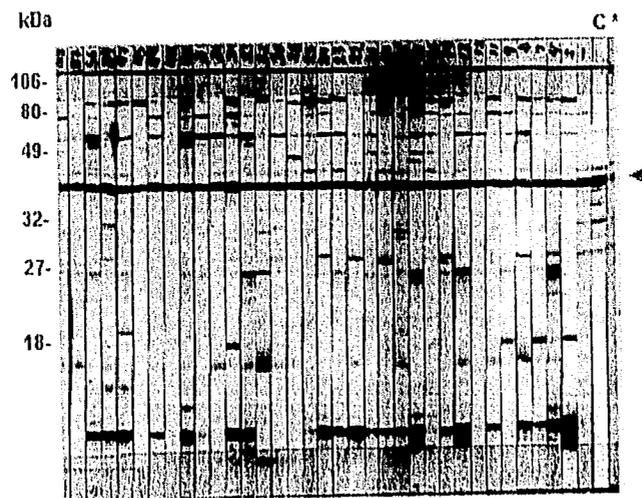


A

Figura 13. Detección de los sueros positivos hacia los fragmentos recombinantes a) VW 2-1, b) VW3-3 y c) VW4-1 por Western blot. Las tiras con cada proteína recombinante se incubaron con sueros humanos positivos al AgB. Se muestra una tira de cada fragmento recombinante teñido con amido negro marcado con un asterisco, la tira C es un control positivo y muestra el reconocimiento de la proteína recombinante por un suero hiperinmune de conejo anti-AgB, la flecha indica la banda que corresponde a los fragmentos recombinantes.



B



C

la capacidad protectora de la TPmy en el modelo de cisticercosis murina por *Taenia crassiceps*.

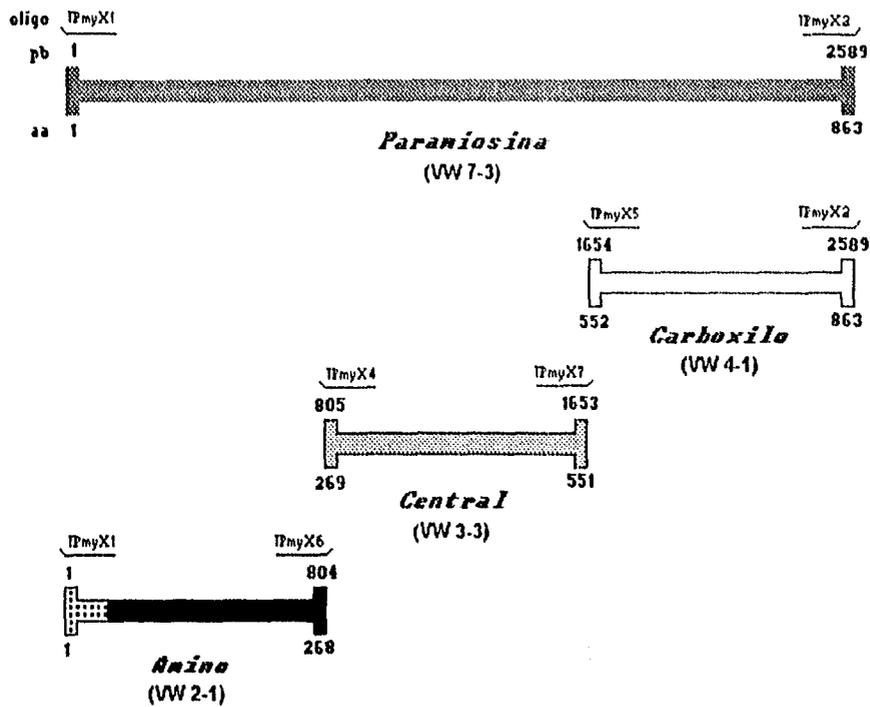
Debido a que el estudio de los factores biológicos que determinan la susceptibilidad a la cisticercosis no es accesible en humanos y difíciles y costosos en cerdos, la infección de ratones con *Taenia crassiceps* a sido usado como modelo para la cisticercosis humana (Larralde *et al.*, 1989). La cisticercosis murina tiene varios puntos similares con la humana, tales como: la anatomía del parásito y el ciclo biológico. Además, se ha demostrado gran semejanza antigénica entre este parásito y el cisticerco de la *Taenia solium*. Finalmente, se ha encontrado que el ratón puede desarrollar una respuesta inmunológica contra la paramiosina de otros parásitos (Pearce *et al.*, 1986; Pearce *et al.*, 1988; Flanigan *et al.*, 1989; Nanduri *et al.*, 1989). Por todo lo anterior se planea trabajar con este modelo de experimentación.

## 6. Objetivos del proyecto:

El objetivo final del presente proyecto de tesis de Maestría es **determinar la distribución de epítopes para células T y B en la paramiosina de *Taenia solium*.**

Para alcanzar este objetivo se probó el reconocimiento de distintos fragmentos recombinantes de la TPmy producidos en construcciones plasmídicas de expresión. En estas construcciones la molécula de TPmy se expresa en su longitud total o en tercios (Figura 14). Los objetivos parciales del proyecto son:

1. Expresión de los fragmentos recombinantes con el vector de expresión pRSET (Invitrogen) y purificación por medio de cromatografía de afinidad a metales de cada uno de los fragmentos recombinantes hasta producir cantidades del orden de miligramos.
2. Ensayos de detección de anticuerpos murinos para determinar cuál es la región predominantemente reconocida por la respuesta inmune humoral.
3. Ensayos de proliferación de linfocitos murinos para determinar cuál es la región predominantemente reconocida por la respuesta inmune celular.



**Region inhibidora del C1q**

Figura 14. Fragmentos de TPmy expresados en un sistema bacteriano para probar en los ensayos de detección de anticuerpos y de proliferación celular. Los fragmentos VW2-1, VW3-3 y VW4-1 equivalen a un tercio de la longitud total de la TPmy (VW7-3). También se encuentra indicado el par de oligonucleótidos empleados para amplificar cada una de las regiones codificadoras (oligo), el número de nucleótidos que comprende cada amplificado (pb) y el número de aminoácidos que limitan cada fragmento (aa).

### III. Materiales y Métodos

#### 1. Materiales

**Ratones.** Se utilizaron ratones hembras de la cepa BALB/c AnN, susceptible a la infección por *T. crassiceps*, mantenidos desde hace más de veinte generaciones en el Bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas.

**Cisticercos.** Se usaron cisticercos de la cepa ORF conservados a través de pases sucesivos de ratón en ratón (BALB/c AnN). Para obtener cisticercos de ratones cisticercosos, se usaron ratones con 2 a 4 meses de infección. Se extrajeron los metacístodos de la cavidad peritoneal y se lavaron en solución salina amortiguadora de fosfatos, pH 7.2 (PBS).

#### 2. Métodos

**Producción de proteínas de fusión.** Las clonas bacterianas transformadas conteniendo los vectores de expresión fueron crecidas en 50 ml de SOB<sub>M</sub>-amp con agitación (175 rpm) a 37°C hasta que llegaron a una  $A_{600} = 0.3$  y se le agregó isopropiltio- $\beta$ -D-galactósido (IPTG) a una concentración final de 1 mM (ver Apéndice A). Después de una hora más de crecimiento en presencia del inductor IPTG se toma una alícuota de 1 ml como muestra, y se infectan las bacterias con el bacteriófago ayudador M13/T7 (a una dosis de 5 unidades formadoras de placas/bacteria) que aporta la polimerasa de T7 necesaria para la producción de transcritos de la proteína de fusión (ver Apéndice A). A partir de ese momento se toman alícuotas de 1 ml a las 2, 4 y 6 h, que se centrifugan durante 2 min y la pastilla de bacterias se resuspende en 200  $\mu$ l de amortiguador de Laemmli y se analiza el nivel de inducción por electroforesis en gel de poliacrilamida con lauryl sulfato (SDS-PAGE, ver *Métodos misceláneos* en sección III.2) comparando las alícuotas a los distintos tiempos con la inicial (antes de la infección con M13/T7).

**Purificación de las proteínas de fusión.** Las proteínas recombinantes expresadas en niveles elevados frecuentemente son tóxicos para la bacteria huésped. Un mecanismo común que utiliza la bacteria es el de insolubilizar las proteínas recombinantes en los llamados cuerpos de inclusión. Este hecho provee una ventaja para la purificación de las proteínas recombinantes ya que se pueden eliminar los componentes bacterianos a base de tratamientos energéticos, para conservar únicamente los cuerpos de inclusión que pueden ser posteriormente solubilizados. La proteína recombinante es prácticamente el único constituyente de los cuerpos de inclusión, por lo que al aislarlos se obtiene la proteína recombinante en forma casi pura. Sin embargo, se incrementa la pureza de la proteína por medio de cromatografía de afinidad a metales (ver *Cromatografía de afinidad a metales* en sección III.2).

Los cuerpos de inclusión fueron purificados a partir de un cultivo de 100 ml de bacterias, transformadas con cada uno de las construcciones de expresión, e inducidas a

expresar la proteína de fusión como se describió anteriormente. El cultivo se centrifuga a 4,000 g, durante 20 min y la pastilla bacteriana se resuspende en 5 ml de 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, con 20% sacarosa y se conserva a 4°C por 20 min. Las bacterias se centrifugan como antes y la pastilla se resuspende en 5 ml de agua bidestilada a 4°C, dejándose incubar por 10 min. La suspensión se centrifuga a 8,000 g durante 15 min y el sedimento se resuspende en 1 ml de PBS, pH 7.2, con 1 mg/ml leupeptina, 0.5 mM de floruro de fenilmetilsulfonil (PMSF) y 20 mg/ml de aprotinina. La suspensión es sonicada 3 veces en hielo con un sonicador de vástago, durante 30 seg a 50 W. Se agregan 130 unidades de RNAasa y 40 mg de DNAasa y se incuba a temperatura ambiente por 10 min. Se agregan 4 ml del amortiguador anterior y se centrifuga a 13,000 g durante 30 min. La pastilla se lava tres veces por resuspensión en 4 ml de PBS pH 7.2, con 25 % sacarosa y 1 % Tritón X-100, seguida por centrifugación a 25,000 g a 4°C durante 20 min. El precipitado se resuspende en 1ml de 50mM Tris-HCl, pH 8, con 5M de cloruro de guanidina, se sonica 5 seg a 50 W y se mantiene la suspensión a 4°C por 60 min. Posteriormente, se centrifuga a 12,000 g, 30min. Finalmente, se incrementa la pureza de las proteínas sometiendo al sobrenadante a la cromatografía de afinidad a metales.

*Cromatografía de afinidad a metales.* Para elevar la pureza de nuestras proteínas recombinantes se empleó la cromatografía de afinidad a metales utilizando las columnas HiTrap™. Esto es posible, ya que las proteínas recombinantes expresadas con pRSET se producen unidas a un péptido de fusión que incluye una secuencia de seis residuos de histidina que le confieren a la proteína de fusión afinidad hacia metales divalentes. Las columnas están formadas por esferas de agarosa altamente entrecruzadas acopladas a un ácido iminodiacético como grupo quelante de cationes divalentes. Por lo cual, la columna cargada con los metales adecuados puede retener selectivamente proteínas que tengan expuestas secuencias de aminoácidos que puedan formar complejos con los grupos cargados, por ejemplo, las seis histidinas de nuestros fragmentos recombinantes.

La columna HiTrap™ se activa con 1 ml de 0.1M de NiSO<sub>4</sub> y después se equilibra en 50 mM Tris-HCl, pH 8, con 5 M de cloruro de guanidina; posteriormente se aplica 1 ml de la proteína recombinante en el mismo amortiguador y se incuba 10 min a 4°C. El material que no se unió a la columna se eluyó pasando 5 ml de 0.5 M de NaCl en PBS (PBS-NaCl) y el material unido con baja afinidad se eluyó con 3 ml de 0.1 M de imidazol en PBS-NaCl. Finalmente, el material unido con alta afinidad fue eluido con 0.05 M de EDTA en PBS-NaCl, después de una incubación de 30 min a 4°C. La mayor parte de la proteína recombinante se obtuvo en el segundo mililitro de elución. Como último paso, la proteína se dializa contra PBS, 0.3 M NaCl, se cuantifica por Lowry y se analiza en SDS-PAGE.

*Electroforesis en gel desnaturizante.* La electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) se realizó siguiendo la descripción de Laemmli (Laemmli *et al.*, 1979). Las bandas se visualizaron tiñéndolas con Amido Negro. Los pesos moleculares de las bandas se calcularon por comparación con proteínas estándares (BioRad).

*Immunización de animales.* Se inmunizaron intraperitonealmente ratones hembras de 6-8 semanas, cepa BALB/c AnN, con la proteína recombinante completa, 20 µg/dosis en PBS-NaCl, sin adyuvante, 3 veces con intervalos de 5-7 días y sacrificados 5-7 días después de la última inmunización. De estos ratones se obtuvo suero y linfocitos, los cuales se utilizaron en ensayos inmunológicos (detección de anticuerpos y transformación blastoide). En el caso de los ensayos de protección los ratones fueron retados 7 días después de la última inmunización.

*Infección.* La infección experimental se realiza inoculando a los ratones en la cavidad peritoneal 10 cisticercos de aproximadamente 2 mm de diámetro, procurando escoger aquellos sin gemas, suspendidos en 200µl de PBS. Los ratones se sacrificaron 90 días después de la infección para realizar los ensayos inmunológicos con suero y linfocitos y a los 45 en los ensayos de protección, se cuentan todos los cisticercos encontrados en la cavidad peritoneal y/o se cuantifica en volumen total de los cisticercos sedimentados en un tubo cónico de 15ml.

*Obtención de sueros.* La sangre se obtiene de la arteria subclavial, se incuba a 37°C por 1h y después a 4°C por toda la noche. Al día siguiente se centrifuga a 10,000g por 10min a 4°C, el suero se recuperó y se repite la centrifugación. Finalmente, el suero se almacena a -20°C.

*Detección de anticuerpos.* Se utilizaron dos métodos inmunoenzimáticos para la detección de anticuerpos (ELISA).

En un método las placas se sensibilizan con 100 µl/pozo del antígeno (0.33 µg/ml de cada uno de los fragmentos (VW2-1, VW3-3, VW4-1)) en un amortiguador de carbonatos (0.29g de NaHCO<sub>3</sub> y 0.59g de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> en 100ml, pH 9.6) por 1 h a 37°C. Posteriormente, se lavan las placas cinco veces con 0.3% de Tween 20 en PBS (PBS-Tween) y se bloquean con albúmina sérica bovina (BSA) al 1% en PBS-Tween por 1 h a 37°C. Después de lavarse nuevamente con PBS-Tween (ver arriba), se incuban con sueros de ratones normales, inmunizados e infectados (100 µl/pozo), diluidos en PBS-Tween con BSA (ver arriba), por 30min a 37°C. Posteriormente, se lavan nuevamente con PBS-Tween (ver arriba) y se incuban 30min a 37°C con anticuerpo de cabra anti-IgG, IgD, IgG e IgM de ratón unido covalentemente a peroxidasa (α-ratón-HPRT), diluido 1:1000 en PBS-Tween y BSA al 1%. Posteriormente, las placas son nuevamente lavadas con PBS-Tween y se les agrega 100 µl/pozo de dihidrocloruro de o-fenilendiamina (OPD, 0.4 mg/ml) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0.04% en amortiguador de citratos (ácido cítrico 24.3mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 51.4mM, pH 5) por 10min. Finalmente, se detiene la reacción con 50 µl/pozo de 2.5N de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. La reacción se analiza a una A<sub>490</sub> en un lector de ELISA.

El segundo método usado para la detección de anticuerpos es el ELISA de sandwich. Aquí primero se sensibiliza la placa de ELISA con 100 µl/pozo de un anticuerpo de pollo o conejo dirigido única y específicamente contra el péptido de fusión de las proteínas recombinantes que permite la purificación por cromatografía de afinidad a metales (ver *Purificación de las proteínas de fusión* en sección III. 2), diluido 1:500 en amortiguador de carbonatos (ver arriba), 1h a 37°C. Después de lavarse cinco veces con PBS-Tween, se bloquea la placa con 100 µl/pozo de PBS-Tween con BSA (ver arriba) por 1 h a 37°C y se

agrega cada uno de los fragmentos recombinantes (VW2-1, VW3-3 y VW4-1) en cantidades aproximadamente equimolares de cada uno de ellos diluidos en PBS-Tween con BSA, con la cantidad de proteína ajustada de acuerdo al análisis de aminoácidos (ver *Análisis de aminoácidos* en sección III.2) y se incuba 30min a 37°C. Después, nuevamente se lava con PBS-Tween. Finalmente, se realizan los pasos de incubación con los sueros, el anticuerpo  $\alpha$ -ratón-HPRT y revelado con OPD y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, tal y como previamente se describió en el anterior ensayo de ELISA (ver arriba).

Para la detección de complejos inmunes paramiosina- $\alpha$ -rTPmy se siguió el siguiente protocolo. Primero se incubó la placa para ELISA a 4°C por toda la noche con una solución de anticuerpo  $\alpha$ -TPmy (300  $\mu$ g/ml) obtenido de conejo en amortiguador de carbonatos (ver arriba). Después, se lavó cinco veces con PBS-TWEEN, se bloqueó con PBS-TWEEN más BSA, y se lavó cinco veces más (ver arriba). Posteriormente, se incubó con sueros de ratones infectados y controles (sin infectar) diluidos 1:10 con PBS-TWEEN más BSA por 1h a 37°C. Finalmente, se lavaron las placas, se incubaron con el  $\alpha$ -ratón-HPRT diluido 1:1000 y se revelaron con OPD y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, tal y como anteriormente se describió.

*Análisis de aminoácidos.* El análisis de aminoácidos de cada una de los fragmentos recombinantes se realizó a cargo del laboratorio del Dr. Lourival Possani. Con estas estimaciones se realizaron los calculos para emplear cantidades aproximadamente equimolares de cada una de las proteínas recombinantes en los ensayos inmunológicos.

*Ensayos de proliferación celular.* Se realizaron ensayos de proliferación celular con dos poblaciones diferentes: células mononucleares totales de bazo y con linfocitos T purificados del mismo órgano.

Para los ensayos de proliferación de células mononucleares totales de bazo las células se obtuvieron del bazo de ratones controles, inmunizados e infectados por medio de la disgregación del tejido con malla metálica en RPMI-1640 suplementado al 10% con suero fetal bovino (RPMI suplementado). Después, el disgregado en suspensión se deposita en un tubo cónico y se incuba 20min a 4°C para permitir que se sedimenten los restos del tejido. Posteriormente, el sedimento se descartó y la suspensión celular se centrifuga a 200 g por 10 min a 4°C. El sedimento se resuspende y se incuba 10min a 4°C en 3 ml de una solución hemolizante (KHCO<sub>3</sub> 0.01M, NH<sub>4</sub>Cl 0.15M, EDTA tetra sódico 0.01mM) para eliminar a los eritrocitos. Después se le agrega 15 ml de RPMI-1640 suplementado y se centrifuga a 200 g por 10 min a 4°C. Posteriormente, el sobrenadante se descarta y las células mononucleares se resuspenden en 5 ml de RPMI suplementado y se toma una alícuota para contar la células viables en una cámara de Neubauer por medio de la exclusión del colorante azul tripano. Posteriormente, las células mononucleares se siembran en una caja de cultivo de 96 pozos depositando, en 100  $\mu$ l, 500 000 células/pozo. Después de esto, se agregan 100  $\mu$ l de cada proteína recombinante o mitógeno a diferentes concentraciones. La caja se deja incubando a 37°C, con humedad a saturación y conteniendo 5% de CO<sub>2</sub>. De 18-24 h antes de cosechar los cultivos se agrega 1  $\mu$ Ci/pozo de <sup>3</sup>H-timidina. Después, las células se cosechan sobre papel de fibra de vidrio mediante un cosechador automático. Finalmente, el papel de fibra de vidrio se coloca en viales para centelleo, los cuales contenían 5ml de

líquido de centelleo y se mide la incorporación de marca radiactiva en un contador de centelleo.

Para realizar los ensayos de proliferación de linfocitos T, se obtiene una suspensión de células mononucleares totales de bazo con el mismo protocolo descrito anteriormente (ver arriba). Después, para eliminar los linfocitos B de nuestra suspensión de células se empleó el método de "Panning". En este método se incubó anticuerpo anti-IgG, IgD, IgA e IgM de ratón ( $\alpha$ -ratón), 0.1 mg/ml, en una caja Petri, toda la noche a 4°C. Después se lava la caja tres veces con PBS y se le agrega la suspensión de células mononucleares purificadas de bazo de ratón y se deja incubando 30 min a 37°C; posteriormente se resuspenden las células agitando suavemente la caja por 30 seg para después decantarlas en otra caja Petri sensibilizada de la misma manera con anticuerpos y repetir las incubaciones dos veces más. Esta serie de incubaciones permite separar linfocitos T de los B porque los linfocitos B tienden a permanecer unidos a la caja por la unión de sus inmunoglobulinas de superficie a los anticuerpos pegados a la caja. Finalmente, las células recuperadas de las tres incubaciones se centrifugan a 200 g por 10 min a 4°C, se resuspenden en RPMI suplementado y se cuentan.

Posteriormente, los linfocitos T se siembran en una placa de 96 pozos depositando 250,000 células/pozo. Estos cultivos fueron suplementados con células de bazo adherentes al plástico como células presentadoras de antígeno (APC). Éstas se incubaron con los fragmentos recombinantes 24 h antes de agregarse los linfocitos T debido a que esta preincubación incrementa las cuentas incorporadas durante los ensayos.

## IV. Resultados

### 1. Expresión de las proteínas recombinantes

Para obtener la proteína completa y fragmentos de TPmy se partió de bacterias transformadas con las construcciones de expresión previamente usadas en mi proyecto de tesis de licenciatura (Vázquez, J., 1993). Estas construcciones se realizaron sintetizando ocho oligonucleótidos (Tabla. II, Fig. 12 y Fig. 14), diseñados a partir de la secuencia ya conocida (Landa *et al.*, 1993) de la TPmy para iniciar la amplificación por PCR, de tres fragmentos del gen de la paramiosina así como de la secuencia completa (Fig. 14), utilizando como templado clonas de cDNA conteniendo la región codificadora completa del TPmy (Landa *et al.*, 1992; 1993). Cada oligonucleótido tenía, además, un sitio de restricción para facilitar su posterior ligación al vector de expresión pRSET (ver Apéndice A), nótese que los oligonucleótidos que inician en el extremo 5' tienen incluido un sitio de restricción *Eco RI*, mientras que los usados para iniciar en los extremos 3' de los fragmentos poseen un sitio *Hind III*, para conseguir la orientación correcta. Una vez amplificados y purificados los productos de PCR por técnicas convencionales (Vázquez, J., 1993), se digirieron con enzimas de restricción y se ligaron al vector de expresión.

Para la construcción de expresión de la secuencia completa de la TPmy, se utilizaron los oligonucleótidos TPmy-X1 y TPmy-X2. Para la expresión del fragmento VW2-1 se usaron los oligonucleótidos TPmy-X1 y TPmy-X6; para el fragmento VW3-3, TPmy-X4 y TPmy-X7 y para el VW4-1, TPmy-X5 y TPmy-X2 (Tabla. II, Fig. 12 y Fig. 14). Las construcciones de expresión recombinante fueron designadas de acuerdo al consecutivo de dos letras y dos números que se lleva en el laboratorio (Fig 14). La construcción VW7-3 expresa la proteína completa de 863 aminoácidos (nucleótido 1 al 2589). La construcción VW2-1 expresa el fragmento amino-terminal de 268 aminoácidos (nucleótidos 1 al 804). La construcción VW3-3 expresa el fragmento medio de 283 aminoácidos (nucleótidos 805 al 1653). Finalmente, la construcción VW4-1, contiene el carboxilo-terminal con 312 aminoácidos (nucleótidos 1654 al 2589). Todas las construcciones de expresión fueron introducidas en *E. coli* para expresar los fragmentos recombinantes por procedimientos previamente descritos (ver sección III.2, Apéndice A y Vázquez, J. 1993).

Previamente, se había determinado la cinética de la expresión para cada proteína recombinante. Se encontró que la máxima expresión se alcanza a las 4 h de inducción para las clonas VW2-1 y VW3-3, y de 6 h para las clonas VW4-1 y VW7-3, después de la adición del bacteriófago ayudador M13/T7. Para ello, se crecieron las colonias de bacterias transformadas con cada construcción de expresión (VW 2-1, VW 3-3, VW 4-1 y VW 7-3) en 100 ml de medio SOBm con ampicilina y se les agregó IPTG y el bacteriófago ayudador para inducir la expresión de la polimerasa T7, que a su vez transcribe las secuencias de las proteínas recombinantes (ver *Producción de proteínas de fusión* sección III.2). En paralelo se crecieron bacterias sin transformar para utilizarlas como control negativo de inducción. Finalmente, los cultivos fueron cosechados en el tiempo en el cual se alcanza el máximo nivel de expresión. Estas bacterias cosechadas fueron utilizadas después para la purificación de las proteínas recombinantes.

Tabla II. Oligonucleótidos sintetizados para las construcciones de expresión. El subrayado en la secuencia muestra la posición de los sitios de restricción (*Eco RI*, GAATTC; *Hind III*, AAGCTT) introducidos para la subclonación en pRSET.

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

## 2. Purificación de las proteínas recombinantes

Las clonas que expresaron proteína inducible en altos niveles fueron utilizadas para la purificación de los péptidos recombinantes de TPmy. Después de algunas pruebas iniciales se encontró que la mayor parte de la proteína recombinante se encontraba en los llamados cuerpos de inclusión de las bacterias; esto es común tratándose de proteínas ajenas expresadas en altos niveles por las bacterias. Consecuentemente, se purificaron los cuerpos de inclusión bacterianos lisando las células con un choque hipotónico y sonicación. Los cuerpos de inclusión se lavan varias veces para deshacerse de los restos celulares con una solución que contiene Tritón X-100. Finalmente, los cuerpos de inclusión se solubilizan con cloruro de guanidina.

Un segundo paso de purificación de las proteínas recombinantes se llevó a cabo por cromatografía de afinidad a metales con columnas HiTrap™. Las proteínas recombinantes expresadas con pRSET se producen unidas a un péptido de fusión que incluye una secuencia de seis residuos de histidina, que le confiere al producto de fusión, afinidad hacia metales divalentes. Además, las columnas HiTrap™ están formadas por esferas de agarosa altamente entrecruzadas acopladas a un ácido iminodiacético como grupo quelante. Por lo cual, la columna puede ser cargada con los metales divalentes adecuados, para retener selectivamente sólo proteínas que tengan expuestas secuencias de aminoácidos con la capacidad de formar complejos con los metales divalentes (por ejemplo, las proteínas recombinantes). La columna primero se activa con NiSO<sub>4</sub> para después aplicar el sobrenadante de los cuerpos de inclusión. Es necesario que la proteína se encuentre desnaturada por un agente como la guanidina para permitir la exposición de los residuos de histidina del péptido de fusión. Se asegura también que sólo se unan las proteínas con afinidad a metales divalentes. En nuestro caso encontramos que el empleo de guanidina 4M disminuye significativamente los niveles de contaminantes proteicos bacterianos en la

cromatografía de afinidad a metales. Es también conveniente hacer un prelavado con imidazol para eluir el material unido con baja afinidad a la columna. Las proteínas recombinantes unidas fuertemente a la columna se eluyen con EDTA, el cual libera el níquel de la columna debido a su mayor capacidad quelante. En este paso, los ensayos iniciales nos indicaron que la incubación por 30 min a 4°C permite obtener el 90% de la proteína en el volumen de exclusión. Como último paso, la proteína se dializa contra PBS, 0.3 M NaCl para eliminar el NiSO<sub>4</sub> y el EDTA de las muestras. El NiSO<sub>4</sub> debe ser posteriormente eliminado por diálisis puesto que puede afectar procesos inmunológicos. Se sabe que puede causar hipersensibilidad cutánea de tipo tardío en humano y ratón, induce la expresión de moléculas de adhesión como ICAM o VCAM e interleucinas tales como IL-6 e IL-8 en células endoteliales (Silvenoinen-Kassinen, et al, 1989; Kapsenberg, et al, 1992; Ishii, et al, 1994; Goebeler, et al. 1993; Goebeler, et al. 1995). El EDTA también debe ser dializado, ya que afecta la proliferación celular de los cultivos debido a que muchas enzimas requieren de cationes divalentes.

La figura 15 muestra el gel de las proteínas de fusión purificadas. En todos los casos se alcanza una pureza superior al 95%, por lo que se consideró suficiente para ser usadas en los ensayos de inmunización, proliferación celular y ELISA. Cabe mencionar que el rendimiento de producción de las proteínas recombinantes fue variable entre 0.35 a 1.5 mg/500 ml de cultivo bacteriano.

### 3. Ensayos de ELISA

Se inmunizaron ratones hembras BALB/c con la proteína recombinante VW7-3, por una triple inyección intraperitoneal, cada 7 días, inyectando 20 µg cada vez. Una semana después de la última inmunización, los animales fueron sacrificados y se obtuvo el suero y el bazo de cada ratón. Los sueros se usaron para determinar los niveles de anticuerpos en contra de VW7-3 y de cada uno de los fragmentos de TPmy en ensayos de ELISA, mientras que las células mononucleares del bazo se emplearon en ensayos de proliferación (ver abajo).

Inicialmente, las placas de ELISA con 96 pozos fueron sensibilizadas con las proteínas recombinantes (VW2-1, VW3-3 y VW4-1), adicionando 40 ng/pozo, en amortiguador de carbonatos. Posteriormente, se adicionaron los sueros de los ratones normales e inmunizados y los anticuerpos dirigidos contra cada fragmento se detectaron por medio de un anticuerpo α-ratón-HPRT. Finalmente, se agregaba la solución reveladora y la reacción se medía en un lector de placas de ELISA. Se encontró que los sueros α-rTPmy reconocen preferentemente los tercios central (VW3-3) y carboxilo (VW4-1), mientras que el tercio amino (VW2-1) fue el menos reconocido (Fig. 16).

Sin embargo, considerando que la cantidad de cada fragmento recombinante adsorbido a los pozos de la caja de ELISA pudiera ser diferente, afectando la interpretación de los resultados del ensayo anterior, se decidió iniciar ensayos subsecuentes, sensibilizando la placa de ELISA con un anticuerpo que reconoce el péptido de fusión (que aporta la afinidad a metales), común a todos los fragmentos recombinantes (ver *Detección de anticuerpos* en sección III. 2.). Puesto que todos los pozos de la placa de ELISA se

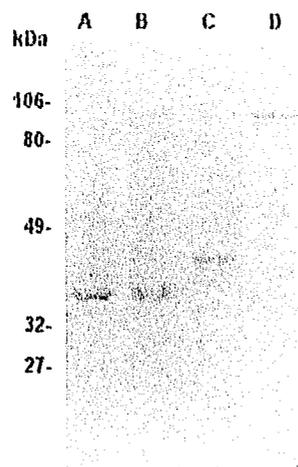


Figura 15. Purificación de los péptidos recombinantes del AgB. Los carriles contienen muestras semipuras de los péptidos recombinantes corridos en geles de poliacrilamida con SDS. A: fragmento recombinante VW 2-1, B: fragmento recombinante VW 3-3, C: fragmento recombinante VW 4-1 y D: proteína recombinante completa VW 7-3.

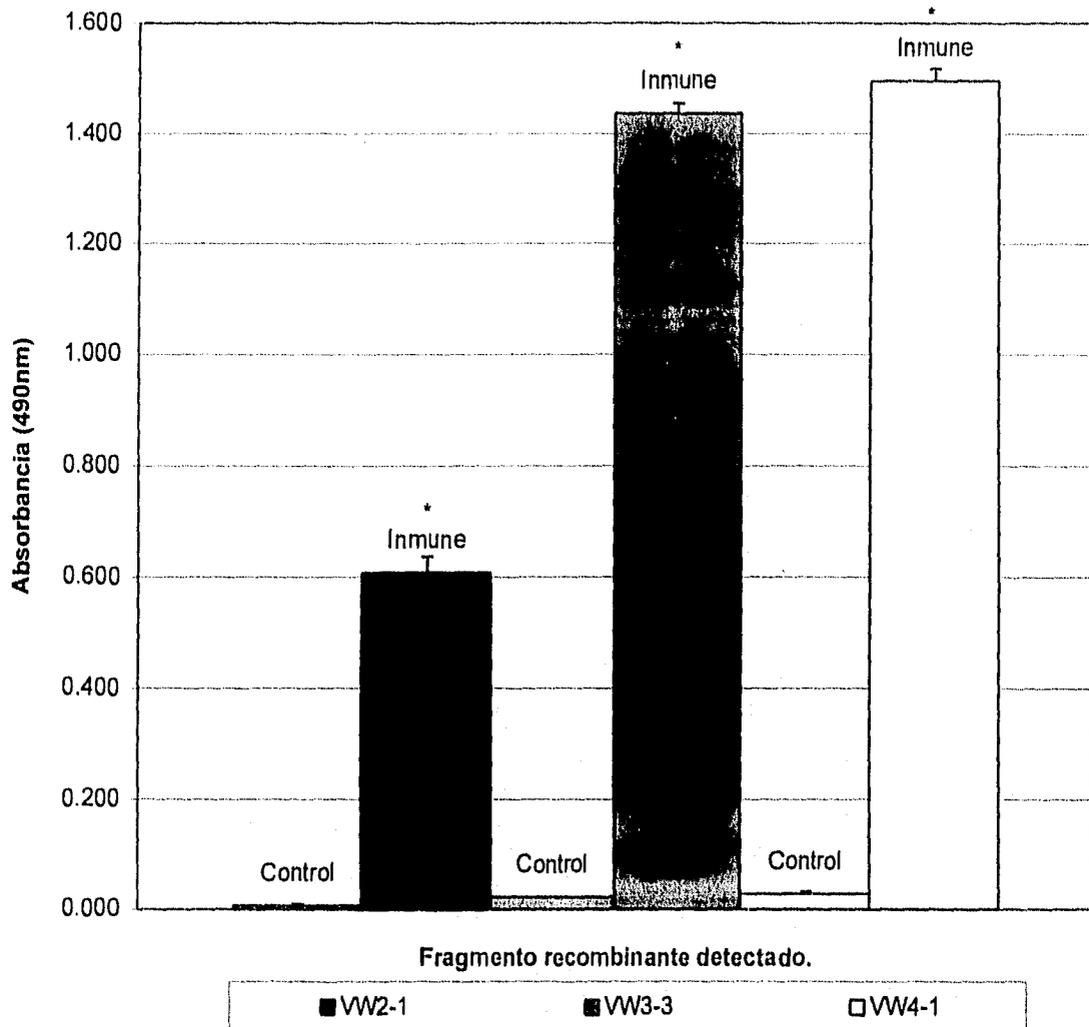


Figura 16. Reconocimiento de los fragmentos recombinantes de TPmy por anticuerpos en suero inmune de ratón. Placas de ELISA sensibilizadas con las proteínas recombinantes (VW2-1, VW3-3 y VW4-1) se incubaron con suero de ratones controles y suero de ratones inmunizados con la proteína recombinante VW7-3, diluidos 1:200. Los anticuerpos dirigidos contra cada fragmento se detectaron por medio de anticuerpos anti-ratón-HPRT. El asterisco indica una  $p < \alpha = 0.05$  en la prueba t de student respecto al control.

sensibilizan con una sola dilución del anticuerpo, en todos los pozos hay cantidades iguales de paratopos capaces de unir al péptido de fusión. Después, se agregan cada uno de los fragmentos recombinantes (VW2-1, VW3-3 y VW4-1) en cantidades equimolares de cada uno de ellos y en concentraciones saturantes. De este modo se asegura que se une el mismo número de moléculas de cada una de los fragmentos recombinantes a cada pozo. El resto del ensayo de ELISA se realiza como se describe arriba. Como se muestra en la figura 17, los tercios carboxilo terminal (VW4-1) y central (VW3-3) fueron reconocidos por el suero inmune, mientras que el suero inmune reaccionó igual que el control contra el fragmento amino terminal (VW2-1). También encontramos que los niveles de anticuerpos contra cada fragmento fueron menores a los detectados en el ensayo anterior (comparar Fig. 16 y Fig. 17).

También se analizó el patrón de reconocimiento de los fragmentos recombinantes por anticuerpos de ratones infectados por *T. crassiceps*. Para ello, se realizaron ensayos de ELISA con sueros de ratones infectados, detectándose niveles muy bajos de anticuerpos  $\alpha$ -TPmy (Fig. 18). Puesto que la TPmy es un antígeno inmunodominante, los bajos niveles de anticuerpos circulantes sugirieron que podrían estar bloqueados por TPmy liberada por los cisticercos de *T. crassiceps*, ya que los sueros procedían de ratones altamente parasitados (5 ml de cisticercos/ratón). Un nivel elevado de TPmy circulante podría bloquear la mayor parte de los anticuerpos producidos por el ratón, formando complejos inmunes. La detección de complejos inmunes de anticuerpo y paramiosina en el suero de los ratones infectados por *T. crassiceps* se llevó a cabo en ensayos de ELISA sensibilizando los pozos de la placa con anticuerpos  $\alpha$ -TPmy en conejo. Posteriormente, se incubaron los sueros de los ratones infectados para atrapar la TPmy (libre o formando complejos inmunes) a través de algún epitopo expuesto. Finalmente, se usaron anticuerpos  $\alpha$ -ratón-HRPT (dirigidos en contra de todas las clases de inmunoglobulinas de ratón, exceptuando IgE) para determinar si se había unido inmunoglobulina de ratón a través de la paramiosina. Los resultados mostraron la presencia de complejos inmunes de TPmy (Fig. 19). Sin embargo, el control también mostró cierto reconocimiento, el cual no fue una consecuencia de la reacción cruzada entre el  $\alpha$ -TPmy de conejo y los anticuerpos  $\alpha$ -ratón-HRPT.

#### 4. Ensayos de proliferación de linfocitos.

Para caracterizar hacia qué región de la TPmy se dirige la respuesta inmune celular de ratones inmunizados con TPmy recombinante completa (VW7-3), los ratones fueron inmunizados tres veces como se describió antes, una semana después de la tercera inmunización fueron sacrificados para obtener las células mononucleares del bazo. Con estas células se realizaron ensayos de proliferación celular estimulando los cultivos con cada una de las proteínas recombinantes (VW7-3, VW2-1, VW3-3, VW4-1). La proliferación inducida por cada fragmento recombinante se cuantificó evaluando la incorporación de  $^3\text{H}$ -timidina. En todos los casos, se adicionaron diferentes cantidades de producto recombinante para determinar la concentración óptima de estimulación. Las células fueron cosechadas después de tres y cinco días de estimulación.

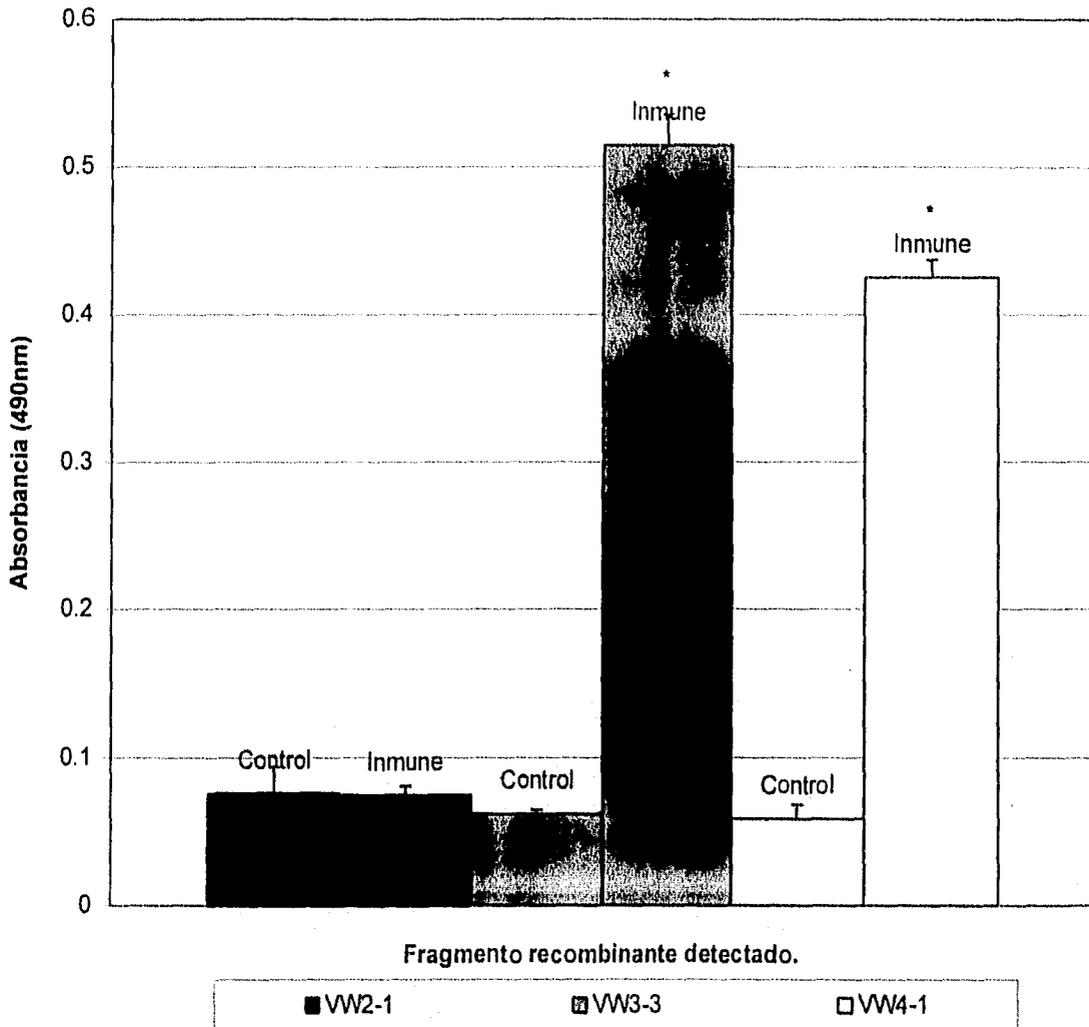


Figura 17. Reconocimiento de los fragmentos recombinantes de TPmy por anticuerpos en suero inmune de ratón. Placas de ELISA sensibilizadas con anticuerpos que reconocen el péptido de fusión se incubaron con las proteínas recombinantes (VW2-1, VW3-3 y VW4-1) en cantidades equimolares de cada uno de ellos y en concentraciones saturantes. Posteriormente se agregó suero de ratones controles y suero de ratones inmunizados con la proteína recombinante VW7-3, diluidos 1:100. Los anticuerpos dirigidos contra cada fragmento se detectaron por medio de anticuerpos anti-ratón-HPRT. El asterisco indica una  $p < 0.05$  en la prueba t de student respecto al control.

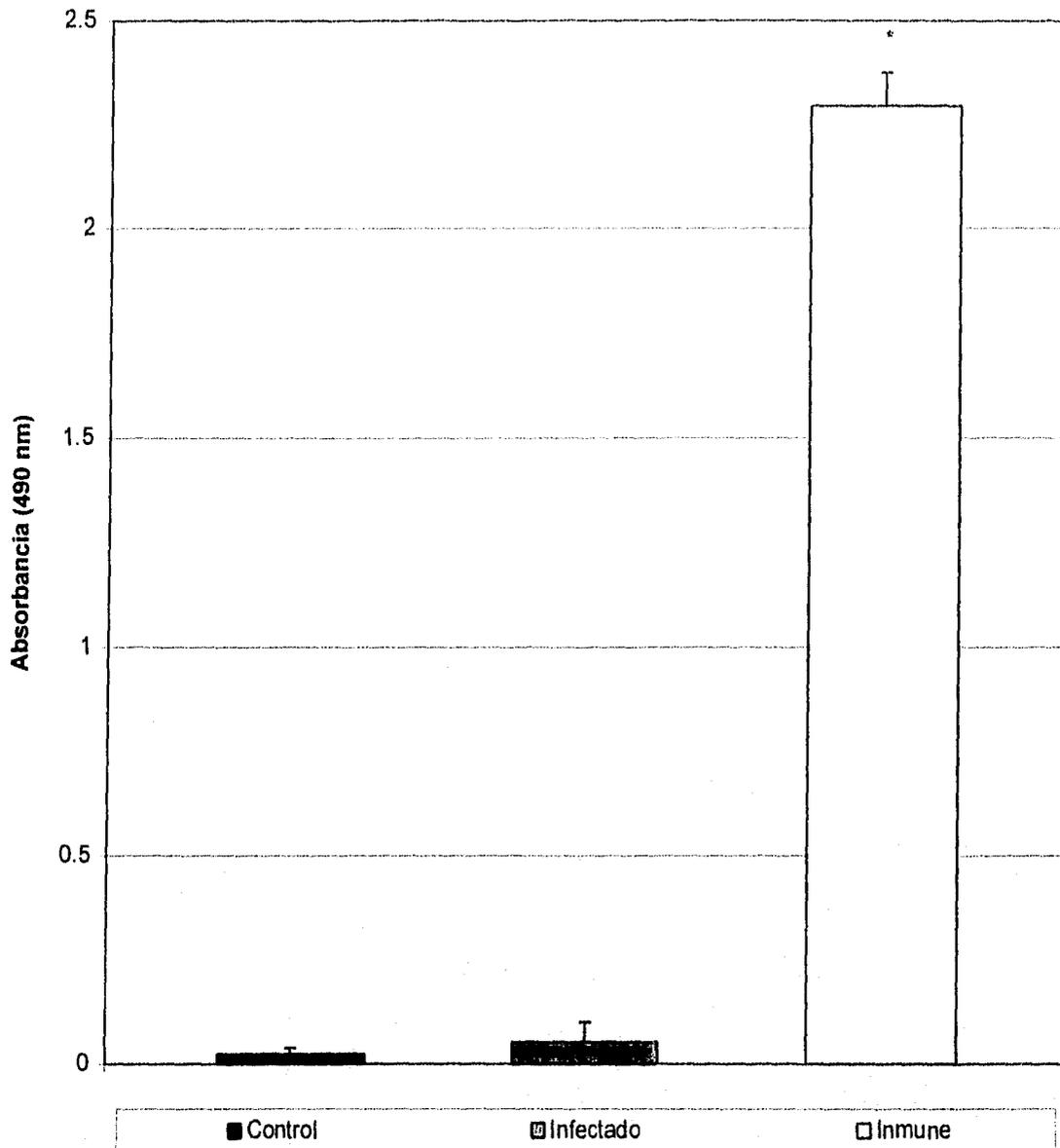


Figura 18. Reconocimiento de la proteína recombinante VW7-3 por anticuerpos en suero de ratones infectados con *T. crassiceps*. Placas de ELISA sensibilizadas con la proteína recombinante VW7-3 se incubaron con suero de ratones controles, de ratones infectados y de ratones Inmunizados con la proteína recombinante VW7-3, diluidos 1:100. Los anticuerpos dirigidos contra la proteína recombinante se detectaron por medio de anticuerpos anti-ratón-HPRT. El asterisco indica una  $p < 0.05$  en la prueba t de student respecto al control.

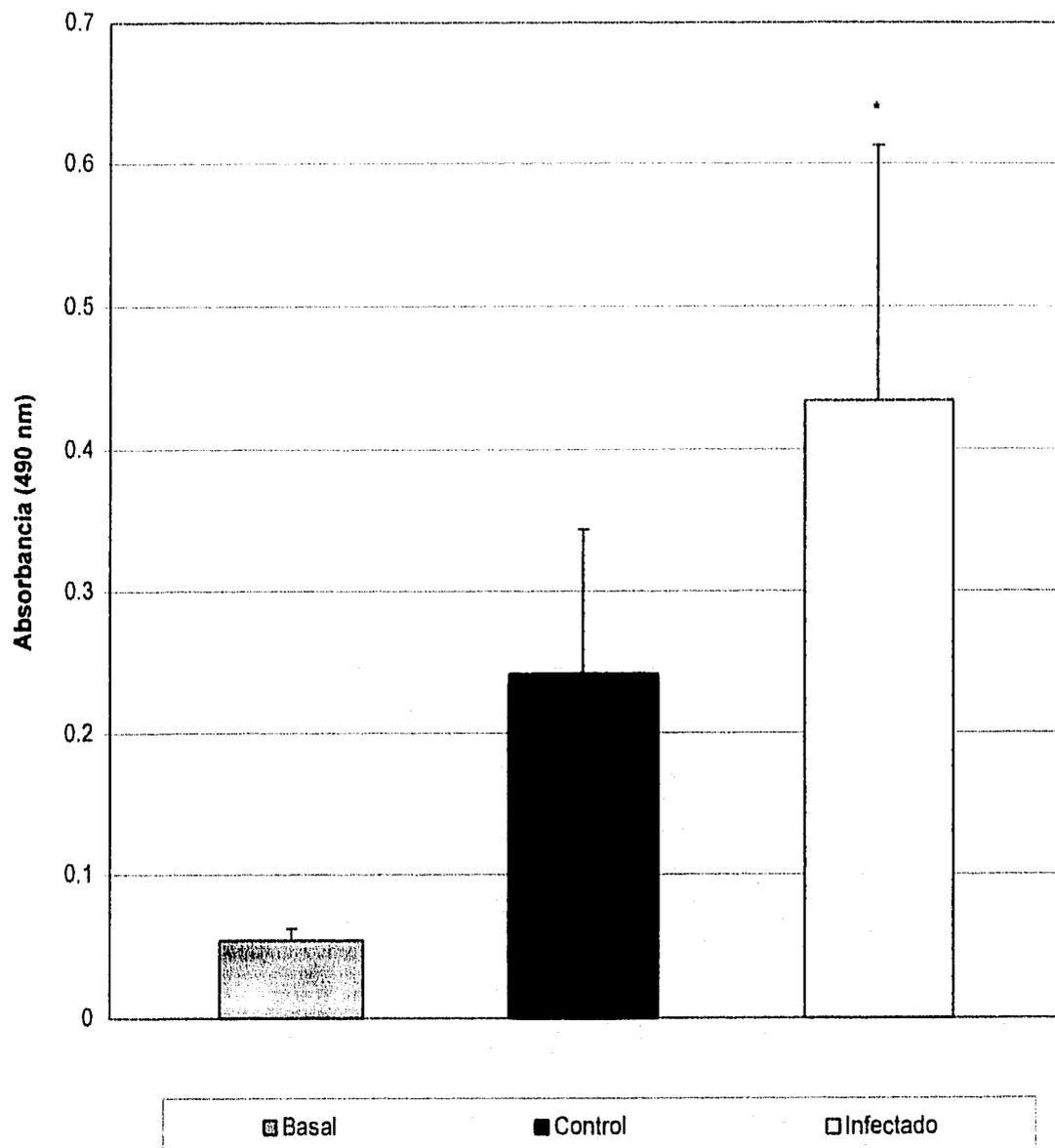


Figura 19. Detección de complejos inmunes de anticuerpo y paramiosina en el suero de ratones infectados con *T. crassiceps*. Placas de ELISA sensibilizadas con anticuerpos alfa-TPmy de conejo se incubaron con los sueros de los ratones infectados para atrapar la TPmy (libre o formando complejos inmunes). Posteriormente se usaron anticuerpos anti-ratón-HPRT para determinar si se había unido inmunoglobulina de ratón a través de la paramiosina. Basal=anti-TPmy+anti-ratón-HPRT. El asterisco indica una  $p < 0.05$  en la prueba t de student respecto al control.

En la figura 20 se puede ver que a los tres días de cultivo los máximos niveles de proliferación se obtuvieron con 60-130 pmolas/ml de la proteína recombinante VW7-3 y con 130 pmolas/ml del fragmento VW4-1. Los fragmentos VW2-1 y VW3-3 tuvieron su máximo con 130 pmolas/ml. Aunque se incrementa la proliferación de los linfocitos inmunes a mayores dosis de los fragmentos recombinantes, también se observa un incremento muy similar en los linfocitos de controles. Este comportamiento da como resultado un perfil muy similar entre los tres fragmentos y permite sugerir que no hay ninguna preferencia hacia algún fragmento en particular en cultivos de 3 días.

A los cinco días de cultivo (Fig. 21) los máximos niveles de proliferación se obtuvieron con 60-130 pmolas/ml de la proteína recombinante VW7-3 y el fragmento VW4-1 desencadenó los mayores niveles cuando se empleó a una concentración de 60-130 pmolas/ml, mientras que los fragmentos VW2-1 y VW3-3 tuvieron su máximo con 130 pmolas/ml. Ahora, la proliferación inducida por los fragmentos VW2-1 y VW3-3, con cada una de las dosis fue muy similar entre inmunes y controles. Sin embargo, la proliferación inducida con el fragmento VW4-1 no mantuvo un nivel ni un patrón similar al de los otros fragmentos. Al estimular con dosis de 6 pmolas/ml y más claramente con 60 pmolas/ml de VW4-1 a los linfocitos inmunes, se detectaron mayores niveles de proliferación que con las dosis correspondientes de los otros fragmentos, mientras que no se detectaron diferencias obvias entre la proliferación de los linfocitos controles contra cada fragmento (VW2-1, VW3-3, VW4-1). Este análisis sugiere que hay respuesta celular preferencial contra el fragmento recombinante VW4-1, después de cinco días de cultivo.

Otra observación es que la proliferación de los linfocitos de ratones inmunes sin proteína recombinante es mayor que la de los controles correspondientes. Pensamos que esto puede deberse al estado previamente activado de los linfocitos de ratones inmunizados.

Los ensayos de proliferación mostraron también una elevada proliferación de las células de los ratones controles (inmunizados con solución salina), lo que hizo pensar que las proteínas recombinantes purificadas de *E. coli*, podrían contener cantidades pequeñas de lipopolisacáridos (LPS), con actividad mitogénica para linfocitos B murinos. Para eliminar a los linfocitos B de nuestros ensayos de proliferación se siguió un método de inmuno afinidad ("panning"), que se basa en la remoción de las células B por incubación de la suspensión de células totales en una caja Petri con anticuerpos anti-inmunoglobulinas de ratón fijados a la superficie. Los linfocitos B se unen a la superficie de la caja por los anticuerpos y los linfocitos T se recuperan como células no-adherentes (ver *Ensayos de proliferación celular* en la sección III.2). Con la población enriquecida de linfocitos T se procedió a realizar nuevos experimentos de proliferación con los fragmentos recombinantes. En contraste con los ensayos anteriores, la mayor proliferación se alcanzó con 6 pmolas/ml de la proteína recombinante VW7-3 y sólo con 60 pmolas/ml del fragmento amino terminal (VW2-1) los linfocitos de los ratones inmunes proliferaron más que los controles, después de tres días de cultivo (Fig. 22).

Paralelamente, estas poblaciones eran estimuladas con ConA y LPS para evaluar la eficiencia del método de purificación y como se puede ver en la figura 23 la población enriquecida en linfocitos T respondió en manera aceptable a la ConA (mitógeno específico para linfocitos T) y no respondió a la estimulación con LPS (mitógenos específicos de

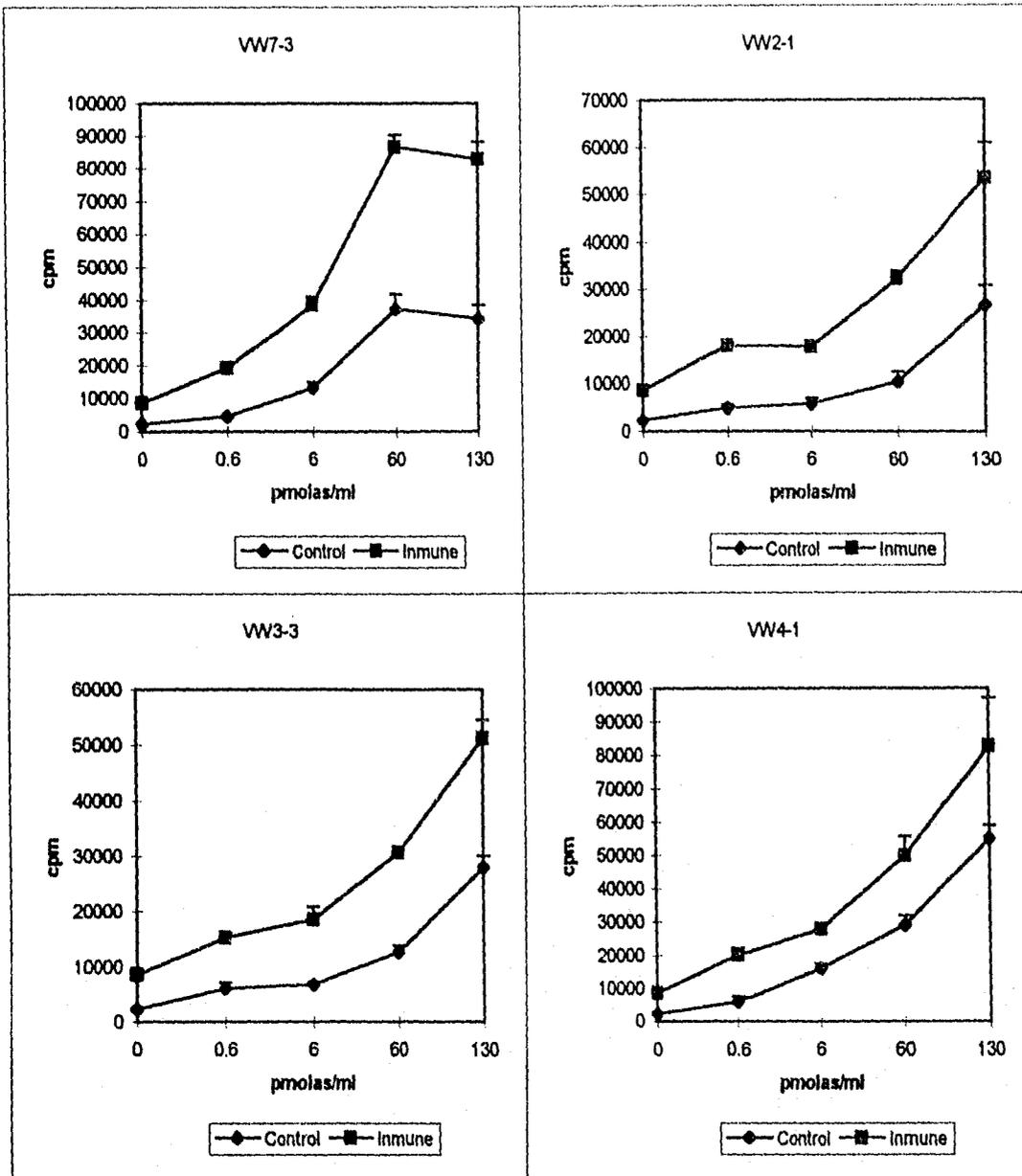


Figura 20. Estimulación de linfocitos murinos con fragmentos recombinantes de la TPmy. Células mononucleares de bazo de ratones inmunizados con la proteína recombinante VW7-3 fueron estimuladas por tres días con cada una de la proteínas recombinantes (VW2-1, VW3-3, VW4-1 y VW7-3). La proliferación inducida por cada proteína recombinante se cuantificó evaluando la incorporación de  $[^3\text{H}]$ - timidina. Todos los puntos correspondientes a la estimulación con proteína recombinante de los linfocitos de los ratones inmunizados tuvieron una  $p < 0.05$  en la prueba t de student respecto a la proliferación de los ratones controles.

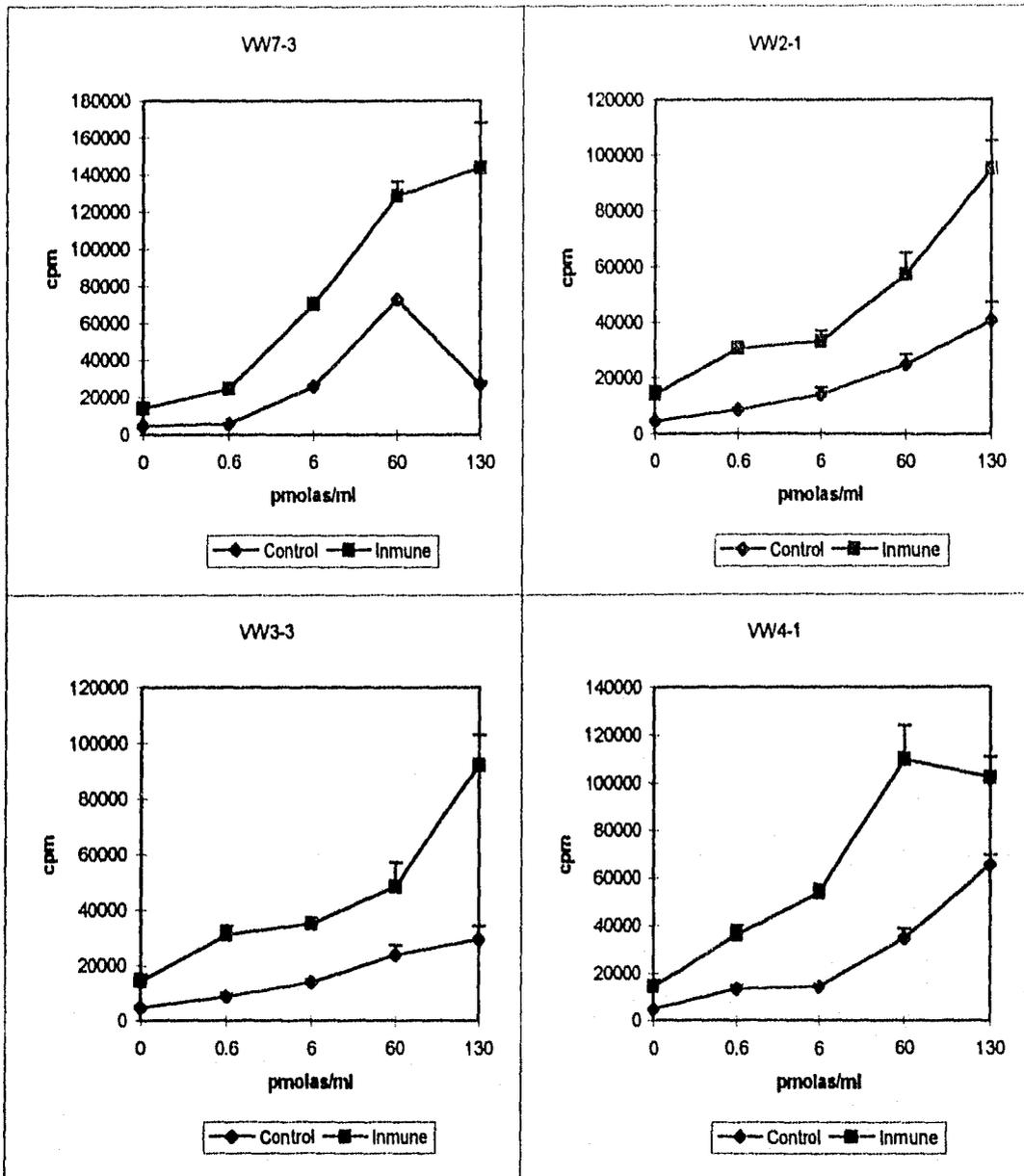


Figura 21. Estimulación de linfocitos murinos con fragmentos recombinantes de la TPmy. Células mononucleares de bazo de ratones inmunizados con la proteína recombinante VW7-3 fueron estimuladas por cinco días con cada una de la proteínas recombinantes (VW2-1, VW3-3, VW4-1 y VW7-3). La proliferación inducida por cada proteína recombinante se cuantificó evaluando la incorporación de [<sup>3</sup>H]-timidina. Todos los puntos correspondientes a la estimulación con proteína recombinante de los linfocitos de los ratones inmunizados tuvieron una  $p < 0.05$  en la prueba t de student respecto a la proliferación de los ratones controles.

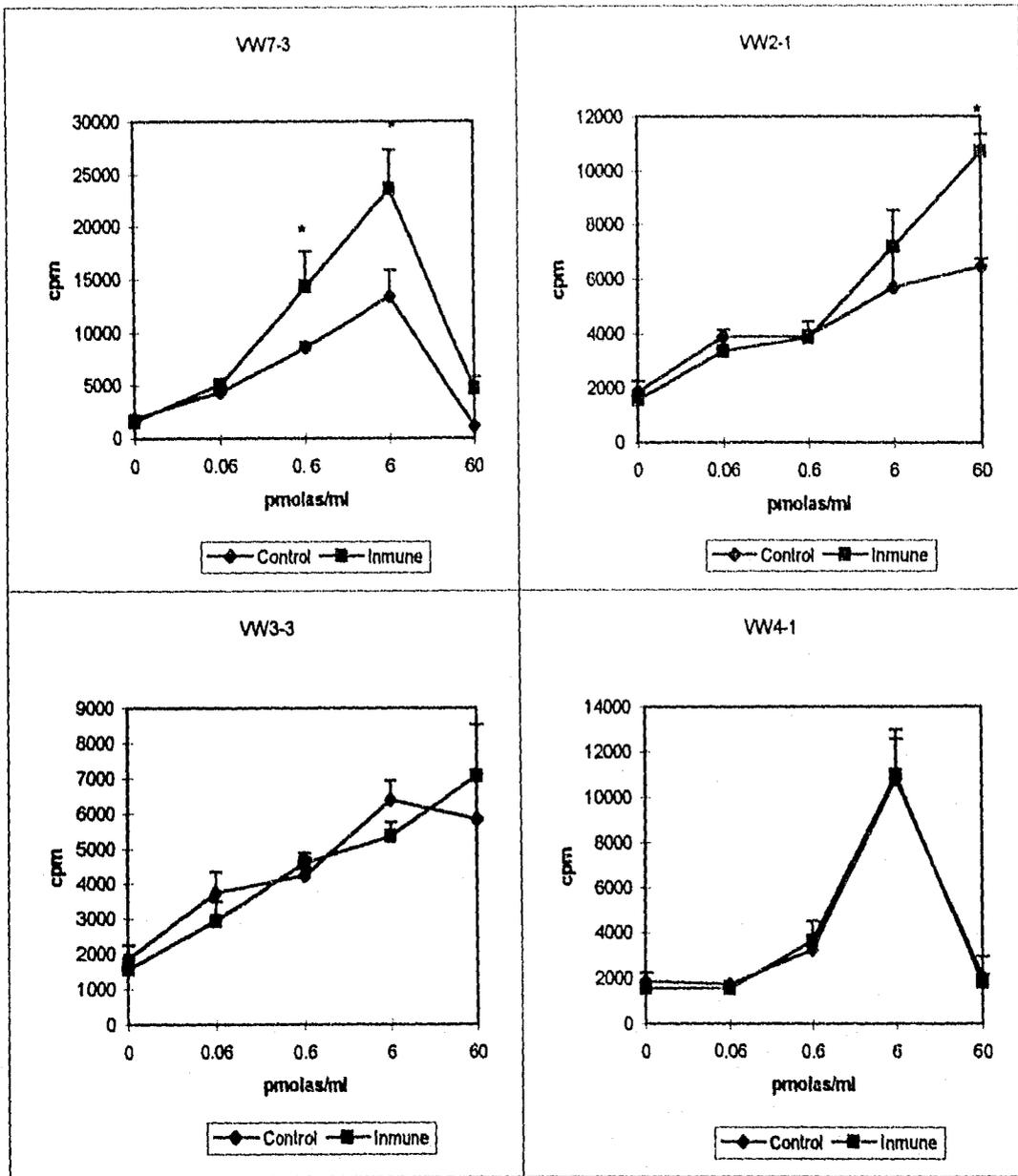


Figura 22. Estimulación de linfocitos T murinos con fragmentos recombinantes de TPmy. Linfocitos T de bazo purificados por el método de "Panning" de ratones inmunizados con la proteína recombinante VW7-3 fueron estimulados por tres días con cada una de las proteínas recombinantes (VW2-1, VW3-3, VW4-1 y VW7-3). La proliferación inducida por cada fragmento recombinante se cuantificó evaluando la incorporación de [<sup>3</sup>H]timidina. El asterisco indica una  $p < 0.05$  en la prueba t de student respecto a la proliferación de los ratones controles.

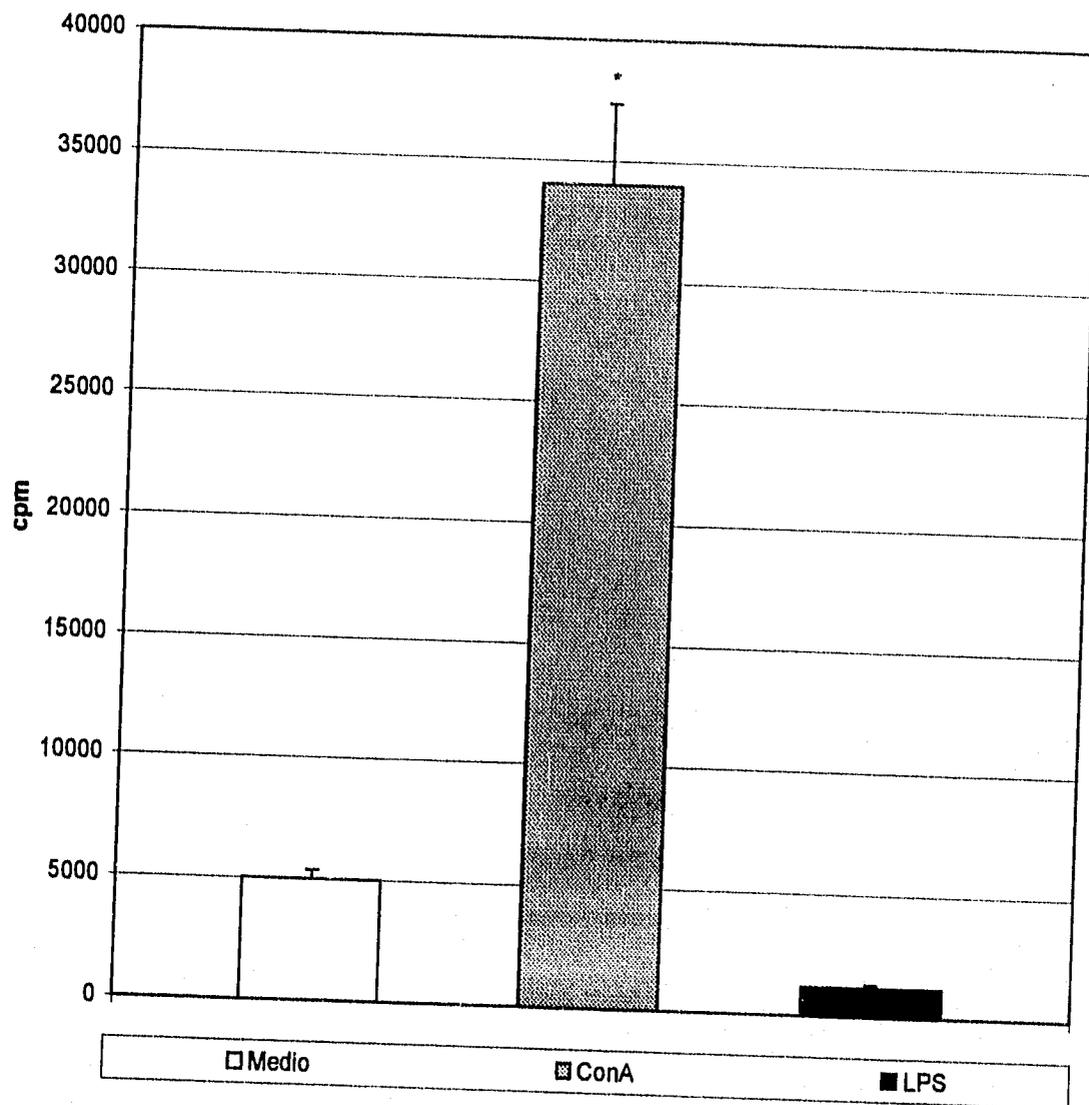


Figura 23. Estimulación de linfocitos T murinos con ConA y LPS. Linfocitos T de bazo purificados por el método de "Panning" de bazo fueron estimulados por tres días con 1 microgramo/ml de ConA y 20 microgramos/ml de LPS. La proliferación inducida por cada mitógeno se cuantificó evaluando la incorporación de [<sup>3</sup>H]timidina. El asterisco indica una  $p < 0.05$  en la prueba t de student respecto a la proliferación con medio.

linfocitos B), lo cual nos permitió suponer que habíamos eliminado gran parte de los linfocitos B.

También se realizaron ensayos de proliferación celular con células mononucleares totales con linfocitos de ratones parasitados por cisticercos de *T. crassiceps* (2 meses de infección). Al igual que en los ensayos anteriores, las células se estimularon en cultivo con cada una de los fragmentos recombinantes a varias dosis y a diferentes tiempos. La proliferación de los linfocitos de ratones infectados después de cuatro días de estimulación con la proteína recombinante completa VW7-3 resultó menor que la de los ratones normales (Fig. 24). Similarmente, la proliferación inducida por Con-A también resultó disminuida respecto a las células de ratones control después de 48 hrs (Fig. 25) y lo mismo ocurrió al estimular con LPS (Fig. 26), sugiriendo un efecto inmunosupresor previamente reportado (Flisser *et al.*, 1980; Herrera *et al.*, 1994; Letonja *et al.*, 1987; Molinari *et al.*, 1987; Molinari *et al.*, 1990; Molinari *et al.*, 1993; Sciutto *et al.*, 1995; Tato *et al.*, 1987; Willms *et al.*, 1980).

De manera interesante, al incrementar el tiempo de cultivo de las células de ratones infectados hasta ocho días, en presencia los fragmentos recombinantes, se obtuvo una proliferación mayor que la de los ratones normales (Fig. 27). Se encontró que el máximo nivel de proliferación se alcanzó cuando se estimulaba con 6 pmolas/ml de VW4-1, lo cual sugiere que los linfocitos de ratones infectados reconocen preferencialmente (al parecer de manera similar que los inmunizados) al fragmento recombinante VW4-1, después de 8 días de cultivo.

En estos ensayos de proliferación se encontró que la proliferación de los linfocitos de ratones infectados mantenidos en cultivo sin antígeno estimulante fue claramente mayor que la proliferación de los controles.

##### **5. Ensayos de protección.**

Se realizaron ensayos de protección en el modelo murino de cisticercosis por *Taenia crassiceps*. En estos ensayos se inmunizaron ratones con la proteína recombinante completa (VW7-3) siguiendo el protocolo descrito anteriormente (ver *Inmunización de animales* en sección III.2) y 7 días después de la última inmunización fueron retados por inyección intraperitoneal de 10 cisticercos. Después de 45 días de infección, los ratones fueron sacrificados y se contaron y midieron los cisticercos en la cavidad peritoneal. Como se observa en la Fig. 28, la inmunización con VW7-3 disminuye la carga parasitaria en aproximadamente un 50%.

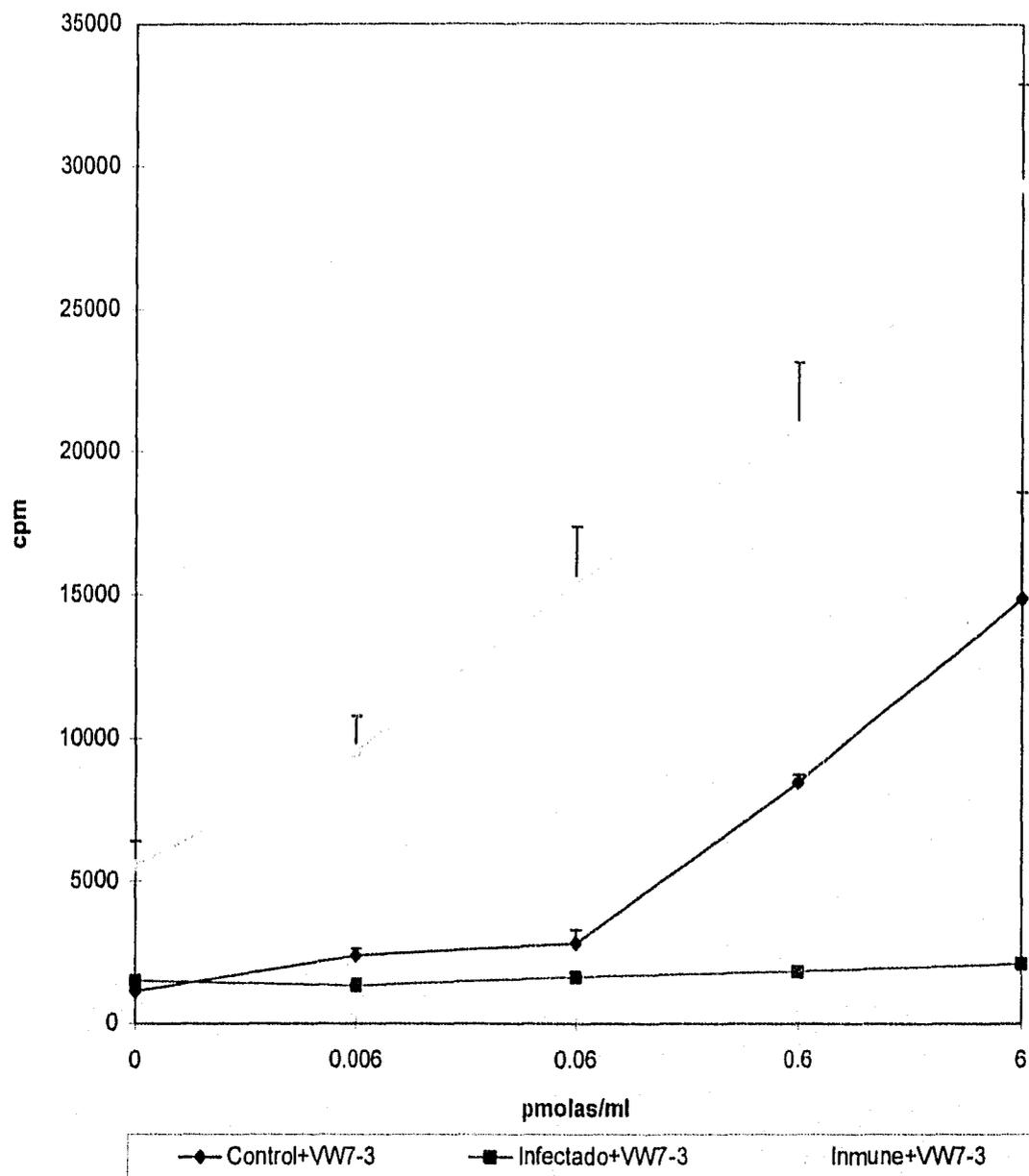


Figura 24. Estimulación con la proteína recombinante VW7-3 de linfocitos de ratones infectados con *T. crassiceps*. Células mononucleares de bazo de ratones controles, infectados e inmunizados con la proteína VW7-3 fueron estimuladas por cuatro días con la proteína recombinante VW7-3. La proliferación inducida por cada fragmento recombinante se cuantificó evaluando la incorporación de [<sup>3</sup>H]timidina. Todos los puntos correspondientes a las estimulación con proteína recombinante de los linfocitos de los ratones inmunizados tuvieron una  $p < 0.05$  en la prueba t de student respecto a la proliferación de los ratones controles.

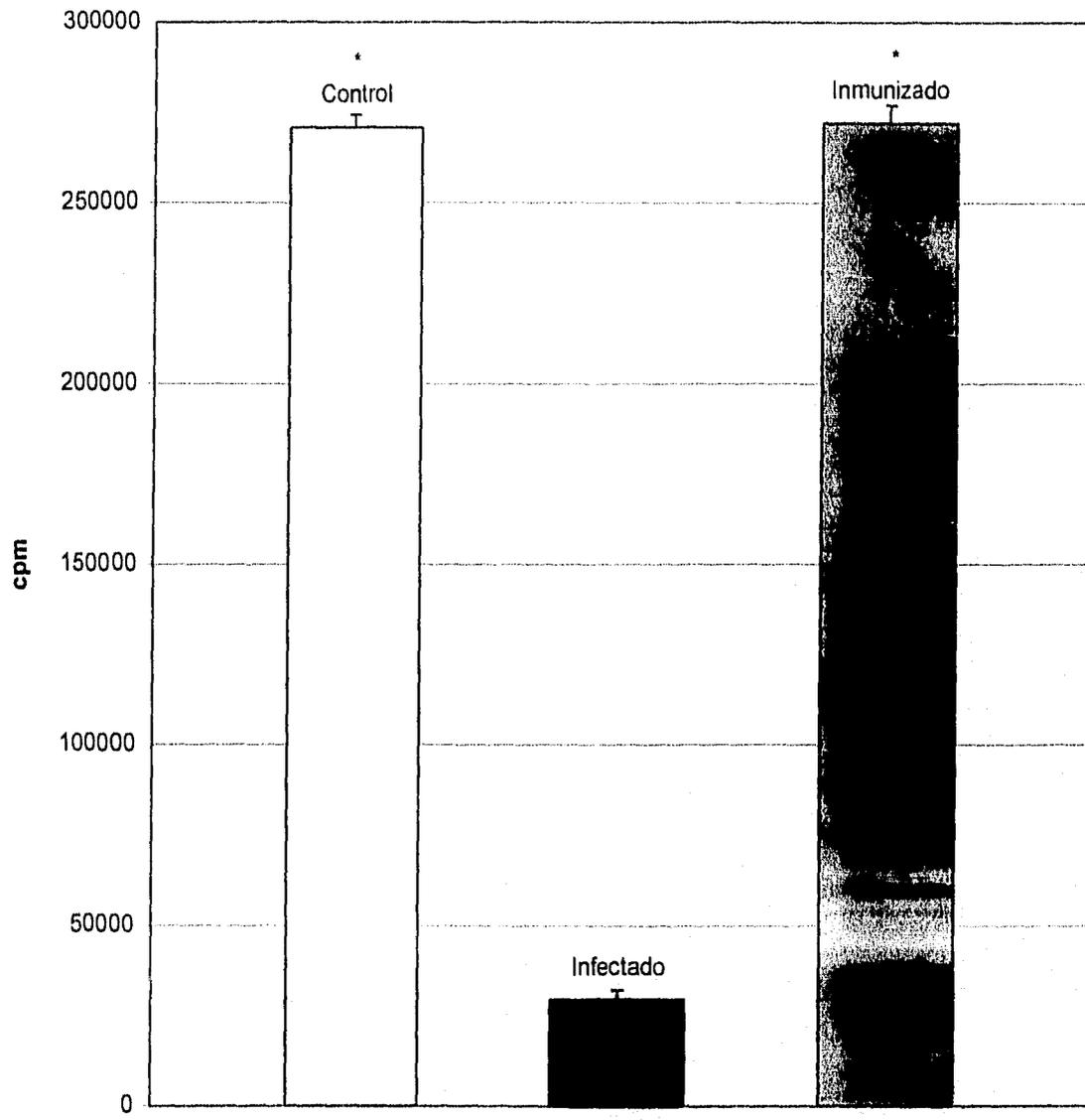


Figura 25. Estimulación con ConA de linfocitos de ratones infectados con *T. crassiceps*. Células mononucleares de bazo de ratones infectados fueron estimulados por dos días con 1 microgramo/ml de ConA. La proliferación inducida por el mitógeno se cuantificó evaluando la incorporación de timidina tritiada. Es asterisco indica una  $p < \alpha = 0.05$  en la prueba t de student respecto a la proliferación inducida en los linfocitos de los ratones infectados.

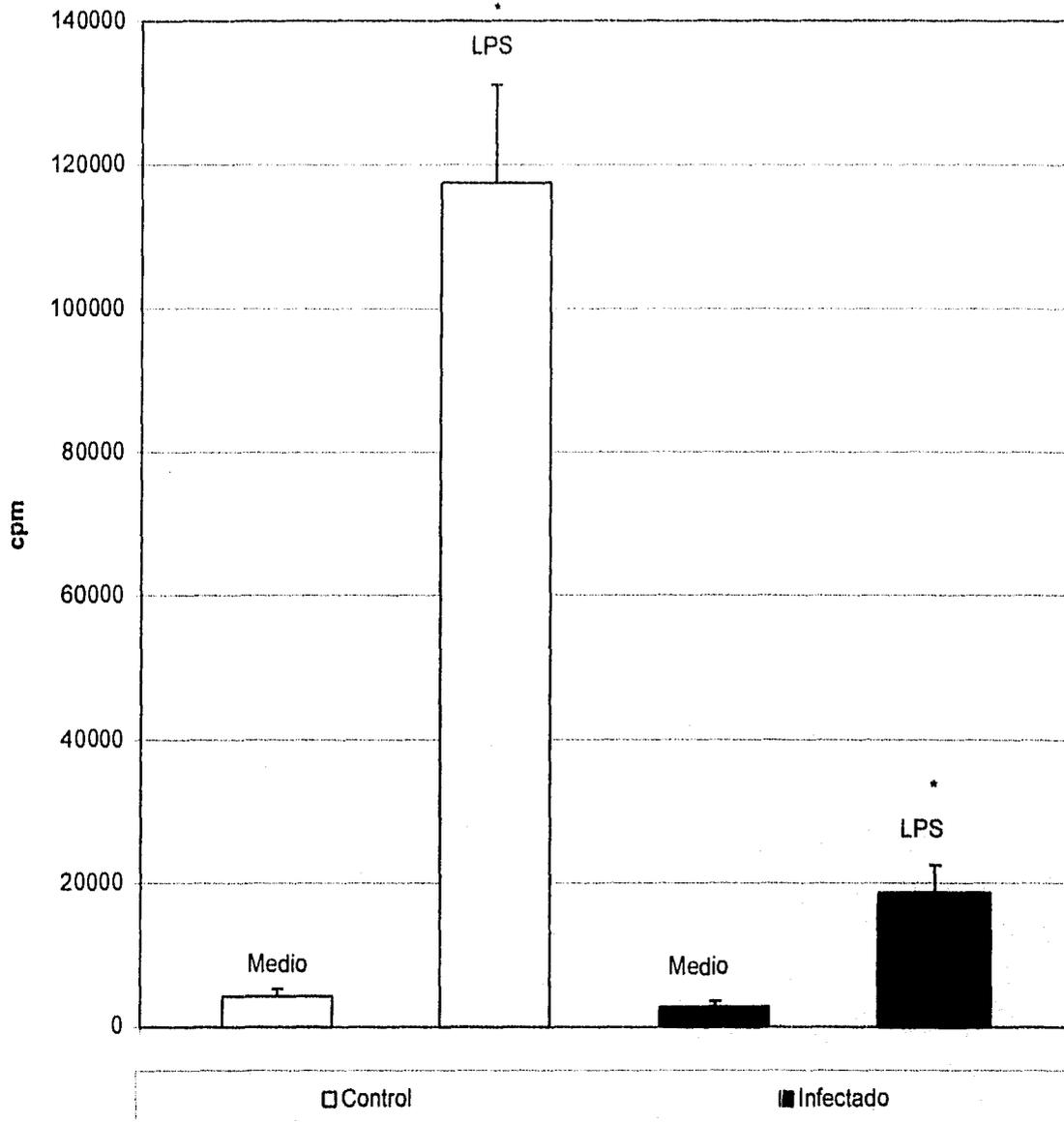


Figura 26. Estimulación con LPS de linfocitos de ratones infectados con *T. crassiceps*. Linfocitos de bazo de ratones controles y ratones infectados fueron estimulados por tres días con 10 microgramo/ml de LPS. La proliferación inducida por el mitógeno se cuantificó evaluando la incorporación de [<sup>3</sup>H]timidina. El asterisco indica una  $p < \alpha = 0.05$  en la prueba t de student respecto a la proliferación inducida por el medio.

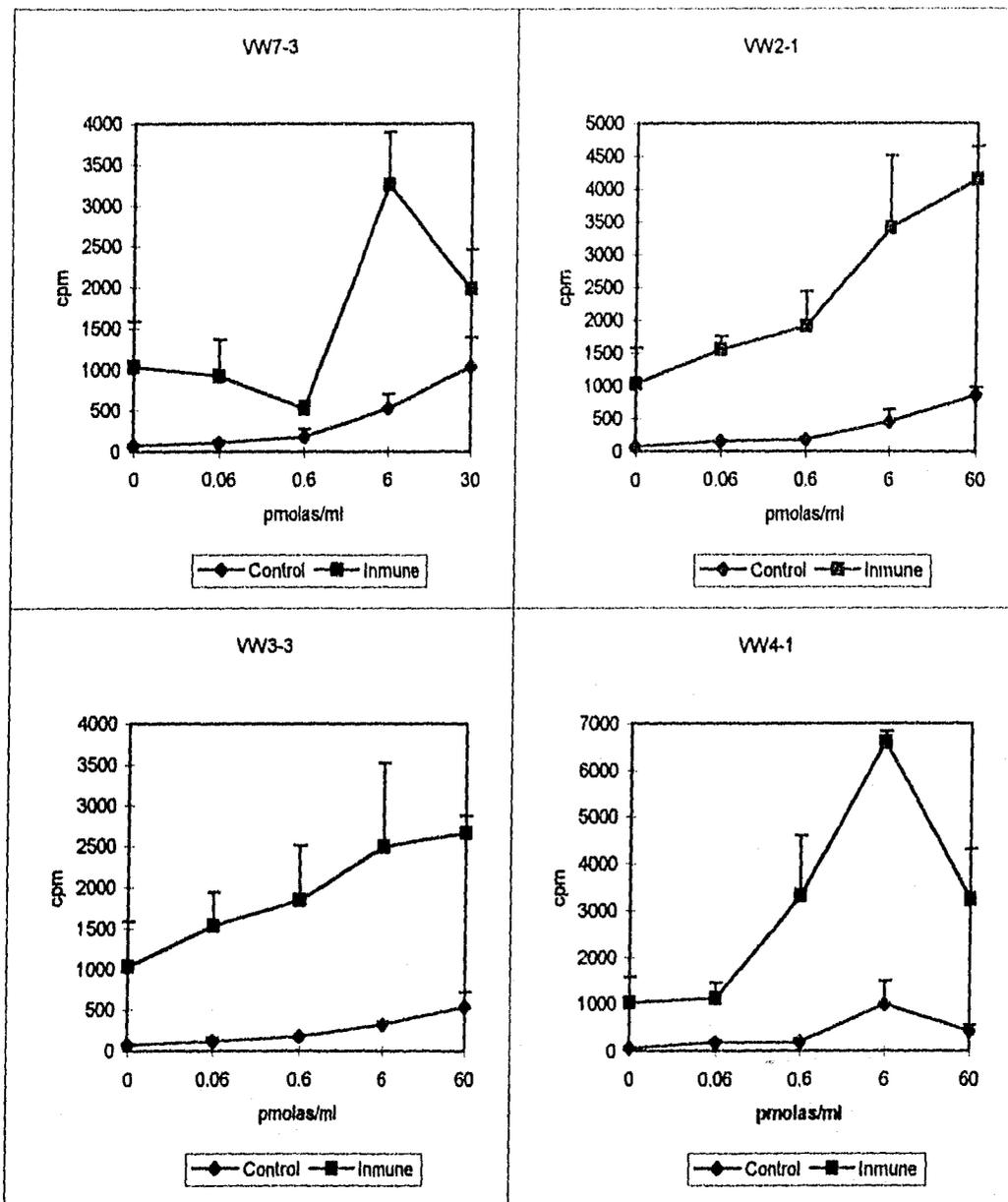


Figura 27. Estimulación con las proteínas recombinantes de linfocitos de ratones infectados con *T. crassiceps*. Células mononucleares de bazo de ratones infectados fueron estimuladas por ocho días con cada una de las proteínas recombinantes (VW2-1, VW3-3, VW4-1 y VW7-3). La proliferación inducida por cada fragmento recombinante se cuantificó evaluando la incorporación de [<sup>3</sup>H]-timidina. Todos los puntos correspondientes a la estimulación con proteína recombinante de los linfocitos de los ratones infectados tuvieron una  $p < 0.05$  en la prueba t de student, excepto la estimulación con 0.6 pmolas/ml de VW7-3, respecto a la proliferación de los linfocitos de los ratones controles.

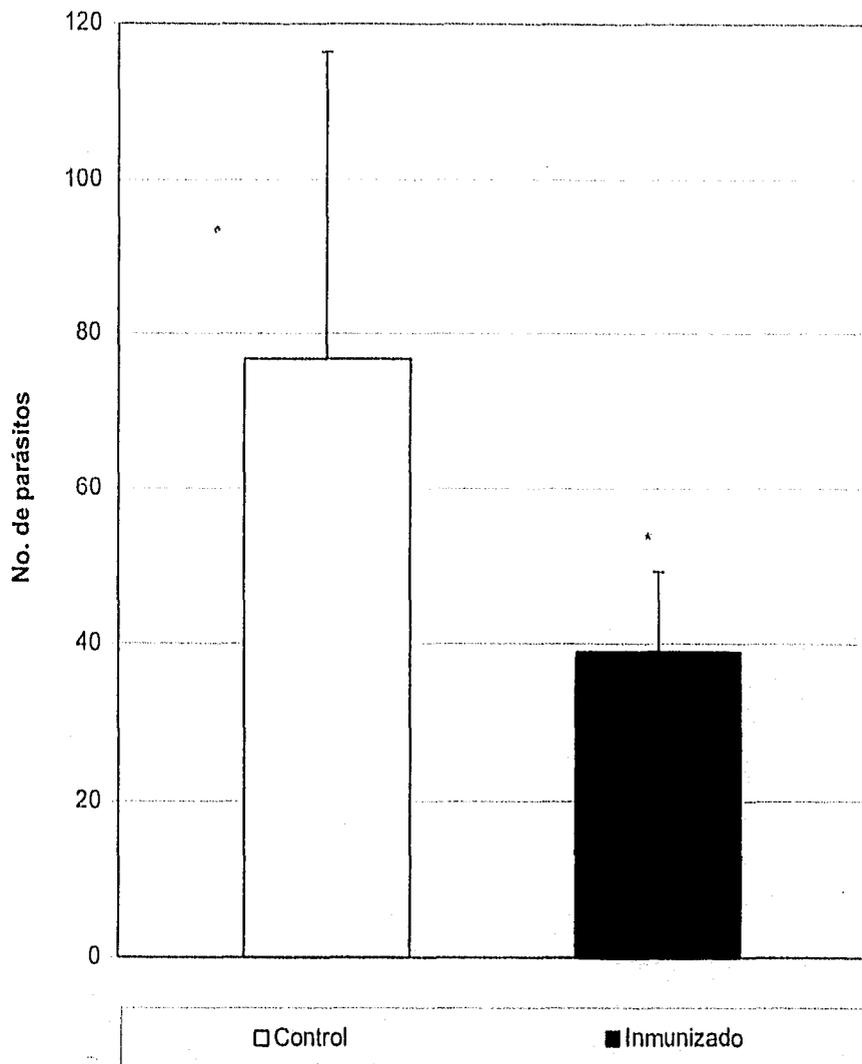


Figura 28. La inmunización con la paramiosina recombinante VW7-3 induce la reducción de la carga parasitaria por cisticercosis murina. Ratones de la cepa BALB/c AnN fueron inmunizados intraperitonealmente con 20 microgramos de la proteína recombinante VW7-3 en PBS-NaCl, tres veces. Después de 7 días de la última inmunización los ratones fueron infectados intraperitonealmente con 10 cisticercos de *T. crassiceps*. A los 45 días de infección los ratones fueron sacrificados y se cuantificó la carga parasitaria contando el número y volumen de cisticercos. El asterisco indica una  $p < 0.05$  en la prueba t de student respecto a los ratones controles.

## V. Discusión

En la presente tesis se realizó la fase inicial de un estudio dirigido a determinar la distribución de epítopes para células T y B murinas en la TPmy de la *Taenia solium*. Una base metodológica fundamental fue el aprovechamiento de técnicas del DNA recombinante para la producción de fragmentos de TPmy, correspondientes a las regiones amino-terminal, central y carboxilo-terminal de la proteína.

Previamente, se habían obtenido, caracterizado y expresado clonas con la secuencia codificadora total de la TPmy (Landa, 1992; Landa, *et al.*, 1993). Estas clonas fueron usadas como templado para obtener por amplificación con PCR, las regiones codificadoras de los tres fragmentos y de la proteína completa (Vázquez, 1993). La amplificación se realizó con oligonucleótidos sintéticos diseñados para amplificar solamente las regiones deseadas. Los oligonucleótidos tenían, además, un sitio de restricción para facilitar su posterior ligación a un nuevo vector de expresión (pRSET, InvitroGen, etc)

La decisión para usar este vector de expresión se debe por un lado a que posee un promotor viral de T7, capaz de inducir altos niveles de expresión de proteína recombinante (ver Apéndice A). La segunda ventaja es la facilidad y seguridad que ofrece el vector para controlar la expresión del promotor, lo que garantiza la rápida y segura expansión de las bacterias transformantes antes de la inducción. Otras características del vector se describen en el Apéndice A.

La purificación de las proteínas recombinantes consistió básicamente en el aislamiento de los cuerpos de inclusión y su solubilización en un medio altamente desnaturante. Este procedimiento puede llevarse a cabo en menos de seis horas. El nivel de pureza se incrementó realizando una cromatografía de afinidad en columnas de HiTrap™, aprovechando la afinidad del péptido de fusión hacia metales divalentes. Con ello se alcanza una pureza mayor al 95%. El rendimiento fue de hasta 0.3-5 mg/500 ml de cultivo de células transformadas. Este sistema de expresión y purificación permitió contar con cantidades suficientes de productos recombinantes para los ensayos inmunológicos.

La proteína recombinante completa y los fragmentos se usaron para realizar ensayos de ELISA para determinar cuál es la región predominantemente reconocida por la respuesta inmune humoral de ratones inmunizados con la proteína recombinante completa (VW7-3) y ratones infectados por *T. crassiceps*. Paralelamente, se realizaron ensayos de proliferación de linfocitos murinos para determinar cuál es la región predominantemente reconocida por la respuesta inmune celular de ratones inmunizados con la VW7-3 y de ratones cisticercosos.

Inicialmente, se inmunizaron los ratones con la proteína recombinante completa (VW7-3), una semana después de la tercera inmunización se sacrificaron los ratones y se obtuvieron los sueros y los bazos para realizar los ensayos inmunológicos. En los ensayos iniciales de ELISA, las placas fueron sensibilizadas directamente con los antígenos recombinantes. En estos ensayos se encontró que la respuesta hacia el extremo amino terminal (fragmento VW2-1) fue menor que la dirigida a la región central o hacia el extremo carboxilo-terminal (VW3-3 y VW4-1). Esto podía deberse a tres razones: 1). menor adsorción del fragmento VW2-1 al pozo de la placa de ELISA que VW3-3 o VW4-1, 2). puesto que la región de la TPmy que une CIq se encuentra en el extremo amino terminal, es posible que este componente del complemento esté obstruyendo la unión de los anticuerpos,

y 3). es posible que el este péptido en particular no haya tenido una renaturalización similar a la proteína nativa. La primer posibilidad fue descartada en los ensayos descritos a continuación. La segunda posibilidad no parece relevante puesto que la cantidad de C1q presente en los ensayos es despreciable y puesto que el reconocimiento se aumenta al disminuir la dilución del suero en el ensayo de ELISA. Respecto al tercer punto, numerosos experimentos de inhibición de complemento y de unión a C1q realizados por nuestro grupo, sugieren que la estructura y función del VW2-1 es muy cercana a la de la proteína nativa.

Para explorar el primer punto decidimos realizar un ensayo similar, en condiciones que garanticen que se unen cantidades equimolares de cada tercio recombinante sobre la placa de ELISA. Para ello se diseñó un ensayo para atrapar de manera equimolar a los péptidos recombinantes. La placa se sensibilizó primero con anticuerpos dirigido contra el péptido de fusión presente en todos los productos recombinantes de TPmy, y se agregó una cantidad saturante de cada fragmento recombinante. El resultado confirmó la observación previa de que el reconocimiento de extremo amino-terminal es significativamente menor que el del resto de la proteína.

Sin embargo, en este ensayo disminuyeron en general los niveles de anticuerpos contra cada fragmento recombinante a pesar de haber empleado diluciones más concentradas que en el primer ensayo de ELISA, incluso el nivel de anticuerpos en el suero inmune contra la región amino terminal fue muy bajo y casi igual al nivel de los controles, es decir que no se detectaron anticuerpos contra la región amino terminal. Esto puede tener varias explicaciones. 1). es posible que con los anticuerpos contra el péptido de fusión se haya captado menos antígeno en la placa que en el primer ensayo de ELISA y, por lo cual, hayan reaccionado menos anticuerpos contra cada fragmento. 2). como los ratones fueron inmunizados con la proteína recombinante completa (VW7-3) expresada junto con el péptido de fusión (potencialmente inmunogénico), es posible que se hayan generado anticuerpos contra este péptido; por lo tanto, al atrapar los fragmentos con anticuerpos contra el péptido de fusión bloquearemos estéricamente la unión de los anticuerpos a esta región y consecuentemente disminuirá la reacción del suero  $\alpha$ -TPmy contra cada fragmento. Por otra parte, aunque los niveles de anticuerpos contra la región amino terminal son casi nulos, no tenemos elementos para concluir que no hayan anticuerpos contra esta región o que esto sea un artificio de nuestras condiciones experimentales.

Los anteriores resultados además confirman que se pueden generar anticuerpos en ratón contra la Pmy (Pearce *et al.*, 1988; Flanigan *et al.*, 1989; Nanduri, *et al.*, 1989; Ben-Wen Li *et al.*, 1991; Ben-Wen Li *et al.*, 1993)

Es posible que existan regiones inmunodominantes distintas en paramiosinas de diferentes especies de parásitos; ya que en un estudio similar acerca del reconocimiento de anticuerpos de pacientes hacia la paramiosina de la *Dirofilaria immitis*, se encontró que la región amino-terminal era la más reconocida (Steel *et al.*, 1990).

Al intentar determinar el reconocimiento hacia los fragmentos recombinantes en sueros de ratones cisticercosos, no se detectaron anticuerpos en contra de TPmy. Esto puede deberse a que los ratones altamente parasitados presentan niveles altos de antígeno circulante que bloquea los anticuerpos anti-paramiosina (en forma de complejos paramiosina-anticuerpo). Otra posibilidad es que no haya una similitud antigénica entre la TPmy de *T. solium* y de *T. crassiceps*. Esta posibilidad puede ser descartada puesto que se

ha reportado un reconocimiento cruzado entre prácticamente todas las paramiosinas de invertebrados. Una tercera posibilidad sería que no existan anticuerpos en contra de la paramiosina, por algún tipo de supresión de la respuesta humoral en ratones infectados por *T. crassiceps* (Good, *et al.*, 1973), consistente con la proliferación disminuida que induce el LPS descrita en esta tesis. La clara detección de complejos inmunes paramiosina-anticuerpo, mediante un ensayo de doble atrapamiento sugiere que la primer posibilidad constituye es al menos parte de la explicación.

Los bajos niveles de anticuerpos  $\alpha$ -TPmy encontrados en ratones parasitados con *T. crassiceps*, la capacidad de inducir la producción de estos anticuerpos mediante la inmunización con la proteína recombinante y la protección parcial generada, nos parecieron resultados interesantes, ya que es un patrón similar a lo informado sobre otras enfermedades hemínticas. Por ejemplo, el suero de gerbos (jirds) infectados con *B. malayi* es incapaz de reconocer a la paramiosina (Pmy) del parásito; sin embargo, la Pmy si es reconocida por el suero de jirds protegidos contra el parásito por inmunización con larvas irradiadas de *B. malayi* (Ben-Wen Li *et al.*, 1991). Asimismo, se ha encontrado que individuos infectados con *S. mansoni* mostraron muy bajos niveles de anticuerpos contra la Pmy del parásito, en comparación con individuos que no se habían infectado a pesar de haber estado anteriormente en contacto con el parásito (Correa-Oliveira *et al.*, 1989). Todo esto podría sugerir que la presencia de anticuerpos contra Pmy pueden relacionarse con la resistencia a la enfermedad (Correa-Oliveira *et al.*, 1989), sin embargo son necesarios más estudios para demostrarlo.

Los dos estudios realizados para la evaluación de la respuesta inmune celular contra cada fragmento recombinante de ratones inmunizados con la proteína completa, arrojaron diferentes resultados.

Por un lado, los ensayos de proliferación de células mononucleares de bazo mostraron mayores niveles de proliferación con la región carboxilo terminal (VW4-1) a menores dosis que con los otros fragmentos recombinantes a los cinco días de estimulación. Esto sugiere que la respuesta inmune celular reconoce preferencialmente la región carboxilo. En contraste, cuando se realizaron ensayos similares con linfocitos T purificados de bazo y suplementados con células adherentes como células accesorias, se encontró que sólo el tercio amino terminal desencadenó el mayores niveles de proliferación en los ratones inmunes respecto a los controles, es decir, este ensayo parece que hay preferencia hacia el tercio amino terminal. Esta diferencia en el perfil de proliferación entre células mononucleares totales y linfocitos T puede deberse a las células presentadoras de antígeno (APC) presentes en cada ensayo. En la suspensión de células mononucleares se encuentran presentes linfocitos B, células dendríticas y macrófagos. En cambio, las células que se adhieren al plástico son primoradialmente macrófagos y células dendríticas. En consecuencia, el perfil de proliferación de cada ensayo podría depender de la presencia o ausencia de linfocitos B. Por lo tanto se pensó que la diferencia entre los patrones de proliferación encontrada (dependiente de los tipos celulares presentes en los cultivos) depende de las características de cada una de las APC. Por ejemplo, es posible que cuando se realicen los cultivos en presencia de linfocitos B (es decir, empleando las células mononucleares de bazo), estos puedan capturar más eficientemente los fragmentos VW3-3 y VW4-1 a través de sus inmunoglobulinas de membrana, ya que hay mayores niveles de

anticuerpos contra estos fragmentos. Por lo tanto, los linfocitos B tendrían ventajas como APC para presentar los fragmentos VW3-3 y VW4-1 y se encontraría proliferación en respuesta hacia estos fragmentos. Siguiendo esta línea, es posible que en los cultivos con sólo células adherentes al plástico como APC la presentación sea más eficiente para el fragmento VW2-1. Sin embargo, se necesita demostrar esta hipótesis.

Por otro lado, se ha descrito que diferentes APC (linfocitos B, macrófagos y células dendríticas) pueden inducir diferentes niveles de proliferación linfocitaria en respuesta a los mismos antígenos (Ellis, J., *et al.*, 1991; Kulkarni, A.B., *et al.*, 1992). Esta diferencia puede estar relacionada con el tipo de linfocito T estimulado, ya que se ha descrito que los macrófagos inducen preferencialmente la proliferación de clonas y células con un patrón de interleucinas tipo Th1, mientras que los linfocitos B inducen la proliferación de linfocitos con fenotipo Th2 (Gajewski, T.F., *et al.*, 1991; Rossi-Bergmann, B., *et al.*, 1993). Además, se ha demostrado que distintas maneras de presentar antígeno pueden inducir diferentes patrones de interleucinas (Ellis, J., *et al.*, 1991; Rock, K.L., *et al.*, 1993; Schmitz, J., *et al.*, 1992; Stockinger, B., 1992; Vidard, L., *et al.*, 1992).

Las diferencias entre la proliferación linfocitaria de células mononucleares de bazo y linfocitos T suplementados con células adherentes al plástico, estimuladas con los mismos antígenos (Gajewski, *et al.*, 1991), merece un comentario especial. Las clonas caracterizadas por estos autores con fenotipo Th1 o Th2 proliferan al ser estimuladas con su antígeno específico en presencia de células mononucleares de bazo. Sin embargo, sólo las clonas Th1 proliferan óptimamente si el ensayo se realiza con células adherentes. Por otro lado, las clonas Th2 solo proliferan cuando son estimuladas en presencia de linfocitos B. En nuestro estudio deseamos explorar si la correlación entre el tipo de APC y el fenotipo de linfocito T estimulado, también ocurre para la TPmy.

Nos parece interesante la posibilidad de que la respuesta específica en contra de la región amino terminal tenga un patrón Th1 ya que otros resultados del laboratorio indican que esta región induce elevados niveles de protección en el modelo murino de cisticercosis, y la resistencia a la cisticercosis murina se ha correlacionado con la respuesta tipo Th1 (Terrazas *et al.*, 1994; Bojalil *et al.*, 1993). La caracterización del tipo de respuesta celular (por medio de métodos tan sencillos como la proliferación celular, determinación de interleucinas, etc.) puede servir para la detección de moléculas o regiones de ellas que tengan potencial protector para ser evaluadas posteriormente en ensayos de protección.

En el caso de la respuesta celular de los ratones infectados con *T. crassiceps*, se encontró que los ratones infectados responden menos a la proteína completa que los sanos, en cultivos de 96 h. Esto es consistente con la menor proliferación en respuesta a mitógenos para linfocitos T y B. Sólo en cultivos de ocho días se pudo detectar mayor proliferación en los infectados que en los controles y, de manera similar a lo encontrado con los ratones inmunizados, se detectó cierta preferencia hacia la región carboxilo terminal.

La disminución en la proliferación celular inducida por mitógenos ya ha sido descrita por varios grupos de investigación en cisticercosis (Flisser *et al.*, 1980; Herrera *et al.*, 1994; Letonja *et al.*, 1987; Molinari *et al.*, 1987; Molinari *et al.*, 1990; Molinari *et al.*, 1993; Sciutto *et al.*, 1995; Tato *et al.*, 1987; Willms *et al.*, 1980) humano, cerdo y ratón, tanto con *T. solium* como con *T. crassiceps*. Incluso ya se han purificado componentes específicos capaces de inducir tal efecto en linfocitos normales de cerdo y ratón (Molinari *et al.*, 1993;

Tato *et al.*, 1995). La disminución en proliferación inducida con ConA (mitógeno para linfocitos T) y con LPS (mitógeno para linfocitos B), sugiere que tanto los linfocitos B como los T son afectados durante la infección.

Encontramos que la inmunización con la paramiosina recombinante de *T. solium* se puede reducir la carga parasitaria (50%) durante la infección de ratones (cepa BALB/c AnN) por el cisticercos de *T. crassiceps* (cepa ORF). Por un lado, esto es consistente con lo encontrado en otras parasitosis provocadas por helmintos (Lanar *et al.*, 1986; Pearce *et al.*, 1986; Pearce *et al.*, 1988; Flanigan *et al.*, 1989; Nanduri *et al.*, 1989; Ben-Wen Li, *et al.*, 1991; Ben-Wen Li, *et al.*, 1993; Richter, *et al.*, 1993; Richter, *et al.*, 1993a; Naram, *et al.*, 1994). También se ha demostrado que se puede inducir protección cruzada con Pmy de *C. elegans* contra la infección de ratón por *B. malayi*, lo cual también es consistente protección cruzada contra la cisticercosis que se puede inducir con antígenos de especies heterólogas de ténidos (Lightowlers *et al.*, 1989; Sciutto *et al.*, 1990; Ito *et al.*, 1991; Sciutto *et al.*, 1995; Manoutcharian *et al.*, 1996), sin embargo, esto no ocurre con otras paramiosinas ya que la Pmy de *D. immitis* no induce inmunidad protectora contra *B. malayi* (Ben-Wen Li *et al.*, 1993), ni la Pmy del molusco mercenaria induce resistencia a la infección del ratón por *S. mansoni* (Lanar *et al.*, 1986). Pensamos que es necesario explorar más las condiciones de inmunización (por ejemplo, diferentes adyuvantes, número de dosis e intervalo entre estas) e infección (por ejemplo, cepa de ratón, intervalo entre la inmunización y la infección), así como el tipo y mecanismo de protección (Th1 o Th2) para establecer la relevancia y aplicabilidad inmunológica de este hallazgo en la cisticercosis porcina.

Existe evidencia que permite sugerir que el mecanismo de protección generado por la Pmy depende de linfocitos T, tal vez con un patrón Th1. Al respecto se ha publicado que: 1) la Pmy puede inducir la producción de IFN-gamma por linfocitos T de ratones vacunados con Pmy de *S. mansoni* (Pearce *et al.*, 1988); 2) en el caso de la infección por *B. malayi*, la respuesta inmune se ha involucrado con una reacción de hipersensibilidad tardía (Nanduri, *et al.*, 1989); 3) la transferencia pasiva de anticuerpos anti-Pmy no induce protección contra la esquistosomiasis murina (Pearce *et al.*, 1988) y 4) la Pmy de *S. mansoni* puede inducir proliferación de linfocitos de ratones inmunizados con cercarias irradiadas, así como la producción de IL-2 (Richter *et al.*, 1993).

La expresión recombinante de diferentes regiones de la paramiosina puede encontrar aplicaciones en el diagnóstico de la cisticercosis humana y porcina. En muchas enfermedades se busca el antígeno que permite desarrollar la prueba diagnóstica con alta sensibilidad y especificidad. Es concebible que se pueda identificar un epítipo de la paramiosina reconocido por una mayoría de sueros de pacientes que no muestre reacciones cruzadas con otros parásitos.

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

caracterizar con mayor resolución el tipo de respuesta inmune generada contra diferentes regiones de un antígeno. El conocimiento obtenido en esta línea podría ser el primer paso para proporcionar las bases para el desarrollo de nuevas generaciones de inmunógenos de aplicación clínica.

Los vectores de expresión pRSET (A,B,C) son una serie de plásmidos derivados de la familia de los plásmidos pUC, que permiten obtener altos niveles de expresión de productos recombinantes en *E. coli*. Los niveles altos de expresión de las secuencias codificadoras clonadas en los vectores pRSET se logran gracias al promotor viral T7. Los insertos se ligan en fase y por debajo (downstream) de una secuencia que codifica un péptido de fusión amino-terminal que contiene (en orden desde el amino-terminal hacia el carboxilo-terminal), un codón de inicio ATG, una secuencia de seis residuos de histidina que le confieren a la proteína de fusión afinidad hacia metales divalentes, una secuencia para la estabilización del transcrito proveniente del gene 10 del bacteriófago T7, y un sitio de reconocimiento y corte para la enterocinasa (Fig. 24).

El dominio con afinidad hacia metales del péptido de fusión permite la purificación de los péptidos recombinantes por cromatografía de afinidad hacia metales. El sitio de reconocimiento y corte para la enterocinasa se encuentra entre el péptido de afinidad a metales y el péptido de interés y sirve para liberarlo de su contra parte en la proteína de fusión. El DNA insertado se propaga con el vector en una cepa de *E. coli* que no expresa la polimerasa T7, evitando la expresión del gene clonado. Cuando se desea la expresión, la bacteria transformada se infecta con un bacteriófago M13 que contiene el gene de la polimerasa T7 controlado por el promotor *lac* de *E. coli* (bacteriófago M13/T7). La inducción se realiza en presencia de IPTG el cual libera al promotor *lac* de *E. coli* induciendo la expresión de la polimerasa T7 del bacteriófago M13/T7. Por lo anterior, en presencia de IPTG y M13/T7, las bacterias transformadas mantienen niveles altos de la polimerasa T7 que a su vez producen abundantes transcritos para la proteína de fusión. De esta manera es posible la expresión de niveles altos de la proteína recombinante regulables por IPTG y M13/T7.

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

Por debajo de las secuencias 5' descritas anteriormente, existen varios sitios de reconocimiento para enzimas de restricción (polylinker). La lista de sitios de restricción es: *Bam* HI, *Xho* I, *Bgl* II, *Pst* I, *Pvu* II, *Kpn* I, *Nco* I, *Eco* RI, *Bst* BI y *Hind* III (Fig. 25). Para conseguir la expresión del péptido de interés en la proteína de fusión, es necesario mantener el marco de lectura apropiado entre el extremo 5' de la secuencia de fusión y el fragmento de DNA ligado; para ello existen tres versiones diferentes de pRSET: A, B y C. En estas tres versiones se encuentran los tres marcos de lectura, por lo tanto, se puede elegir la versión adecuada para la correcta expresión de péptido de interés en fase correcta con el extremo amino-terminal.

Además, este vector le confiere a la bacteria un nuevo fenotipo, la resistencia a ampicilina, lo cual permite seleccionar fácilmente a las bacterias transformadas en un medio con este antibiótico. El nuevo fenotipo es debido a la presencia del gen de resistencia a la

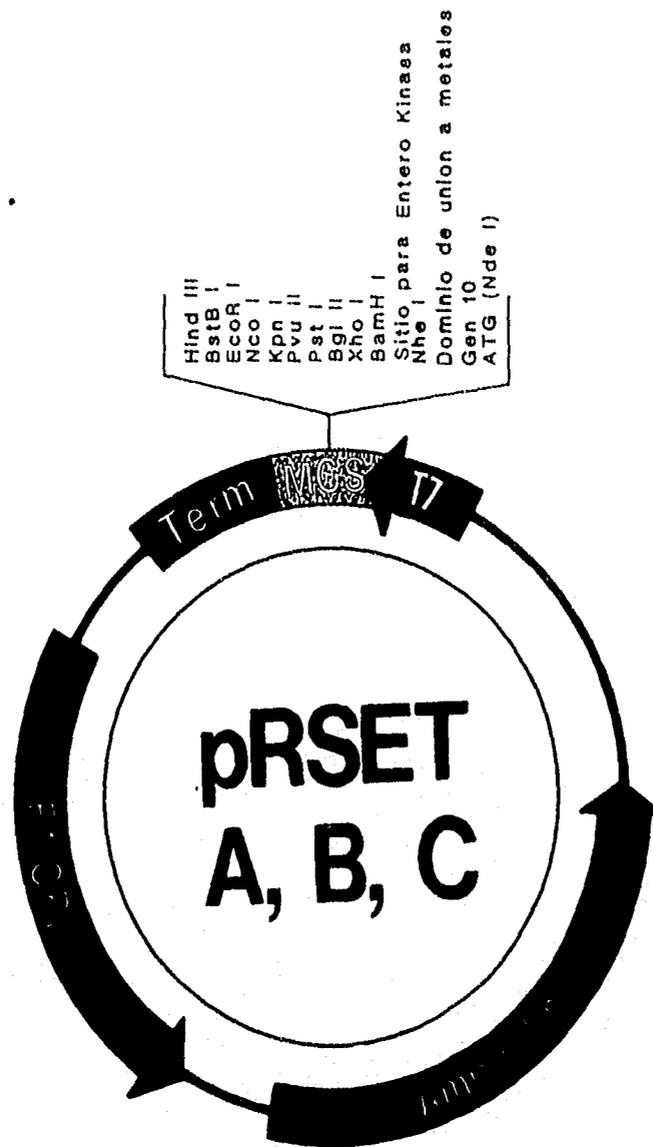


Figura 29. Representación esquemática del vector utilizado en las construcciones para la expresión de los péptidos recombinantes del AgB. Los fragmentos de DNA fueron insertados en los sitios EcoR I/Hind III.

ampicilina (*amp<sup>r</sup>*) en el vector. Este gen codifica para una enzima que es secretada dentro del espacio periplásmico de la bacteria, en donde cataliza la hidrólisis del anillo  $\beta$ -lactámico, provocando la detoxificación concomitante de la droga.

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

Nde I  
 (0) Nhe I  
 +1 (1320)  
 ATG CGG GGT TCT CAT CAT CAT CAT CAT CAT GGT ATG GCT AGC ATG ACT  
 MET Arg Gly Ser His His His His His His Gly Met Ala Ser Met Thr

Dominio de unión  
 a metales.

Bam HI  
 (3520)

GGT GGA CAG CAA ATG GGT CGG GAT CTG TAC GAC GAT GAC GAT AAG GAT  
 Gly Gly Gln Gln Met Gly Arg Asp Leu Tyr Asp Asp Asp Asp Lys Asp

Sitio de reconocimiento  
 para la enterocinasa.

Bst B  
 (4840)

Xho I, Sac I (3740)	Bgl II (3960)	Pvu II Pst I (4180)	Nco I Kpn I (4510)	Eco RI (4730)	Hind III (4950)
---------------------------	------------------	---------------------------	--------------------------	------------------	--------------------

CCG AGC TCG AGA TCT GCA GCT GGT ACC ATG GAA TTC GAA GCT  
 Pro Ser Ser Arg Ser Ala Ala Gly Thr Met Glu Phe Glu Ala

Figura 30. Secuencia del sitio múltiple de clonación del vector pRSET-B que muestra sus principales características. El dominio de unión a metales se encuentra subrayado. El sitio de reconocimiento para la enterocinasa se encuentra doble subrayado.

## Bibliografía.

**Acevedo-Hernández, A.** (1989) Epidemiología de la cisticercosis porcina. En: Cisticercosis humana y porcina. Su conocimiento e investigación. Flisser, A. y Malagón, F. (eds). Limusa. México. pp. 251-253.

**Aluja, A.S.** (1982) Frequency of porcine cysticercosis in México. Cysticercosis: Present State of Knowledge and Perspectives. Flisser, A., Willms, K., Lacleste, J.P., Larralde, C., Ridaura, C. and Beltrán, F. (eds). Academic Press. New York, U.S.A. pp. 53-62.

**Aluja, A.S., Escobar, A., Escobedo, F., Flisser, A., Lacleste, J.P., Larralde, C., Madrazo, I., Velázquez, V. y Willms, K.** (1987) Cisticercosis: Una recopilación actualizada de los conocimientos básicos para el manejo y el control de la cisticercosis causada por *Taenia solium*. Fondo de Cultura Económica. México D.F. p. 20.

**Aluja, A. y Vargas, G.** (1988) The histopathology of porcine cysticercosis. Vet. Parasitol. 28:65-77.

**Ambrosio Hernández, J.R.** (1991) Estudio de la internalización de macromoléculas en cisticercos de *Taenia crassiceps*. Tesis de Maestría. Instituto de Investigaciones Biomédicas. UNAM.

**Asano, K., Ito, A., Okamoto, K.** (1993) The role of OX22- helper T cells in protective immunity to reinfection with *Taenia taeniaeformis* in rats. Parasite-Immunol. 15(12): 663-8

**Ben-Wen Li, Ramaswamy Chandrashekar, Raquel M. Alvarez, Fanya Liftis and Gary J. Weil.** (1991) Identification of paramyosin as a potential protective antigen against *Brugia malayi* infection in jirds. Mol. Biochem. Parasitol. 49:315-324.

**Ben-Wen Li, Ramaswamy Chandrashekar and Gary J. Weil.** (1993) Vaccination with recombinant filarial paramyosin induces partial immunity to *Brugia malayi* infection in jirds. J. Immunol. 150:1881-1885.

**Bojalil, R., Terrazas, L.I., Govezensky, T., Sciutto, E. and Larralde, C.** (1993) Thymus-related cellular immune mechanisms in sex-associated resistance to experimental murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*) J. Parasitol. 79:384-389.

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

Conraths, F.J., Harnett, H.W., Worms, M.J., Parkhouse, R.M. (1992) Immunological cross-reaction between an *Onchocerca* paramyosin-like molecule and a microfilaria surface antigen. *Trop. Med. Parasitol.* 43: 135-8

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

Correa-Oliveira, R., Pearce, E.J., Oliveira, G.C., Golgher, D.B., Katz, N., Bahia, L.G., Carvalho, O.S., Gazzinelli, G. and Sher, A. (1989) The human immune response to defined immunogens of *Schistosoma mansoni*: elevated antibody levels paramyosin in stool-negative individuals from two endemic areas in Brazil. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 83:798-804

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

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

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

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

Ellis, J., Chain, B.M., Davies, D.H., Ibrahim, M.A., Katz, D.R., Kaye, P.M., Lightstone, E. (1991) Antigen presentation by dendritic cells provides optimal stimulation for the production of interleukin (IL) 2, IL 4 and interferon-gamma by allogeneic T cells. *Eur J Immunol.* 21:803-9.

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

Flanigan, T.P., King, C.H., Lett, R.R., Nanduri, J. and Mahmoud, A.F. (1989) Induction of resistance to *Schistosoma mansoni* infection in mice by purified parasite paramyosin. *J. Clin. Invest.* 83:1010.

Flisser, A., Woodhouse, E. and C. Larralde. (1980) Human cysticercosis: antigens, antibodies and nonresponders. *Clin. Exp. Immunol.* 39:27-37.

**Flisser, A.** (1988) Neurocysticercosis in México. *Parasitol. Today.* 4:31-137.

**Gajewski TF, Pinnas M, Wong T, Fitch FW** (1991) Murine Th1 and Th2 clones proliferate optimally in response to distinct antigen-presenting cell populations. *J Immunol.* 146:1750-8.

**Gemmel, M. A. and R. Lawson.** (1982) Ovin cysticercosis: An epimemiological model for the cysticercosis I. The free living egg phase. *Cysticercosis: Present State of Knowledge and Perspectives.* Flisser, A., Willms, K., Lacleste, J.P., Larralde, C., Ridaura, C. and Beltrán, F. (eds). Academic Press. New York, U.S.A. pp.87-98.

**Goebeler, M., G. Meinardus-Hager, J. Roth, S. Goerdts and C. Sorg** (1993) Nickel chloride and cobalt chloride, two common contact sensitizers, directly induce expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) and endothelial-leukocyte adhesion molecule-1 (ELAM-1) by endothelial cells. *J. Invest. Dermatol.* 100:759

**Goebeler, M., Roth, J., Brocker, E.B., C. Sorg & K. Schulze-Osthoff** (1995) Activation of nuclear factor-kappa B and gene expression in human endothelial cells by the common haptens nickel and cobalt. *J. Immunol.* 155:2459-2467

**Good, A.H. and K.L. Miller** (1976) Depression of the immune response to sheep erythrocytes in mice infected with *Taenia crassiceps* larvae. *Infect. Immun.* 14:449-456.

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

**Herrera, L.A., Santiago, P., Rojas, G., Salazar, P.M., Tato, P., Molinari, J.L., Schiffmann, D. and P. Ostrosky-Wegman.** (1994) Immune response impairment, genotoxicity and morphological transformation induced by *Taenia solium* metacestode. *Mutation. Res.* 305:223-228

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

**Ito, A., Tsuyoshi, T. and Itoh, M.** (1991) Vaccine effect of intact metacestodes of *Taenia crassiceps* against *T. taeniaeformis* infection in rats. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 44:696-701.

Ishii, N., Takahashi, K., Nakajima, H., Tanaka, S. and Askenase, P.W. (1994) J. Invest. Dermatol. 102:321.

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

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

Kapsenberg, M.L., Wierenga, E.A., Stiekema, F.E.M., Tiggeleman, A.M.B.C. and Bos, D.D. (1992) J. Invest. Dermatol. 98:59.

Kulkarni, A.B., Mullbacher, A., Parrish, C.R., Westaway, E.G., Coia, G., Blanden, R.V. (1992) Analysis of murine major histocompatibility complex class II-restricted T-cell responses to the flavivirus Kunjin by using vaccinia virus expression. J Virol. 66:3583-92.

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

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

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

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

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

Laclette, J.P., Skelly, P.J., Merchant, M.T. and Shoemaker, C.B. (1995) Aldehyde fixation dramatically alters the immunolocalization pattern of paramyosin in platyhelminth parasites. Exp. Parasitol. 81:140.

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

**Lanar, D.E., Pearce, E.J., James, S.L., Sher, A. (1986)** Identification of paramyosin as schistosome antigen recognized by intradermally vaccinated mice. *Science* 234: 593-6

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

**Landa, A, Lacleste, J.P., Nicholson-Weller, A. and Shoemaker, B.C. (1993)** *Taenia solium* paramyosin (AgB): cDNA cloning and recombinant expression of collagen-binding and complement inhibitor activity. *Mol. Biochem. Parasitol.* 60:343-347.

**Larralde, C., Sciutto, E., Huerta, L., Terrazas, G., Fragoso, G., Trueba, L., Lomeli, C., Tapia, G., Montoya, R.M., Díaz, M.L. y Govezensky, T. (1989)** Experimental cysticercosis by *Taenia crassiceps* in mice: Factors involved in susceptibility. *Acta Leidensia.* 57:131-134.

**Letonja, T., Hammemborg, C., Schurig, G. (1987)** Evaluation of spleen lymphocyte responsiveness to a T-cell mitogen during early infection with larval *Taenia taeniaformis*. *Parasitol. Res.* 73:265-270.

**Lightowers, M.W. (1989)** Recent advances in vaccination against cysticercosis. *Acta Leidensia* 57:135-142.

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

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

**Manoutcharian, K., Rosas, G., Hernández, M., Fragoso, G., Aluja, A., Villalobos, N., Rodarte, L.F. and E. Sciutto. (1996)** Cysticercosis: Identification and cloning of protective recombinant antigens. *J. Parasitol.* 82:250-254.

**Molinari, J.L., Meza, R., Suarez, B., Palacios, S. and Tato, P. (1983)** *Taenia solium*: immunity in hogs to the cysticercus. *Exp. Parasit.* 55:340-357.

**Molinari, J.L., Meza, R. and Tato, P. (1983a)** *Taenia solium*: Cell reactions to the larva (*Cysticercus cellulosae*) in naturally parasitized, immunized hogs. *Exp. Parasit.* 56:327-338.

**Molinari, J.L., Tato, P. and Y. Valles. (1987)** Helper T lymphocytes depressed by *Cysticercus cellulosae* in immunized and control hogs. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 29:293-300.

- Molinari, J.L., Tato, P., Aguilar, T. and Palet, A. (1988) Immunity in mice to an oncosphere infection by using oncospherical antigens from *Taenia solium* or *Taeniarhynchus saginatus*. Rev. Lat-amer. Microbiol. 30:325-333.
- Molinari, J.L., Tato, P., Reynoso, O.A. and Cazares, J.M. (1990) Depressive effect of a *Taenia solium* cysticercus factor on culture human lymphocytes stimulated with phytohaemagglutinin. Ann. Trop. Med. and Parasit. 84(3):205-208.
- Molinari, J.L., Soto, R., Tato, P., Rodríguez, D., Retana, A., Sepulveda, J. and A. Palet (1993) Immunization against porcine cysticercosis in an endemic area in Mexico: a field and laboratory study. Am. J. Trop. Med. Hyg. 49(4): 502-512
- Nanduri, J. and Kazura, J.W. (1989) Paramyosin enhanced clearance of *Brugia malayi* microfilaremia in mice. J. Immunol. 143:3359.
- Nara, T., Matsumoto, N., Janecharut, T., Matsuda, H., Yamamoto, K., Irimura, T., Nakamura, K., Aikawa, M., Oswald, I., Sher, A. (1994) Demonstration of the target molecule of a protective IgE antibody in secretory glands of *Schistosoma japonicum* larvae. Int Immunol 6: 963-71
- Nascimento, E., Costa, J.O., Guimaraes, M.P., Tavares, C.A. (1995) Effective immune protection of pigs against cysticercosis. Vet. Immunol. Immunopathol. 45:127-37
- Oaks, J. and Lumsden, R.D. (1971) Cytological studies on the absorptive surface of cestodes. V. Incorporation of carbohydrate containing macromolecules into tegument membranes. J. Parasitol. 1256-1268.
- Pathak, K.M.L. and Gaur, S.N.S. (1990) Immunization of pigs with culture antigens of *Taenia solium*. Vet. Parasit. 34:353-356.
- Pearce, E.J., James, S.L., Dalton, J., Barrall, A., Ramos, C., Strand, M. y Sher, A. (1986) Immunochemical characterization and purification of Sm-97, a *Schistosoma mansoni* antigen monoespecifically recognized by antibodies from mice protectively immunized with a non-living vaccine. J. Immunol. 137:3593-3600.
- Pearce, E.J., James, S.L., Lanar, D.E. y Sher, A. (1988) Induction of protective immunity against *Schistosoma mansoni* by vaccination with schistosoma paramyosin (Sm97), a nonsurface parasitic antigen. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5678-5682.
- Plancarte, A., Flisser, A. y Larralde, C. (1982) Fibronectin-like properties of antigen B from cysticerci of *Taenia solium*. En Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives. Flisser, A., Willms, K., Lacleite, J.P., Larralde, C., Ridaura, C. and Beltrán, F. (eds). New York. Academic Press. pp. 453-463.

**Rabiela, M.T.** (1989) Cisticercosis humana: relación inmunológica huésped parásito. En "Cisticercosis humana y porcina. Su conocimiento e investigación en México. Flisser, A. y Malagón, F. (eds). Limusa. México. pp 107-123.

**Ramírez-Bon, E., Merchant, M.T., Gonzales-Del pliego, M., Cañedo, L.** (1982) Ultrstructure of the bladder wall worm of the metacestode of *Taenia solium*. En Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives. Flisser, A., Willms, K., Laclette, J.P., Larralde, C., Ridaura, C. and Beltrán, F. (eds). New York. Academic Press. pp.261-280.

**Richter, D., Reynolds, S.R. and Harn, D.A.** (1993) Candidate vaccine antigens that stimulate the cellular immune response of mice vaccinated with irradiated cercariae of *Schistosoma mansoni*. J. Immunol. 151:256-265.

**Richter, D. and Harn, D.A.** (1993a) Candidate vaccine antigens identified by antibodies from mice vaccinated with 15- or 50-Kilorad-irradiated cercariae of *Schistosoma mansoni*. Infect. Immun. 61:146-154.

**Rock, K.L., Rothstein, L., Gamble, S., Fleischacker, C.** Characterization of antigen-presenting cells that present exogenous antigens in association with class I MHC molecules. J. Immunol. 150:438-46.

**Rossi-Bergmann, B., Muller, I., Godinho, E.B.** (1993) TH1 and TH2 T-cell subsets are differentially activated by macrophages and B cells in murine leishmaniasis. Infect. Immun. 61:2266-9.

**Schmitz J, Radbruch, A.** (1992) Distinct antigen presenting cell-derived signals induce TH cell proliferation and expression of effector cytokines. Int. Immunol. 4:43-51.

**Sciutto, E.** (1990) Aportaciones de la cisticercosis murina experimental por *Taenia crassiceps* al conocimiento de los factores biológicos que participan en la susceptibilidad a la infección por metacéstodos y al diagnóstico y prevención de la cisticercosis por *Taenia solium*. Tesis, UNAM, México, p. 234.

**Sciutto, E., Fragoso, G., Trueba, L., Lemus, D., Montoya, R.M., Díaz, M.L., Govezensky, T., Lomeli, C., Tapia, G., and Larralde, C.** (1990) Cysticercosis vaccine: cross protecting immunity with *T. solium* antigens against experimental murine *T. crassiceps* cysticercosis. Parasite Immunology 12:687-696.

**Sciutto, E., Fragoso, G., Baca, M., De la Cruz, V., Lemus, L. and E. Lamoyi** (1993) Depressed T-cell proliferation associated with susceptibility to experimental *Taenia crassiceps* infection. Infect. Immun. 63(6):2277-2281.

**Sciutto, E., Aluja, A., Fragoso, G., Rodarte, L.F., Hernández, M., Villalobos, M.N., Padilla, A., Keilbach, N., Baca, M., Govezensky, T., Díaz, S., Larralde, C. (1995a)** Immunization of pigs against *Taenia solium* cysticercosis: factors related to effective protection. *Veterinary Parasitology* 60:53-67.

**Scaley, M., and Ortiz-Ortiz, L. (1982)** Cellular immunity in cysticercosis: a review. *Cysticercosis: Present State of Knowledge and Perspectives*. Flisser, A., Willms, K., Lacleste, J.P., Larralde, C., Ridaura, C. and Beltrán, F. (eds). Academic Press. New York, U.S.A. pp. 565-574.

**Shankar, S.K., Ravi, V., Suryanarayana, V., Chandramukhi, A., Ravikumar, B.V. (1995)** Immunoreactive antigenic sites of *Cysticercus cellulosae* relevant to human neurocysticercosis--immunocytochemical localization using human CSF as source of antibody. *Clin-Neuropathol.* 14(1): 33-6

**Silvennoinen-Kassinen, S., Jakkula, H. and Karvonen, J. (1989)** *J. Invest. Dermatol.* 86:18.

**Silverman, P. (1954)** Studies on the biology on some tapeworm of the genus *Taenia*. I. Factors affecting hatching and of taeniid ova, and some criteria of their viability. *Ann. Trop.Med. and Parasitol.* 48:207.

**Slais, J. (1970)** The morphology and patogenicity of the bladder worms *Cysticercus cellulosae* and *Cysticercus bovis*. Academia (Publishing house the Czechoslovak Academic of Sciences). Prague. p.144.

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

**Stockinger, B. (1992)** Capacity of antigen uptake by B cells, fibroblasts or macrophages determines efficiency of presentation of a soluble self antigen (C5) to T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 22:1271-8.

**Tato, P., Valles, Y. and J.L. Molinari. (1987)** Effect of immunization in immunodepressed hogs naturally parasitized with *Cysticercus cellulosae*. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 29:67-71

**Tato, P., Castro, A.M. Rodríguez, D., Soto, R., Arechavaleta, F. and J.L. Molinari. (1995)** Suppression of murine lymphocyte proliferation induced by a small RNA purified from the *Taenia solium* metacestode. *Parasitol. Res.* 81:181-187.

**Terrazas, L.I., Bojalil, R. Govezensky, T. and Larralde, C. (1994)** A role of 17- $\beta$ -estradiol in immunoendocrine regulation of murine cysticercosis. *J. Parasitol.* 80:563-568.

- Trimble, J. y Lumsden, R.D.** (1975) Cytochemical characterization of tegument membrane associated carbohydrates in *Taenia crassiceps* larvae. *J. Parasitol.* 61:665-676.
- Vázquez, J.** (1993) Distribución de epítopes para células B de un antígeno inmunodominante en la cisticercosis humana. Tesis de Licenciatura. Unidad Académica de los Ciclos Profesional y de Posgrado del C.C.H./ Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. 1993.
- Velasco-suárez, M., Bravo, M.A. y Quirasco, F.** (1982) Human cysticercosis: medical implication and economic impact. En *Cysticercosis: Present State of Knowledge and Perspectives*. Flisser, A., Willms, K., Lacleste, J.P., Larralde, C., Ridaura, C. and Beltrán, F. (eds). Academic Press. New York, U.S.A. pp. 47-52.
- Vidard, L., Rock, K.L., Benacerraf, B.** (1992) Heterogeneity in antigen processing by different types of antigen-presenting cells. Effect of cell culture on antigen processing ability. *J Immunol.* 149:1905-11.
- Weller, P.F.** (1994) Eosinophils: structure and functions. *Current Opinion in Immunology.* 6:85-90.
- Williams, J.F., Engelkirk, P.G. and Lindsay, M.C.** (1982) Mechanisms of immunity in rodent cysticercosis. *Cysticercosis: Present State of Knowledge and Perspectives*. Flisser, A., Willms, K., Lacleste, J.P., Larralde, C., Ridaura, C. and Beltrán, F. (eds). Academic Press. New York, U.S.A. pp. 621-632.
- Willms, K., Merchant, M.T., Arcos, L., Sealey, M., Díaz, S. and Díaz de León, L.** (1980) Immunopathology of cysticercosis. In: Larralde, C., Willms, K., Ortiz, L., Sela, M. (eds.) *Molecules, cells and parasites in immunology*. Academic Press, New York, pp 145-162.
- Woodhouse, E., Flisser, A. and Larralde, C.** (1982) Seroepidemiology in human cysticercosis in México. *Cysticercosis: Present State of Knowledge and Perspectives*. Flisser, A., Willms, K., Lacleste, J.P., Larralde, C., Ridaura, C. and Beltrán, F. (eds). Academic Press. New York, U.S.A. pp. 11-23.
- Yang, W., Waine, G.J., McManus, D.P.** (1995) Antibodies to *Schistosoma japonicum* (Asian bloodfluke) paramyosin induced by nucleic acid vaccination. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 212: 1029-39