



00346 5
29
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS
DE POSGRADO

ANTIGENOS RECOMBINANTES
DE TAENIA CRASSICEPS:
IDENTIFICACION Y CARACTERIZACION
DE ANTIGENOS RELEVANTES
EN LA RELACION HOSPEDERO-PARASITO.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS (BIOLOGIA CELULAR)
P R E S E N T A
RUTILIA MARISELA HERNANDEZ GONZALEZ

DIRECTORA DE TESIS: DRA. EDDA L. SCIUTTO CONDE

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1998 267693



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.

PAGINACION
DISCONTINUA

PAGINACIÓN
DISCONTINUA

Esta tesis se realizó en el Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, bajo la dirección de la Dra. Edda Sciutto Conde y con el asesoramiento del Dr. Karen Manoutcharian y el Dr. Fernando López- Casillas

AGRADECIMIENTOS.

Agradezco a mi jurado

Dra. Edda Sciutto Conde.
Dra. Gladis Fragoso González.
Dr. Abraham Landa Piedra.
Dra. Cecilia Teresa Ximenez García.
Dra. Bertha Espinoza Gutiérrez.
Dr. Roberto Hernández Fernández.
M en C. Luis Ignacio Terrazas Valdez.

Por la cuidadosa revisión al presente trabajo así como las sugerencias propuestas a fin mejorar éste.

DEDICATORIAS

Dedicada especialmente

A mis papás; Raymundo y Natalia.

A mis hermanos; Christian, Bruce, Haruko, Raymundo, Mónica, Claudia y Patricia.

A mis sobrinos; Edwin y Brandon.

Por ser parte fundamental en el pasado, el presente y el futuro de mi vida.

A Cecilia Appleton,

Quién me introdujo a ese mundo maravilloso que es la danza y la expresión corporal, haciéndola formar parte integral en el desarrollo de mi vida

A quienes le han continuado,

Alita Winsburgh

Mirta Blostein

Eduardo Ribo

Cynthia Monroy

Cora Flores

A los que siguen.

A todos los compañeros con los que he compartido esta experiencia de vida.

A Edda,

Por todo su apoyo y comprensión.

A Alejandro,

Por haber sido mi primera aproximación al mundo de la investigación.

A Karen Manoutcharian,

Por guiarme a ese mundo infinito que es la Biología Molecular.

A Gonzalo,

Por ser un buen amigo.

A todos los compañeros del laboratorio y en si del departamento de Inmunología por toda su ayuda y amistad.

GRACIAS.

Por lo que he sido.
por lo que soy.
por lo que seré.
A ese destino que desconozco
y que me depara
aún sabiendo que es tan incierto,
desconocido y misterioso.

A los sueños soñados,
a los sueños vividos,
a las fantasías hechas realidad,
por todo lo que he conocido y que nunca soñé conocer.

Porque esta vida sea un sueño vivido
o sea una vida soñada,

Por afuera estas dormida y por dentro sueñas,
los ojos que se abren para mirar lo oscuro,
los brazos que se ensanchan para volverse alas,
lo oscuro que se ahonda hasta volverse cielo.

Homero Aridjis

INDICE

	Página.
I. Resumen.	1
II. Introducción.	3
III. Antecedentes.	8
IV. Objetivos.	18
V. Diseño Metodológico.	19
VI. Materiales y Métodos.	20
VII. Resultados.	26
• Cysticercosis: Identification and cloning of protective recombinant antigens Manoutcharian, K., Rosas, G., Hernández, M. , Fragoso, G., Aluja, A., Villalobos, N., Rodarte, L.F. and Sciutto E. (1996). <i>J. Parasitol.</i> 82 : 250-254.	
• Immunodominant synthetic peptides of <i>Taenia crassiceps</i> in murine and human cysticercosis. Gevorkian, G., Manoutcharian K., Larralde, C., Hernández, M. , Almagro, J.C., Viveros, M., Sotelo, J., García, E. and Sciutto, E. (1996). <i>Immunol. Lett.</i> 49 : 185-189.	
VIII. Discusión.	46
IX. Perspectivas.	54
X. Apéndice I.	55
Técnicas y estrategias utilizadas en el desarrollo del trabajo experimental	
XI. Apéndice II.	90
Análisis de identidad de las clonas recombinantes KETc1, KETc7, KETc11 y KETc12	
XII. Apéndice III.	95
Respuesta inmune y susceptibilidad a infecciones parasitarias.	
XIII. Bibliografía.	107

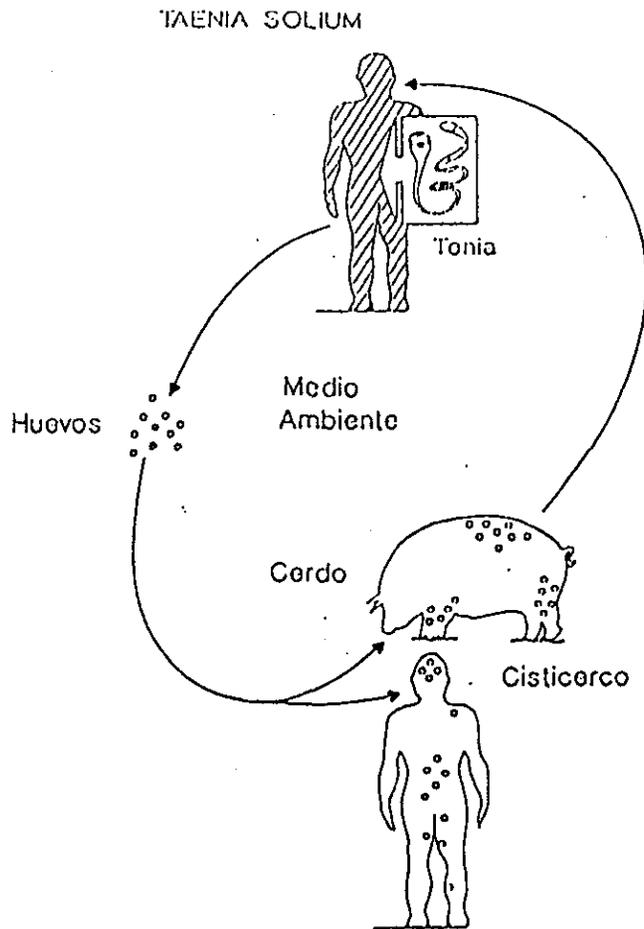


Figura 1. Ciclo de vida de *Taenia solium* (Tomado de Toledo., 1995)

I. RESUMEN

En esta tesis se incluye la identificación y caracterización de secuencias de ADN que codifican para proteínas relevantes en la relación hospedero-parásito (cisticerco) y de interés en la inmunoprevención contra la cisticercosis.

Con el fin de identificar antígenos de interés para el diseño de una vacuna, se tamizó una librería de ADNc utilizando un anticuerpo policlonal específico contra 3 fracciones antigénicas protectoras del cisticerco de *Taenia crassiceps*. Este tamizaje permitió la identificación de 5 clonas recombinantes (KETc1, KETc4, KETc7, KETc11 y KETc12). Lisados bacterianos de estas clonas fueron evaluados en su capacidad protectora contra la cisticercosis murina causada por *Taenia crassiceps*.

Las clonas KETc 1, 4, 7 y 12 resultaron ser protectoras, en tanto la clona KETc11 no tuvo efecto alguno. Las clonas fueron secuenciadas para conocer la secuencia de la proteína recombinante protectora. Los resultados indican que las clonas KETc1, KETc11 y KETc12 codifican para polipéptidos de 12, 6 y 8 aminoácidos, respectivamente, y la clona KETc7 para una de 96 aminoácidos.

Los análisis de identidad indican que los péptidos KETc1, KETc11 y KETc12 no forman parte de dominios proteicos de alguna relevancia funcional y/o estructural. En tanto, la proteína KETc7 presentó identidad con proteínas ricas en prolina, extensinas, y con algunas protein cinasas. La secuencia de la proteína KETc7 presenta dos motivos característicos de extensinas, Serina-(Prolina) 3. Las extensinas han sido identificadas en la pared de células vegetales y la cubierta del huevecillo de *Schistosoma japonicum* y *hematobium* y han sido asociadas con fenómenos de desarrollo y diferenciación. Dichos hallazgos señalan la relevancia que representa esta proteína en el estudio de la cisticercosis. Por otra parte, la secuencia nucleotídica de la clona KETc11 presentó 56% de identidad con una secuencia que codifica para una subunidad de 8 kDa del antígeno B de *Echinococcus granulosus* y 100% de identidad con la proteína recombinante pTCA 5.5, que ha sido previamente reportada por Zarlenga y col. (1994) como de interés en el diagnóstico de la cisticercosis bovina. Sin embargo, la proteína recombinante KETc11 evaluada en los experimentos de vacunación consistió en un péptido de 6 aminoácidos y cuya relevancia queda aún por confirmar.

La secuencia proteica KETc7 fue sometida a un análisis de predicción de epítopes a través del cual fueron identificadas 3 regiones altamente antigénicas (GK-1, GK-2 y GK-3), las cuales fueron sintetizadas químicamente y evaluadas en su capacidad para ser reconocidos por sueros de individuos infectados con cisticercos de *Taenia crassiceps* y *Taenia solium*. Los 3 péptidos mostraron resultados alentadores en el diagnóstico y prevención contra la cisticercosis causada por *T. solium*. Por otra parte, los péptidos GE-111.1 y GE-112, provenientes de la secuencia proteica KETc 11/ pTcA5.5, también están siendo evaluados bajo las mismas condiciones utilizadas para GK-1, GK-2 y GK-3.

Los resultados obtenidos establecen las bases para la utilización de este tipo de estrategias en el avance y diseño de nuevos procedimientos de diagnóstico, así como el desarrollo de vacunas sintéticas basadas en la combinación adecuada de péptidos inmunogénicos.

II. INTRODUCCION

La cisticercosis por *Taenia solium* es una zoonosis parasitaria de gran importancia en nuestro país. Es una enfermedad causada por el establecimiento de las larvas de *T. solium* en los tejidos de sus huéspedes intermediarios: el cerdo y el hombre.

La cisticercosis en el hombre se presenta en diferentes localizaciones, músculo esquelético, ojo y sistema nervioso central (SNC) siendo esta la localización más importante por sus consecuencias en la salud humana. En el cerdo se localiza en orden prioritario en lengua, ánconeos, tríceps, intercostales y en distinta extensión invadiendo todas las masas musculares (Aluja et al., 1987)

Tanto el hombre como el cerdo adquieren la cisticercosis por la ingestión de huevos de *T. solium* que son expulsados durante la defecación de un portador del parásito adulto (solitaria) (Fig. 1). El ciclo de vida del parásito se ve favorecido por prácticas asociadas al subdesarrollo, entre las que figuran la defecación al aire libre, los malos hábitos de higiene, la falta de drenaje, el inadecuado procesamiento de heces fecales, la crianza rústica de cerdos alimentados con desperdicios y heces humanas, además de la inadecuada e insuficiente inspección sanitaria. Si bien la cisticercosis actualmente es un padecimiento frecuente, principalmente, en los países subdesarrollados de Latinoamérica, Asia y Africa (Mahajan et al., 1982), también se han reportado casos aislados en países desarrollados, probablemente como consecuencia de la inmigración de poblaciones de bajos recursos. Por la severidad del cuadro clínico que provoca y su alta frecuencia, la neurocisticercosis es uno de los problemas de salud neurológicos más importantes. En la salud humana implica altos costos por gastos para la identificación, diagnóstico y tratamiento del paciente, a través de pruebas imagenológicas, la frecuente hospitalización o intervención quirúrgica, así como la incapacidad de trabajo para el desarrollo normal de actividades laborales (Flisser y Malagón, 1989). En la porcicultura ocasiona cuantiosas pérdidas económicas por el decomiso de carne parasitada

Los estudios epidemiológicos sobre la cisticercosis humana, indican una prevalencia del 1.9% en casos de defunción causada por cisticercosis cerebral y 3.5% de cisticercosis identificada en necropsias (Flisser, et al. 1979). El último estudio seroepidemiológico realizado por Larralde y col. incluyó el análisis de aproximadamente 70, 000 muestras de sueros recolectados durante la encuesta seroepidemiológica de 1989, los resultados indicaron una seroprevalencia nacional promedio del 1.2 %, siendo más afectados los estados del bajío (Tabla 1, Figura 2) (Larralde et al. 1992). Sin embargo, su incidencia real aún no ha sido determinada con precisión, ya que aproximadamente el 50% de los individuos cursan asintomáticos (Flisser et al., 1980)

Entidad	Población Muestral	Seropositividad	
		No. de Población	Porcentaje
Baja California Sur	1 739	1	0.06
Sonora	2 251	5	0.22
Baja California Norte	1 605	5	0.31
Tabasco	2 958	10	0.34
San Luis Potosí	2 125	10	0.47
Tlaxcala	1 434	7	0.49
Nuevo León	3 174	16	0.50
Tamaulipas	1 937	10	0.52
Veracruz	2 257	12	0.53
Coahuila	1 997	12	0.60
Oaxaca	1 709	12	0.70
Sinaloa	2 292	17	0.74
Chihuahua	2 194	17	0.77
Querétaro	1 642	13	0.79
Campeche	1 541	13	0.84
Morelos	1 254	13	1.04
Chiapas	1 912	20	1.05
Hidalgo	2 042	23	1.13
Estado de México	2 837	34	1.20
Yucatán	1 775	23	1.30
Colima	1 703	23	1.35
Puebla	2 814	38	1.35
Michoacán	2 036	29	1.42
Quintana Roo	1 515	22	1.45
Aguascalientes	1 518	24	1.58
Durango	1 963	31	1.58
Nayarit	1 474	30	2.04
Jalisco	3 563	75	2.10
Guanajuato	2 970	66	2.22
Zacatecas	2 162	58	2.73
Distrito Federal	2 644	78	2.95
Guerrero	1 717	51	2.97
Total	66 754	799	1.20

a Títulos por HAI > 1:80

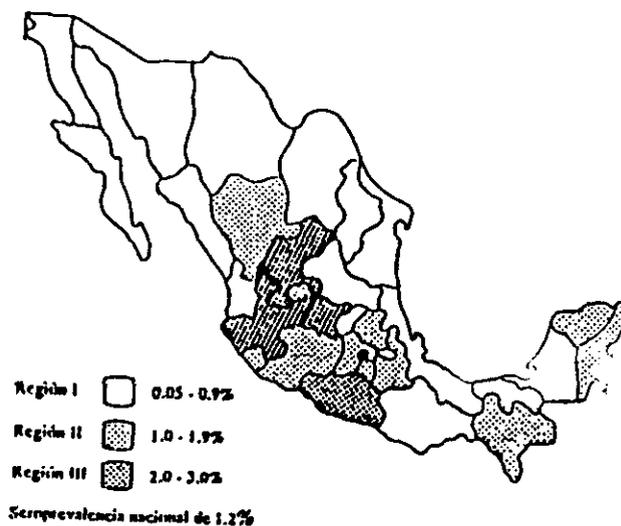


Figura 2. Población de 1 a 98 años según seroprevalencia de anticuerpos por entidad federativa, México 1987-1988

Tabla 1. Seroprevalencia de anticuerpos contra el cisticerco de *Taenia solium*, reportados por entidad federativa en la población abierta de 1 a 98 años (Tomado de Larralde et al., 1992).

Figura 2. Distribución de la seroprevalencia en el República Mexicana (Tomado de Larralde et al., 1992).

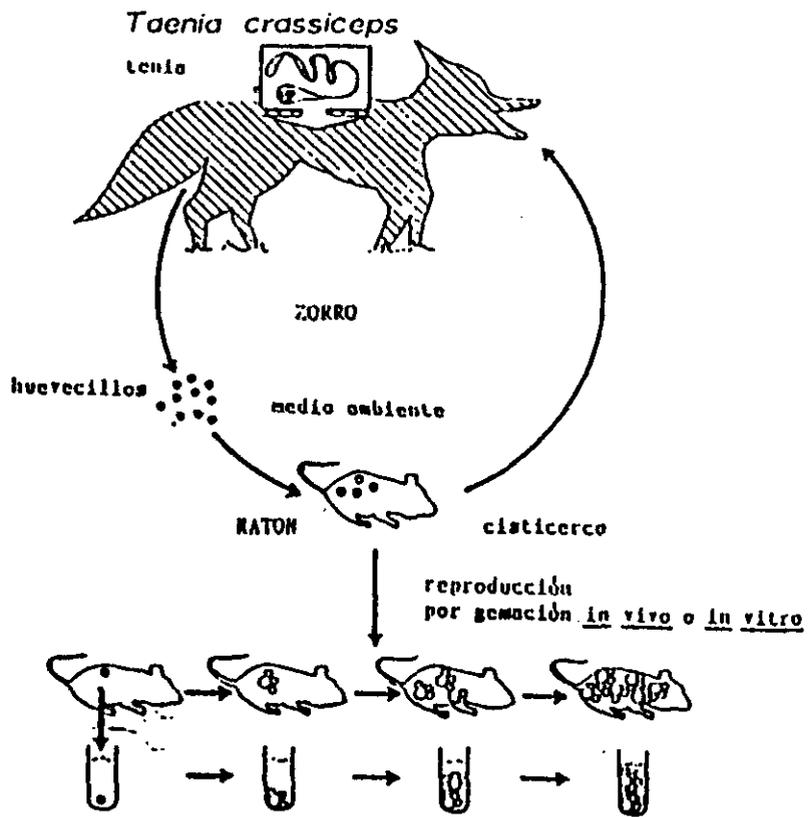


Figura 3. Ciclo de vida de *Taenia crassiceps* (Tomado de Toledo., 1995)

La elevada frecuencia de esta parasitosis y las graves consecuencias que ocasiona justifican la búsqueda de estrategias que permitan prevenirla. Considerando que la transmisión de la cisticercosis se ve favorecida por un conjunto de circunstancias cuyas bases radican en problemas sociales y económicos característicos del subdesarrollo, el establecimiento de medidas de control efectivas, debería enmarcarse en un conjunto de estrategias tendientes a modificar las circunstancias que la favorecen (estableciendo medidas de higiene/sanitización, instalación de drenajes, suministro adecuado de agua potable, inspección sanitaria en rastros y crianza de cerdos en condiciones tecnificadas). Adicionalmente, en nuestro grupo de investigación se han establecido proyectos dirigidos a reducir la susceptibilidad del hospedero intermediario (cerdo) con el fin de interrumpir el ciclo de transmisión del parásito. Con éste propósito se han concentrado nuestros esfuerzos en el desarrollo de una vacuna contra la cisticercosis porcina. Para facilitar la búsqueda de antígenos de interés para dicho propósito, hemos utilizado el modelo de cisticercosis murina causada por *Taenia crassiceps*. Este céstodo tiene como hospederos definitivo de la fase adulta a zorros, perros y felinos (Rietschel, 1981; Ralston y Heath, 1995) y como hospedero intermediario a roedores, fase larvaria o cisticerco. Las principales características que nos han permitido considerar la utilización de éste modelo para avanzar en el estudio y conocimiento de la cisticercosis son: 1) el cisticerco de *Taenia crassiceps* crece naturalmente en el ratón, especie altamente reproducible, accesible y fácil de manejar e instalar en el laboratorio, además de ser la especie más estudiada y controlada genéticamente lo que hace posible el estudio sistemático de los fenómenos inmunológicos que se suceden en la relación hospedero-parásito, 2) presenta un tipo de reproducción por gemación que permite obtener en 2-3 meses una gran cantidad de parásitos (Freeman, 1962) para su estudio y aplicación de manera extensa, 3) presenta grandes similitudes con la cisticercosis por *Taenia solium*, como: a) la participación activa de hospederos intermediarios (ratón-zorro y hombre-cerdo, respectivamente) donde se desarrolla naturalmente la cisticercosis (Figura 3). b) presencia de antígenos compartidos (Larralde et al., 1989), c) los antígenos de *Taenia solium* y *Taenia crassiceps* protegen contra el desafío de *T. crassiceps* en el ratón, es decir los antígenos compartidos son capaces de proteger la infección causada por ambos céstodos. Esta protección cruzada también se ha observado en cerdos vacunados con antígenos de *Taenia crassiceps* (Sciutto et al., 1990, 1995).

Con el propósito de identificar antígenos de interés en el diseño de una vacuna, en estudios previos evaluamos 12 fracciones antigénicas del cisticerco de *Taenia crassiceps* en su capacidad protectora contra la cisticercosis murina (Valdez et al., 1994). Tres de las fracciones evaluadas (56, 66 y 72 kDa) presentaron una elevada capacidad protectora y su efecto fue confirmado en la cisticercosis porcina (Manoutcharian et al., 1996).

En este trabajo de tesis se utilizó una librería de ADNc de cisticercos de *T. crassiceps* en la cual fueron seleccionadas clonas de interés en prevención, utilizando anticuerpos específicos contra las fracciones antigénicas protectoras de 56, 66 y 74 kDa. Las clonas identificadas fueron caracterizadas inmunológicamente, secuenciadas y analizadas.

Las secuencias proteicas de cada una de las clonas están siendo sometidas a un análisis de predicción de epitopes B para la identificación y síntesis de aquellos que presenten mayor nivel de antigenicidad a fin de evaluar su capacidad diagnóstica en la detección de individuos cisticercosos. En esta tesis se presentan algunos de los resultados obtenidos en la evaluación de péptidos sintéticos.

Por otra parte, las secuencias nucleotídicas de los péptidos y proteínas protectoras fueron sometidas a un análisis de homología para determinar si las secuencia encontradas ya habían sido previamente reportadas o si presentaban homología con proteínas conocidas con funciones determinadas para de esta forma poder especular sobre su posible funcionalidad en el estudio de la cisticercosis..

III. ANTECEDENTES

En el hombre, la neurocisticercosis puede ser asintomática y/o aparecer hasta 30 años después de haber estado en contacto con el parásito (Dixon and Lipscom, 1961). Esto hace suponer que el parásito puede sobrevivir por largos periodos evadiendo la respuesta del hospedero. Aún cuando existen numerosos estudios sobre la cisticercosis humana y porcina, la mayoría de estos se derivan de estudios post-mortem en infecciones naturales bajo condiciones no controladas

Una de las características más sobresaliente de la cisticercosis es la gran heterogeneidad en la sintomatología y la respuesta inmunológica con la que se manifiesta esta enfermedad. En aproximadamente el 50 % de los casos de cisticercosis humana la enfermedad ocurre de forma asintomática, en tanto, en el otro 50% podemos observar una severa reacción inmunológica capaz de desencadenar cuadros neurológicos con síntomas que pueden ser leves o severos, dependiendo de la localización y el tipo de relación hospedero-parásito que se establezca. En ocasiones la presencia de un parásito es capaz de desencadenar una severa sintomatología, y por el contrario, la presencia de grandes cantidades de parásitos puede no causar sintomatología alguna. En éste caso, la permanencia del parásito se presenta con una aparente insuficiencia del hospedero para destruir al metácestodo de *T. solium* y en los casos que ocurre tal destrucción, se desconocen los procesos que conducen a la muerte del parásito (Willms y col. 1982).

El conocimiento de la respuesta inmune en la relación hospedero-parásito es importante para conocer y entender las interacciones y fenómenos que se suceden en la cisticercosis. Para tal efecto se requiere la búsqueda e identificación de los diversos factores y componentes, del hospedero y del parásito, involucrados en el establecimiento y desarrollo de la enfermedad, siendo importante considerar:

- La evaluación de la respuesta inmune humoral: La detección de anticuerpos en contra del parásito, como base del inmunodiagnóstico, el cual permite predecir si un individuo alberga al parásito o ha estado en contacto con éste, además de proporcionar información sobre la relevancia de la respuesta humoral durante el transcurso de la infección.
- La identificación de moléculas del hospedero y del parásito relevantes en la parasitosis: Identificación de moléculas involucradas en la interacción de los mecanismos de la respuesta inmune del hospedero y aquellos que emplea el cisticerco para sobrevivir y controlar la infección (Ver Apéndice III).
- La identificación de elementos de los componentes del parásito capaces de inducir una respuesta inmune protectora.

Actualmente, la aplicación de técnicas de ADN recombinante y síntesis de péptidos en el estudio de la cisticercosis y otras parasitosis, presentan amplias expectativas en la optimización de procedimientos de diagnóstico, así como en el diseño y desarrollo de nuevas vacunas.

En esta tesis se presentan los resultados obtenidos en la utilización de dichas técnicas para el estudio y control de la cisticercosis.

Cisticercosis: Métodos de diagnóstico y estudio de la respuesta inmune humoral

Series de autopsias y análisis serológicos indican que el índice de morbilidad es tan alto que ésta enfermedad ha sido reconocida como una de las principales causas de enfermedad neurológicas a nivel mundial (Tsang y Wilson, 1995)

En nuestro país, la cisticercosis es una enfermedad común y se reporta el 1.9 % en series de autopsias (Flisser *et al.*, 1979) y una seroprevalencia del 1.2 %, según la encuesta serológica de 1989 (Tabla 1, Larralde *et al.*, 1992). Considerando la alta prevalencia de esta enfermedad, es importante disponer de métodos de diagnóstico específicos y sensibles que nos permitan identificar y evaluar con precisión el nivel de incidencia real. Actualmente, a nivel hospitalario el diagnóstico inmunológico solo se considera como complementario al diagnóstico clínico, debido a que los procedimientos actualmente disponibles no presentan la sensibilidad y especificidad adecuada (Ramos- Kuri *et al.*, 1992). Así, consideramos importante llevar a cabo estudios inmunológicos que apoyen el diseño y desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico más sensibles y específicos, que permitan la identificación de individuos naturalmente infectados. El disponer de métodos de inmunodiagnóstico que permitan la confirmación y el seguimiento del paciente neurocisticercoso, adquiere mayor importancia si se compara con el costo de los estudios de gabinete como TAC (Tomografía Axial Computarizada) e IRM (Imagen de Resonancia Magnética Nuclear).

En nuestro país, desde hace varios años, han surgido diversos grupos de investigación que se han enfocado al perfeccionamiento y evaluación de diversas técnicas de inmunodiagnóstico. Sin embargo, la utilidad que brindan no es aún óptima y varía en función de factores como son: el antígeno utilizado, sensibilidad de la prueba, concentración de anticuerpos en la muestra analizada (líquido cefalorraquídeo o suero), intensidad de la reacción inmunológica, número de parásitos presentes, tiempo de evolución de la parasitosis, localización y estado evolutivo de la enfermedad. Entre los procedimientos serológicos que han sido evaluados se incluyen las pruebas de hemaglutinación indirecta, fijación de complemento (reacción de Nieto) y ELISA (Larralde *et al.*, 1986). Recientemente, estudios reportados por Tsang y col. (1989) han desarrollado un procedimiento de diagnóstico de inmunoelectrotransferencia (IET) basado en el uso de antígenos purificados por fijación a lentil lectina. Aunque los autores reportaron que ésta prueba presenta una alta sensibilidad y especificidad, la experiencia de su uso en distintas instituciones (Sotelo, comunicación personal) indica que en el medio endémico presenta menor sensibilidad y especificidad que la reportada.

Es probable que la principal dificultad en el desarrollo de ensayos altamente específicos y sensibles se deba a la heterogeneidad del cuadro clínico y la respuesta inmune que presentan los pacientes con cisticercosis. Se estima que el 50% de los pacientes neurocisticercosos cursan asintomáticos y/o con baja o ausente reacción de anticuerpos en

contra del parásito (Flisser *et al.*, 1980). Por otra parte, la baja especificidad probablemente sea una consecuencia de la detección de antígenos compartidos con otros parásitos. Resulta de relevancia el desarrollo de nuevas pruebas de diagnóstico que presenten alta sensibilidad, especificidad, reproducibilidad, así como accesibilidad técnica que facilite su utilización. El disponer de un ensayo diagnóstico con estas características sería de gran interés para la confirmación del diagnóstico clínico, a nivel hospitalario, así como para la realización de estudios seroepidemiológicos que permitan la identificación de focos con alta prevalencia de infección, a fin de implementar campañas y medidas preventivas que reduzcan el riesgo de incidencia.

La aplicación de las técnicas de ADN recombinante al estudio de la inmunología y prevención de las enfermedades parasitarias está siendo considerada como una de las tecnologías que permiten el mejoramiento de las pruebas diagnósticas, a través de la identificación y obtención en gran escala, de proteínas recombinantes de interés en el estudio, detección y evaluación de diversas parasitosis. En este sentido, la utilización de proteínas recombinantes ha logrado aumentar la especificidad y sensibilidad de las técnicas serológicas en el diagnóstico de diversas infecciones como por ejemplo la Echinococcosis alveolar humana (Muller *et al.*, 1989); la infección causada por *Echinococcus multilocularis* (Hemmings y McManus, 1989; Vogel *et al.*, 1988); *Echinococcus granulosus* (Ferreira y Zaha, 1994), infecciones por *Taenia ovis* en perros (Ralston y Heath, 1995; Rhoads *et al.*, 1991; Zarlenga *et al.*, 1994) y en la cisticercosis cerebral humana (Fisher *et al.*, 1994)

Otra de las herramientas que ha permitido avanzar en el inmunodiagnóstico de las enfermedades parasitarias, es la síntesis de péptidos. Para su implementación se requiere la identificación de epítopes específicos capaces de detectar la inmunidad producida ante una infección. La utilización de péptidos sintéticos como fuente antigénica presenta varias ventajas entre las cuales se considera su capacidad para ser sintetizados y producidos en grandes cantidades, obtenerse libres de contaminantes biológicos, además de presentar una elevada estabilidad lo cual reduciría considerablemente el costo de esta clase de pruebas. La evaluación de la prueba ELISA con péptidos sintéticos ha sido reportada con resultados alentadores en la detección de diferentes tipos de infecciones causadas por virus, bacterias, plathelminos y otros parásitos. Reportes previos apoyan su utilización en la identificación de individuos infectados con el virus de la inmunodeficiencia felina (Sibille *et al.* 1995), HIV- I (Lombardi *et al.*, 1992) y hepatitis tipo C (Ishida *et al.*, 1993), así como en la enfermedad autoinmune causada por *Bollus pemphigoid* (BP) (Rico *et al.*, 1990) y su aplicación en estudios seroepidemiológicos de malaria causada por *Plasmodium vivax* (Bianchi *et al.*, 1991) y la enfermedad de Chagas por *Trypanosoma cruzi* (Peralta *et al.*, 1994).

En este trabajo se incluye el primer reporte y los avances obtenidos en la identificación y evaluación de 5 péptidos sintéticos (GK-1, GK-2, GK-3, GE-111 y GE-112) provenientes del análisis de predicción de epítopes B de las secuencias contenidas en las clonas recombinantes KETc11 y KETc 7 (Gevorkian et al., 1996). Los resultados obtenidos señalan el principio del desarrollo de una estrategia tendiente al diseño y mejoramiento de pruebas diagnósticas basadas en la utilización de una fuente antigénica que incluya un conjunto de péptidos sintéticos que nos permitan detectar, con alta especificidad, el mayor porcentaje de individuos infectados.

Cisticercosis: Prevención y evaluación de moléculas relevantes en su capacidad protectora contra la cisticercosis.

En el estudio y prevención de la cisticercosis se ha observado que en la cisticercosis porcina, la crianza de cerdos rústicos, facilita que los animales ingieran heces fecales de humano contaminadas con huevecillos de *Taenia solium*. La falta de educación e instalación de letrinas, favorece que el ser humano practique el fecalismo al aire libre, aumentando el riesgo de que los cerdos y el mismo hombre adquiera la parasitosis, además de favorecer la continuación del ciclo de vida del parásito. Datos reportados sobre la frecuencia de cisticercosis porcina indican que en 1982, la detección de cisticercosis por inspección en pie, se presentó en el 20% de los cerdos inspeccionados (Aluja, 1987). En estudios adicionales, Romero e Inclán reportaron 38.6 % y 30.4% en la inspección de rastros del Distrito Federal, respectivamente (Romero, 1980 e Inclán, 1981). Actualmente, la cisticercosis porcina en México, presenta una frecuencia superior a la reportada por la inspección sanitaria, ya que dichos estudios no reflejan la prevalencia real, pues no incluyen los cerdos criados en condiciones rústicas que no llegan a los rastros en los que se lleva a cabo este tipo de inspección.

Actualmente el impacto de la teniasis/cisticercosis en la salud humana y sus consecuencias en la porcicultura indican la importancia de la aplicación de medidas de control capaces de interrumpir la transmisión de la infección a nivel regional o nacional. Estas medidas se han dirigido principalmente a:

- Reducir el número de humanos infectados por *T. solium*, identificando y tratando al portador teniasico.
- Reducir el riesgo de contraer teniasis, mejorando la crianza de cerdos e implementando técnicas de inspección sanitaria eficientes.
- Reducir el riesgo de contraer teniasis/cisticercosis implementando:
 - a) Campañas educativas. Dirigidas a concientizar a la población sobre el riesgo de adquirir la parasitosis, así como proporcionar y difundir información para el mejoramiento de los hábitos de higiene.
 - b) Construcción de letrinas. Para la disposición adecuada de excretas.
 - c) Desarrollo de medidas de control a través de vacunas que permitan controlar y/o interrumpir el ciclo de vida del parásito.

Considerando la indispensable participación del cerdo en el mantenimiento del ciclo de vida del parásito, se ha sugerido la posibilidad de interrumpir la transmisión, modificando la prevalencia de cisticercosis porcina por medio de vacunación. Esta medida de control se ha propuesto como una alternativa factible de realizar, que no pretende modificar las condiciones rurales de crianza rústica de los animales.

Han sido diversos los proyectos de vacunación dirigidos al estudio y prevención de las enfermedades parasitarias entre los cuales han sido evaluados diferentes tipos de inmunógenos, ya sea utilizando los mismos parásitos atenuados, extractos totales, oncosferas irradiadas o vivas, antígenos de secreción de oncosferas en cultivo hasta antígenos purificados, proteínas recombinantes y péptidos sintéticos, ya sea en estudios experimentales y/o de campo (Johnson, *et al.*, 1989; Ito *et al.*, 1979, 1991; Rickard, *et al.*, 1991; Valdez *et al.*, 1994; Salcedo *et al.*, 1991; Molinari *et al.*, 1993, 1997; Nascimento *et al.*, 1995). Específicamente, en el estudio de la cisticercosis se han utilizado antígenos obtenidos de los 3 diferentes estadios del parásito adulto, metacéstodo y oncosfera. Este último el que ha presentado mayor capacidad de protección contra la cisticercosis causada por *Taenia psiformis* (Rickard y Katiyar, 1976). Los análisis de la respuesta inmune indica que la infección con huevecillos de *T. solium* induce una respuesta humoral capaz de inhibir el establecimiento o evaginación ya sea de la oncosfera liberada del huevecillo o de la oncosfera inmadura. En tanto, la respuesta inducida por el parásito adulto, parece ser menos efectiva para inducir altos niveles de protección contra la infección por estos mismos.

En la infección por *T. taeniaeformis* y *Taenia pisiformis*, la vacunación con extracto crudo de cisticercos de *Taenia taeniaeformis*, induce altos niveles de protección, reduciendo hasta en un 75% el establecimiento y desarrollo de las oncosferas de dichos parásitos (Campbell, 1936). La localización de los antígenos protectores indica que estos están presentes en el metacéstodo y forman parte de la membrana del estróbilo. El análisis antigénico de la oncosfera de *T. pisiformis* indica la presencia de al menos 6 antígenos protectores, dos de los cuales son glicoproteínas con un peso molecular mayor a 200,000 kDa. En estudios posteriores, Rickard y Katiyar evaluaron el efecto de vacunación en conejos inmunizados con medio de cultivo de larvas de *T. pisiformis*, observando un efecto protector después de excluir el material mayor a 300,000 kDa (Rickard, y Katiyar, 1976).

Sin embargo, también cabe considerar el efecto que ejerce la vacunación en la capacidad de protección al evaluar una vacuna heteróloga la cual incluye una o un conjunto de proteínas provenientes de un parásito ante el desafío de otro. La vacunación experimental heteróloga ha sido evaluada en diferentes sistemas de cisticercosis, tal es el caso de *Taenia taeniaeformis*/rata, donde la inmunización de ratones con el cisticercos intacto de *T. crassiceps*, es capaz de proteger al desafío con huevecillos de *Taenia taeniaeformis*, reduciendo la carga parasitaria del 80.4% al 46.1% (Ito *et al.*, 1991).

Tabla II. Evaluación de diferentes inmunógenos en contra de la cisticercosis porcina causada por *T. solium*

Autor	Tipo de Vacuna	No. inmunizaciones	Dosis de antígeno	Eficiencia de infección en el gpo. control	No. de cisticercos gpo. control	Eficiencia de protección (%)
Kumar <i>et al.</i> , 1987	1o y 2o. pico del fraccionamiento de antígenos de escólex de <i>Cysticercus cellulosae</i>	2	1.0 ml. de cada antígeno/cerdo	0.6	124-416	77
Pathak y Gaur., 1990	Antígenos de secreción /excreción de cultivo de oncosferas	1	5.0 ml. de antígenos de excreción / secreción	2.4	200-515	95
Molinari <i>et al.</i> , 1993	Extracto de cisticercos de <i>T. solium</i>	1	250 µg/cerdo	0.94	2-216	86
Nascimento <i>et al.</i> , 1995	Antígenos de escólex de cisticercos de <i>T. solium</i>	3	Primera dosis con 3.0 mg/cerdo y la 2a. y 3a con 300 µg/ cerdo	6	448-977	71.43
Manoutcharian <i>et al.</i> , 1996	Antígenos purificados de 56, 66 y 74 kDa de cisticercos de <i>T. crassiceps</i>	1	60 µg/kg de peso.	0.05	3-7	96
Molinari <i>et al.</i> , 1997	Extracto de cisticercos de <i>T. solium</i>	1	150 µg/cerdo	-----	-----	82

La importancia de la presencia de antígenos compartidos ha sido demostrada entre distintas clases de céstodos y las distintas fases del parásito (oncosferas vivas, cisticercos). La relevancia de la inmunoprotección cruzada también ha sido reportada en los sistemas de *T. ovis* contra *T. hydatigena*, *E. granulosus* contra *T. pisiformis* en ovejas, *T. pisiformis* y *T. hydatigena* contra *T. taeniaeformis* en ratón (Rickard y Williams, 1982).

La inmunización heteróloga en la cisticercosis murina y porcina ha demostrado ser efectiva en protección, ya que la inmunización cruzada de ratones o cerdos con extracto de cisticercos de *T. crassiceps* y *T. solium*, protegen ante el desafío con cisticercos de *T. crassiceps* y huevecillos de *Taenia solium*, respectivamente (Sciutto et al., 1990, 1995). Los resultados indican que ambos extractos son capaces de reducir la carga parasitaria en los dos hospederos. Sin embargo, estudios más específicos realizados por Sciutto y col. indican que 3 fracciones antigénicas de 56, 66 y 74 kDa, provenientes del cisticerco de *T. crassiceps*, evaluadas de manera independiente o combinada, protegen contra la cisticercosis murina y porcina, reduciendo la carga parasitaria hasta un 74.5 % en la cisticercosis murina y un 96% en la cisticercosis porcina (Valdez et al., 1994, Manoutcharian et al., 1996). Los efectos de vacunación en condiciones de transmisión rústicas realizados por Molinari y col indican que los cerdos vacunados con extracto de cisticercos de *T. solium* son capaces de protegerse en el 82-86% (Molinari et al., 1993, 1997). Sin embargo, en este estudio no se dio un seguimiento individual a los animales y dado el tiempo del experimento (un año) y las condiciones de libertad en las que se mantuvieron estos, cabe la posibilidad de que los animales inicialmente muestreados no sean los mismos que se detectaron al término del experimento. En la Tabla II se indica la eficiencia de 6 diferentes estudios de vacunación en contra de la cisticercosis porcina donde se observan porcentajes de protección desde el 73 al 96%. Estos datos sugieren que la vacunación contra la cisticercosis puede reducir el número de animales infectados después del desafío. Estudios experimentales adicionales indican que es importante considerar la variación entre especies y entre individuos, así como las circunstancias en las que se aplica la vacuna.

Dada la importancia de poder contar con una vacuna eficiente capaz de reducir los altos índices de infección aunado al auge en la utilización de las nuevas técnicas de Biología Molecular y Síntesis Química es que se está generando el desarrollo de vacunas llamadas de la nueva generación. La aplicación de estas nuevas metodologías abre la posibilidad de acceder al control de enfermedades para las cuales hasta la fecha no se han logrado desarrollar vacunas efectivas.

La producción de vacunas recombinantes involucra la clonación de antígenos específicos de interés. En cisticercosis, la clonación de antígenos de oncosfera ha sido considerada como una fuente rica de antígenos protectores. Estudios realizados por Johnson y col reportan en el sistema de *T. ovis* el aislamiento de una proteína de 47-52 kDa, proveniente de una librería de ADNc de oncosfera. Esta fue expresada como una proteína de fusión en *E. coli*, utilizando el vector de glutation S transferasa de *Schistosoma japonicum*. Los resultados de protección indican que esta proteína de fusión fue capaz de conferir altos niveles de inmunidad contra el desafío con huevecillos de *T. ovis* (Johnson et al., 1989). Esta técnica de estudio y evaluación también ha sido descrita por Ito y col. en el sistema de *T. taeniaeformis* /rata, quienes han identificado y evaluado 3 proteínas de fusión reduciendo la carga parasitaria en más del 90% de los animales infectados con oncosferas de *T. taeniaeformis*. El análisis de la respuesta inmune asociada a vacunación indica que los anticuerpos producidos por efecto de inmunización, reconocen un antígeno de oncosfera de 21 kDa, al parecer inmunodominante y etapa-específico (Ito et al., 1979).

Al respecto y como parte de uno de los objetivos de ésta tesis, nos hemos concentrado en la búsqueda de antígenos de interés para el diseño de una vacuna contra la cisticercosis porcina, con el objetivo de reducir la incidencia de infección y aumentar la inmunidad protectora en los cerdos criados bajo condiciones rústicas utilizando los procedimientos de ADN recombinante, inmunología molecular, celular y síntesis de péptidos.

IV. OBJETIVOS.

- Identificar, secuenciar y caracterizar antígenos del cisticerco de *T. crassiceps* capaces de inducir una respuesta inmune protectora contra la cisticercosis murina y porcina, utilizando la metodología del ADN recombinante.
- Identificación, síntesis y evaluación de péptidos sintéticos (provenientes de las secuencias protectoras), en su capacidad diagnóstica para la detección de la cisticercosis.

V. DISEÑO METODOLÓGICO

- a. Obtención de ARNm y síntesis de ADNc de cisticercos de *Taenia crassiceps*.
- b. Construcción de una biblioteca de ADNc de cisticercos de *Taenia crassiceps* utilizando el vector Uni-ZAP XR.
- c. Identificación y análisis de clonas recombinantes que codifiquen para las proteínas protectoras de las fracciones de 56, 66 y 74 kDa, compartidas por el cisticerco de *T. crassiceps* y *T. solium*.
- d. Determinación de las secuencias que codifican para las proteínas recombinantes de interés para efectos de vacunación.
- e. Análisis de las secuencias de interés.
- f. Identificación y síntesis de epítopes de relevancia para efectos de vacunación.
- g. Evaluación de péptidos sintéticos.

VI. MATERIALES Y METODOS

Construcción de una biblioteca de ADNc de cisticerco de *Taenia crassiceps*

Para la construcción de una biblioteca de ADNc de cisticerco de *Taenia crassiceps*, los cisticercos fueron recuperados de la cavidad peritoneal de ratones Balb/cAnN susceptibles a la infección. Los cisticercos fueron lavados varias veces con agua destilada estéril y solución fisiológica a fin de lisis las células del hospedero que pudieran estar adheridos al parásito y que pudieran llegar a contaminar el material genético del cisticerco. Posteriormente, se purificó el ARNm utilizando el kit de aislamiento y purificación de ARNm (Stratagene), se evaluó su calidad y determinó la concentración obtenida para llevar a cabo la síntesis de ADNc. Para la síntesis del ADNc en primer lugar se sintetizó la cadena antisentido del ADN utilizando 1 µg de ARNm el cual fue incubado con la enzima retrotranscriptasa reversa del virus de leucemia murina Maloney (M-MuLVRT) y posteriormente con DNA polimerasa I para que se sintetizara la segunda cadena complementaria. Al ADNc obtenido se le crearon los sitios de clonación a través de la unión, en los extremos, de un oligonucleótido adaptador que contiene dichos sitios para su clonación en el vector de expresión pBluescript SK (±) (Ver apéndice I).

Las construcciones obtenidas fueron empaquetadas en el fago lambda utilizando el kit Gigapack packing extract (Stratagene) de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Una vez empaquetadas las construcciones se plaqueó y se determinó el número de pfu/µl de dicha biblioteca en las células de *E. coli* XL-1 Blue MRF'. Considerando que en la construcción de bibliotecas de ADNc es aceptable la obtención de un título de 10^8 y 10^{12} pfu/µl (Ver apéndice I).

Por otra parte se consideró que en la construcción de una biblioteca primaria en el virus lambda puede ser inestable y se procedió a amplificarla para hacerla más estable y aumentar su título.

Identificación y análisis de clonas recombinantes de interés para efectos de vacunación

Para la identificación de las clonas recombinantes de interés se utilizaron anticuerpos policlonales de conejo específicos para 3 fracciones antigénicas de 56, 66 y 74 kDa del cisticerco de *Taenia crassiceps*. De las clonas obtenidas se seleccionaron aquellas que fueran reconocidas por sueros de cerdos infectados con *T. solium*. Todas las muestras de antisueros utilizadas fueron previamente adsorbidas con bacterias *E. coli* con el propósito de reducir la posibilidad de identificar clonas inespecíficas.

Para la identificación de las clonas recombinantes se infectaron 0.1 ml de bacterias *E. coli* XL-1 Blue MRF⁺ con 0.1 ml del virus recombinante pBluescript SK(±) que contenía 3×10^4 o 10^5 pfu/μl. Las células ya infectadas fueron plaqueadas sobre cajas de medio NZY agar y se incubaron durante 3.5-4 hrs a 42 °C. Posteriormente, se colocó un filtro de nitrocelulosa, sobre cada una de las placas de agar, impregnado con 10 mM de isopropilthio-β-D-galactosidasa (IPTG) y se continuó la incubación durante 18 hrs a 37 °C. Al día siguiente, se marcaron 3 puntos para dar orientación al filtro sobre el agar, se desprendió éste y se bloqueó con una solución de 20% suero fetal bovino (SFB) en 150 mM de NaCl, 50 mM Tris-HCl pH=8.0 (TBS). Se realizaron de 2-4 lavados de 10 min. cada uno. El filtro se colocó en el anticuerpo primario a la dilución óptima en TBS-0.1 % SFB. Se incubó durante 18 hrs a 4 °C. Posteriormente, se realizaron los siguientes 3 lavados de 10 min. cada uno; TBS-0.1 % SFB, TBS-0.1 % SFB- 0.1% Nonident P-40 y TBS-0.1 % SFB. Al término, se adicionó la proteína A-I¹²⁵ radiactiva diluida en TBS-0.1 % BSA y se incubó durante 1.5-2.5 hrs en agitación. Se realizaron los siguientes 4 lavados de 10 min. cada uno; TBS-0.1 % BSA, dos lavados con TBS-0.1 % BSA- 0.1% Nonident P-40 y TBS-0.1 % BSA. Se secaron los filtros sobre papel Whatman No 3 y se expusieron para autoradiografía a -70 °C durante 3 días. Después de revelar la autoradiografía, se alineó el filtro con la placa de agar y se identificaron en ésta las clonas positivas, las cuales se aislaron con un palillo y se transfirieron cada una a un tubo que contenía 1.0 ml. de solución SM /30 μl de cloroformo. Se almacenaron a 4 °C y de esta forma la muestra se conserva estable durante aproximadamente un año (Ver apéndice I).

Liberación *In vivo* del pBluescript de UNI-ZAP^{RM}XR para la obtención del plásmido de ADNc

Una vez aislados los virus recombinantes que contenían las secuencias de interés se realizó la liberación del fagémido pBluescript, utilizando el sistema ExAssist/SOLR, para la recuperación del ADNc de doble cadena, plásmido, para llevar a cabo la determinación del tamaño del inserto clonado y las secuencias de DNA.

La liberación del fagémido se realizó infectando células XL-1 Blue en fase exponencial con más de 1×10^6 pfu/μl del fago recombinante y coinfectado con la misma cantidad del fago ayudador ExAssist se crecieron durante 2-2.5 hrs a 37 °C en agitación. Posteriormente el tubo se calentó a 70 °C por 20 min y se centrifugó el medio a 4 000 g durante 15 min. Se colectó el sobrenadante que contenía el plásmido empaquetado en forma de partículas de fago filamentoso. Para recuperar el fagémido se infectaron 200 μl de células SOLR en fase exponencial con 50 μl del fago filamentoso, se incubaron por 15 min a 37 °C. Al término de la incubación, se sembraron a diferentes diluciones sobre cajas de agar LB-ampicilina y se crecieron toda la noche a 37 °C (Ver apéndice I).

Purificación del plásmido recombinante y determinación del tamaño de los insertos clonados

Para la purificación del plásmido, se utilizó el kit Clear cut miniprep (Stratagene) de acuerdo al protocolo sugerido por el fabricante. El protocolo de purificación es una modificación del método de lisis alcalina de Birnboim y Doly (1979) (Ver apéndice II)

La determinación del tamaño de los insertos clonados se llevó a cabo sometiendo cada uno de los plásmidos purificados a un proceso de digestión durante dos horas a 37 °C con las enzimas de restricción Eco IR y Bam HI. Después de la digestión las muestras fueron corridas en un gel de agarosa junto con un marcador de pesos moleculares a fin de determinar el tamaño de los insertos liberados del vector de clonación (Ver, Resultados, Figura 4)

Determinación de las secuencias que codifican para las proteínas recombinantes de interés para efectos de vacunación

La secuenciación de los fragmentos de interés se llevó a cabo con el kit de Secuencasa versión 2.0 a través de una secuenciación directa basada en el método de Sanger o terminación en cadena utilizando DNA de doble cadena (Maniatis, 1989). Para la secuenciación de las clonas seleccionadas se utilizó un panel de 7 primers (Ver Apéndice II)

El DNAc a secuenciar fue desnaturalizado por la adición de 0.1 vol. de 2M NaOH y 2 mM de EDTA durante 30 min. a 37 °C, después se neutralizó la reacción con 0.1 vol de 3 M de acetato de sodio pH= 4.5 - 5.5, se precipitó con 2-4 vol de etanol y se seco. La pastilla obtenida se disolvió en 7 µl de agua destilada y se le adicionó el buffer de reacción, el primer a utilizar y la enzima DNA pol a un volumen final de 10 µl totales. La mezcla se alineó por calentamiento a 65 °C durante 2 min y se espero a que se estabilizara la reacción a < 35 °C. Al término de ésta, se llevó a cabo la reacción de marcación por adicionando 2 µl del buffer de marcación, 1 µl de DTT 0.1M, 0.5 µl de S³⁵ dATP (10 mCi/ml.) y 2 µl de la enzima secuencasa versión 2.0, se mezcló y se incubó a temperatura ambiente durante 2-5 min. Posteriormente se transfirieron 3.5 µl de la reacción de marcación cada uno de los 4 tubos que ya contenía 2.5 µl de cada uno de los nucleótidos de terminación (A, G, T, C), se mezcló y se continuó la incubación a 37 °C durante 5 min. La reacción se detuvo por la adición de 4 µl de la solución stop. La separación de las muestras se llevó a cabo calentando éstas a 75-80 °C por 2 min. e inmediatamente se corrieron electroforéticamente en un gel de secuenciación desnaturalizante al 8% de acrilamida-urea, las muestras fueron separadas a 1,700 volts por 30-60 min. durante el tiempo seleccionado. Al término de la corrida el gel completo fue transferido a un papel filtro Whatman No. 3, se secó a 80 °C con

vacio durante 45 min-2 hrs. y se expuso a una autorradiografia durante 1-2 días a temperatura ambiente. Después del revelado. de la autorradiografia, se procedió a leer y/o rectificar cada una de las secuencias hasta completar cada una de las clonas(Ver apendice I).

Análisis de secuencias de interés para efectos de vacunación

Los análisis de las secuencias obtenidas involucraron la traducción de la secuencias nucleotídicas a fin de determinar la secuencia proteica de cada una de las clonas aisladas. Además, se determinaron algunas de las características que presentan cada una de las secuencias como son: número de aminoácidos, peso molecular, punto isoeléctrico, tiempo de vida medio en sistemas de expresión *in vivo*, índice de inestabilidad de la proteína sintetizada etc...Asimismo, cada una de las secuencias nucleotídicas y proteicas fueron sometidas a un análisis de homología con el programa TFASTA y la base de datos NBRF PIR (Lipman y Pearson, 1985) (Ver apendice I).

Identificación, selección y síntesis de epitopes (regiones más inmunogénicas) de relevancia para efectos de vacunación

La secuencia de cada una de las proteínas recombinantes aisladas fueron sometidas a un análisis de predicción de epitopes antigénicos de tipo B utilizando el método de WOLF (Jameson y Wolf, 1988) que considera los parámetros de hidrofobicidad y flexibilidad de la secuencia analizada. Los epitopes más antigénicos fueron sintetizados químicamente empleando el método de síntesis de péptidos en fase sólida (Van regenmortel, 1988), que implica el crecimiento de una cadena peptídica a partir del C- terminal del primer aminoácido de la síntesis, el cual esta unido covalentemente a un soporte sólido o resina. La síntesis se basa en la unión sucesiva de los aminoácidos hasta completar la secuencia del péptido deseado para finalmente separarlo de la fase sólida y purificarlo por HPLC u otro método de purificación (Ver apendice I)

Evaluación de péptidos sintéticos a través de la detección de su capacidad para ser reconocidos por sueros de individuos infectados mediante un ensayo de ELISA.

Los péptidos sintetizados fueron evaluados unidos a un soporte sólido (placa para ELISA) a una concentración de 1-2 µg/ 100 µl de solución por pozo, se incubó durante toda la noche a 25 °C, después la placa se lavó 5 veces con PBS-Tween 0.3%, se seco el exceso de buffer. Posteriormente, se bloqueó con 100 µl/pozo de PBS- 1% albúmina sérica bovina

(BSA) y se incubó durante 1 hr. a 37 ° C. La placa se lavó 5 veces como se describió previamente y se adicionaron 100 µl/pozo de cada uno de los antisueros a evaluar a la dilución óptima y se incubó durante 1 hr. a 37 °C. La reactividad de las muestras fue identificada por la adición de un anti anticuerpo acoplado a la enzima fosfatasa alcalina y el substrato de ésta, p-nitrofenil fosfato disódico. La reacción fue detenida por la adición de 50 µl/pozo de NaOH 2N. El grado de reactividad fue determinado por la lectura a 405 nm (Ver apendice I).

Tabla III. Determinación del tamaño de los insertos contenidos en las clonas identificadas de interés para efectos de vacunación.

Nombre de la clona	Tamaño del inserto en Kb.
KETc 1	1.0
KETc 4	0.95
KETc 7	0.5
KETc 11	0.9
KETc 12	1.4

Figura. 4 Determinación del tamaño del inserto de las clonas PSK (+) / KETc 1, 4, 7, 11 y 12 por digestión con Bam HI/ XhoI.

VII. RESULTADOS

Durante el desarrollo del presente trabajo y con el objetivo de identificar y caracterizar antígenos de interés en la relación hospedero-parásito, se seleccionaron un conjunto de antígenos basándose en 2 criterios:

a) que pertenecieran a las fracciones proteicas del cisticerco de *T. crassiceps* previamente identificadas como protectoras en contra de la cisticercosis por *T. solium*

b) que fueran compartidas por el cisticerco de *T. solium*.

a) SELECCION DE ANTÍGENOS DE INTERÉS PARA EL DISEÑO DE UNA VACUNA

Identificación de clonas que codifican para antígenos protectores

En este estudio se realizó una librería de ADNc de cisticerco de *Taenia crassiceps* y se identificaron las clonas de interés utilizando anticuerpos policlonales específicos contra las fracciones 56, 66 y 74 kDa de *T. crassiceps*, identificadas como fracciones protectoras contra la cisticercosis murina y porcina (Valdez *et al.*, 1994; Manoutcharian *et al.*, 1996). Inicialmente se identificaron 13 clonas, las cuales fueron sometidas a un segundo tamizaje, utilizando anticuerpos de cerdos cisticercosos, con el fin de seleccionar aquellas que codificaran para proteínas compartidas con el cisticerco de *Taenia solium*. En este tamizaje se identificaron cinco clonas recombinantes que fueron denominadas KETc 1, KETc4, KETc7, KETc11 y KETc12. La determinación del tamaño de los insertos indicó que estos se encontraban en el rango de 0.5 a 1.2 Kb (Tabla III, Fig. 4). La evaluación de las proteínas recombinantes codificadas por las 5 clonas, se realizó utilizando lisados bacterianos para inmunizar ratones, mismos que fueron desafiados con cisticercos de *T. crassiceps*. Los resultados indicaron que 4 de las clonas resultaron protectoras (30-65% en hembras y 73-85% en machos) contra el desafío con cisticercos de *T. crassiceps* en tanto la clona KETc 11 no tuvo efecto alguno en protección e inclusive fue capaz de aumentar la susceptibilidad del hospedero a la infección (Manoutcharian *et al.*, 1996).

Finalmente, se decidió secuenciar los insertos de las 5 clonas KETc 1, KETc 4, KETc 7, KETc 11 y KETc 12 con el propósito de conocer las secuencias proteicas codificadas por cada una de éstas e identificar algunas de sus características. Los primeros resultados obtenidos en éste estudio se resumen en el artículo "CYSTICERCOSIS: IDENTIFICATION AND CLONING OF PROTECTIVE RECOMBINANT ANTIGENS", el cual se anexa a continuación y en el que se reporta la secuencia de la clona KETc 7.

CYSTICERCOSIS: IDENTIFICATION AND CLONING OF PROTECTIVE RECOMBINANT ANTIGENS

Karen Manoutcharian, Gabriela Rosas, Marisela Hernandez, Gladis Fragoso, Aline Aluja*, Nelly Villalobos*, Luis Felipe Rodarte*, and Edda Sciutto†

Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, A.P. 70228, 04510 México, D.F., México

ABSTRACT: We describe the cloning and the evaluation of the protective capacity of 5 recombinant antigens expressed during the cysticercus stage of both *Taenia crassiceps* and *Taenia solium*. A cDNA library was constructed in bacteriophage λZAP using mRNA isolated from larvae of *T. crassiceps* of the ORF strain. The recombinant phage library was screened with polyclonal antibodies against 56- and 74-kDa protective antigen fractions. This screening identified 13 recombinant clones, 5 of which were also strongly recognized by pooled sera from pigs experimentally infected with *T. solium*. The native antigens are proteins of 56 (clones KETc1, 4, 7) and 74 and 78 kDa (clones KETc11, 12) of *T. crassiceps* cysticerci. The native antigens are proteins of 56 recombinant clones against murine cysticercosis point to the relevance of KETc1, 4, 7, and 12 in host protection, whereas immunization with the clone KETc11 does not modify the parasite load in females and facilitates the parasitosis in males. We report here the DNA and the deduced amino acid sequence (100 amino acids) of the first protective antigen (KETc7) of potential interest for *T. solium* pig cysticercosis prevention.

Cysticercosis, caused by *Taenia solium* seriously affects human health and is responsible for important economic losses in developing countries (Gemmell et al., 1985; Aluja and Vargas, 1988; Larralde et al., 1992). In developed countries its frequency is extremely low, but recently, due to immigrants from endemic areas in Mexico and Central America, its prevalence has risen in the United States (Loo and Braude, 1982; Richards and Schantz, 1991).

The essential role of pigs as obligatory intermediate hosts offers the possibility of a realistic control measure by interfering with transmission by vaccinating pigs, thus modifying the prevalence of cysticercosis.

Several antigenic preparations from oncospherical and larval stages of different cestodes have been useful in the development of vaccines against cysticercosis (Mofinari et al., 1983, 1993; Nascimiento et al., 1987) and 1 recombinant vaccine effective against *Taenia ovis* has been developed (Johnson et al., 1989). Among these antigenic preparations, *Taenia crassiceps* cysticerci antigens are capable of protecting mice against *T. crassiceps* in experimental infections (Sciutto et al., 1990), as well as rats and pigs, respectively exposed to eggs of *Taenia taeniaeformis* (Ito, Takami, and Itoh, 1991) or *T. solium* (Sciutto et al., 1995). In addition, *T. crassiceps* experimental murine cysticercosis has proved to be a useful and suitable model in which to test promising antigens in the prevention of pig cysticercosis caused by *T. solium* (Sciutto et al., 1995). From several *T. crassiceps* antigen fractions previously evaluated, 3 (56, 66, and 74 kDa) were selected for further experiments considering their protective capacity, availability, and cross-reactivity with *T. solium* antigens (Valdez et al., 1994). Here, we report the protective capacity of these *T. crassiceps* antigen fractions against pig cysticercosis, the production of 5 of these as recombinant antigens, and the evaluation of their protective effect against *T. crassiceps* murine cysticercosis.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Female and male BALB/cAnN mice, bred in our animal facilities by brother-sister mating, were used. All mice used were 5-7 wk old at the start of the experiments. The experiments reported herein were conducted according to the principles set forth in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, Institute of Laboratory Animal Resources, National Research Council, Washington, DC.

Female Yorkshire and Landrace hybrid hogs were used. Pigs were immunized with anticholera vaccine 20-45 days after birth and housed in the Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, where no transmission of cysticercosis occurs until used for experimentation. Pigs were humanely killed with a captive bolt stunner (Schermer, Germany).

Parasite antigens and anti-parasite antibodies

Soluble antigens fractions of *T. crassiceps* cysticerci were obtained from cysticerci recovered from the peritoneal cavity of BALB/cAnN female mice after 30-60 days of infection by a procedure described by Valdez et al. (1994). Mice and pigs were experimentally infected with *T. crassiceps* cysticerci and *T. solium* eggs, respectively, and 30 days later sera from these animals were obtained and pooled. The presence of specific antibodies were tested by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA; data not shown) following the technique previously described (Larralde et al., 1992).

Affinity purification of anti-parasite antibodies reactive with recombinant clones and immunoblot analysis

New Zealand white rabbits were immunized by subcutaneous (s.c.) injection with acrylamide gel including 56- and 74-kDa *T. crassiceps* cysticerci antigen fractions in Freund's complete adjuvant (FCA). After 3 biweekly boosts with antigens in Freund's incomplete adjuvant, blood samples were taken, and the presence and specificity of antibodies produced were tested by western blot analysis according to a previously reported protocol (Larralde et al., 1989). Antibodies to antigens expressed by recombinant clones were affinity-purified from these immune sera according to the method described by Ozaki et al. (1986). Affinity-purified antibodies from the KETc1, 4, 7, 11, and 12 were used to probe immunoblots of *T. crassiceps* vesicular fluid antigens to identify the native antigens that correspond to recombinant proteins.

Construction of cDNA library

Messenger RNA from 15 ml of *T. crassiceps* cysticerci was isolated using a commercial kit (Stratagene, La Jolla, California) according to the manufacturer's instructions. The mRNA (5 µg) was transcribed into cDNA using the ZAP-cDNA synthesis kit (Stratagene). The cDNA was

Received 1 May 1995; revised 25 October 1995; accepted 25 October 1995.

* Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, A.P. 22850, 04510 México.

† To whom correspondence should be addressed.

TABLE I. Protective effect of vaccination with *T. crassiceps* antigens on *T. solium* pig cysticercosis.*

Group	Number of cysticerci per individual	Mean	% Protection
Control pigs	6, 6, 7, 3, 3, 5	5	—
Pigs immunized with:			
Vesicular fluid antigens	1, 3, 3, 2, 0, 0, 9	2.5†	48.5
Gel cut-out antigen fractions (56 + 66 + 74 kDa)	0, 0, 0, 0, 0, 1	0.16†	96.8

* Pigs were immunized with antigen preparations in FCA, 60 days before challenge. Pigs were killed 60 days after the challenge and the individual parasite load was determined.

† Significantly different from nonimmunized pigs at $P < 0.05$.

then ligated in Uni-ZAP XR vector (Stratagene). The ligated cDNA was packaged into lambda heads using Gigapack Packaging extract (Stratagene) and amplified once on XLI-Blue MRF' cells (Stratagene). The direct titer of pools of 4 packagings was 1.8×10^2 plaque-forming units (pfu).

Screening of the *T. crassiceps* cDNA library

To detect clones that code for antigens of 56 and 74 kDa, the specific rabbit immune sera, produced as described above, were used following conventional techniques (Snyder et al., 1987). The cDNA library was plated at a concentration of 10^4 pfu/plate on XLI-Blue cells and 2×10^4 clones were screened using specific polyclonal rabbit antisera, diluted 1:100 in phosphate-buffered saline (PBS) containing 0.05% Tween (PBST), after removal of anti-*Escherichia coli* antibodies (Sambrook et al., 1989). To detect positive clones 125 I-Protein A (Amersham, Buckinghamshire, U.K.) was used in accordance with the manufacturer's instructions. To detect those of interest for *T. solium* vaccination, a screening with pooled sera from *T. solium*-infected pigs diluted 1:50 in PBST was performed.

Immunization

A group of 7 York-Landrace pigs, 40 days old, was immunized (s.c.) with *T. crassiceps* vesicular fluid antigens at the base of the ear with a single dose of 0.4 mg per kg (2.5 ml), homogenized in the same volume of FCA. Another group of 6 pigs was immunized (s.c.) under equivalent conditions with gel cut-out bands of 56, 66, and 74 kDa together, in a single dose of 60 µg per kg. Antigens were prepared as previously reported (Valdez et al., 1994). Control pigs were inoculated with FCA with saline at a dose of adjuvant similar to that received by the immunized animals, considering previous observations that acrylamide does not modify the number of parasites recovered after infection.

Crude lysates of recombinant clones were prepared following the procedure described by Snyder et al. (1987). Soluble antigens from crude lysates were used for immunization. Groups of 5 male and 8 female BALB/cAnN mice were immunized by injecting (s.c.) 400 µl of a crude lysate from each recombinant clone homogenized in an equal volume of FCA. Control mice were immunized with a crude lysate from λ phage without insert emulsified in FCA.

Parasites, challenge, and measurement of the parasite load

The ORF strain of *T. crassiceps* (Zeder, 1800) Rudolphi 1810, isolated by Freeman (1962) and supplied by B. Enders (Behringwerke, Marburg, Germany) has been maintained by serial intraperitoneal (i.p.) passage in BALB/cAnN female mice for 8 yr in our Institute. Parasites for infection were harvested from the peritoneal cavities of mice, 1–3 mo after inoculation of 10 cysticerci per mouse.

Immunized mice were i.p. infected with 10 small cysticerci 15 days after immunization as described elsewhere (Valdez et al., 1994). Control mice were infected at the same time. Parasite load was measured in each mouse by counting the number of larvae recovered from the peritoneal cavity 30 days after infection.

Taenia solium eggs used for challenging pigs were isolated from a tapeworm recovered from 1 man in the state of Chiapas, México, after

treatment with a single oral dose (2 g) of Niclosamide (Yomesan, Bayer, México City, México). The tapeworm was identified and eggs were recovered as previously described (Sciutto et al., 1995). For infection, pigs were administered 10,000 eggs each, orally, in a single meal of Purina Chow, 60 days after immunization. Sixty days after infection, pigs were killed and the parasite load of each pig was measured by counting the number of parasites in complete masseters, tongue, and diaphragm, in 200 g of right and left abdominal muscles, in intercostal muscles, and in 400 g of right and left shoulders and hind legs.

DNA sequencing

After immunological screening, positive plaques were converted into phagemid (pSK) clones using the excision procedure. λDNA and rescued phagemid DNA were obtained using the Lambda DNA Purification Kit (Stratagene) and commonly used plasmid DNA preparation procedures (Sambrook et al., 1989). Sequencing was performed by the dideoxynucleotide chain termination method (Sanger et al., 1977) using "–40" and Reverse primers to sequence the 2 chains and [α - 35 S]dATP (Amersham). Double-stranded plasmid DNA was employed for sequencing using Sequenase (U.S. Biochemicals, Cleveland, Ohio) as recommended by the manufacturer. The resultant DNA sequences and deduced amino acid sequences were compared with the GenBank DNA Databases (Altschul et al., 1990) and other available databases.

Statistics

Results were statistically analyzed by multifactorial analysis of variance ANOVA (Anonymous, 1985).

RESULTS

Effect of immunization with *T. crassiceps* antigens against *T. solium* pig cysticercosis

Table I shows the parasite load in control pigs after 60 days of oral infection with *T. solium* eggs and those obtained in pigs immunized either with total antigens from vesicular fluid or a mixture of gel cut-out *T. crassiceps* antigens (74 + 66 + 56 kDa). Immunization with vesicular fluid antigens resulted in a significant decrease of the parasite load. Higher protection was observed in pigs immunized with gel cut-out antigens of 56, 66, and 74 kDa, where 5 out of 6 showed no parasites.

Immunoscreening of a *T. crassiceps* cDNA library

A cDNA library was constructed using mRNA isolated from *T. crassiceps* cysticerci. In order to perform an antibody screening of the cDNA library, specific polyclonal antibodies were prepared in rabbits against 56-, 66-, and 74-kDa *T. crassiceps* cysticerci antigens. Screening of approximately 2×10^4 recombinant phage yielded 13 clones, recognized by antibodies against

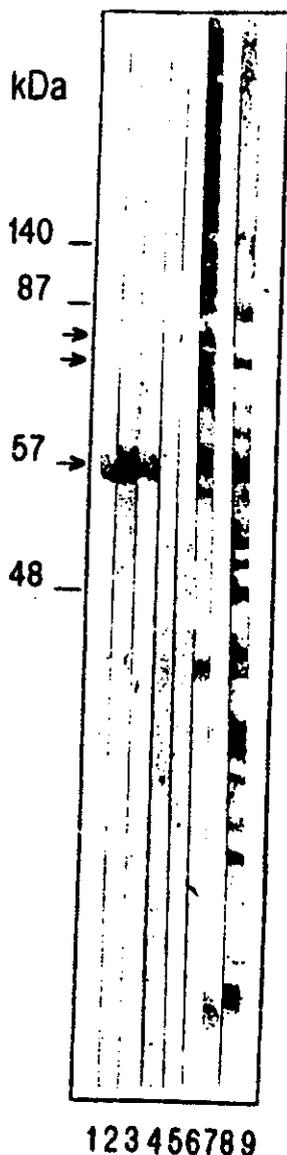


FIGURE 1. Identification of native proteins of *T. crassiceps* cysticerci encoded by the recombinant clones by western blot of vesicular fluid antigens. Lanes probed with: rabbit anti-56-kDa antibodies affinity-purified from clone KETc 1 (1), from clone KETc 4 (2), and from clone KETc 7 (3), and rabbit anti-74-kDa antibodies affinity-purified from clones KETc11 (4) and from clone KETc12 (5). Lanes 6 and 7 were probed with pooled serum from pigs infected or noninfected with *T. solium*, respectively. Lanes 8 and 9 were probed with pooled serum of mice infected or noninfected with *T. crassiceps*, respectively.

antigen fractions of 56 and 74 kDa, with estimated sizes of inserts ranging from 0.4 to 2 kb. To detect those of interest for *T. solium* vaccination, positive clones were secondarily screened with pooled anti-*T. solium* sera from infected pigs using the spot-lysis approach. By this procedure, 5 positive clones were detected. These clones were designated as KETc1, 4, 7, 11, and 12. Inserts from these 5 clones were analyzed. Restriction mapping showed that the 5 clones had inserts from 0.4 to 1.4 kb (data not shown).

```

1G AAT TCG GCA CGA GCA TTT ATG CAG CCG CAT CCT TCC TTC TCT CCA CCC
1  N S A R A P M Q P H P S F S P P
50 CCA GTT GAT TAT CTG TAC CAG ACA AAC TCT CCA CCG CCC TAT GGG GGC
17  P V D Y L Y Q T M S P P P Y G G
98 GCT GTC CCT CCA CCT TAC GCG CCG AAT CCA GGT CCA CCG CCG CCA TAC
33  A V P P P Y A P N P G P P P P Y
146 ACG GGT GCG GCA AGT TCG ATG CCG CCT TAT CCG ACC GGT GGT CCG CCA
49  T G A A S S M P P Y P T G G P P
194 CCC GTC AAC ACC GGT TAT TAC TAT CCA TCT GAT CCA AAT ACC TTC TAC
65  P V M T G Y Y Y P S D P M T P Y
242 GCT CCA CCC TAC ACG CAG GCT TCA GCA CCT CCT ATG GAA CCA GAA GAT
81  A P P Y S Q A S A P P N E P S D
290 AAG AAG AAT CTT TAG TTTCTGTCCGGTCTCACTTACATCTCTGCTCTCACCATC
97  K K N L
344 GGAATTAATATCACTTGTGAGATCCCTTTTGGTTTGGCTAATTTTCTCTTAATAAA
401 ATTTGGTCTCCATACGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAACTGAG

```

FIGURE 2. Nucleotide sequence and predicted amino acid sequence of the KETc7 clone. The DNA sequence of 445 nucleotides and 100 amino acids are numbered from the left starting at the *EcoRI* adaptor sequence. TAG termination codon, *XhoI* restriction enzyme recognition site from oligo, and putative polyadenylation signal, AATAAA, are indicated. The amino acid sequence is given below the DNA sequence (GenBank accession number U31524).

Identification of the native parasite proteins corresponding to the recombinant antigens

Taenia crassiceps vesicular fluid antigens were separated by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and electrophoretically transferred to nitrocellulose filters. The blots were reacted with anti-KETc1, 4, 7, 11, and 12 (Fig. 1). A single band representing approximately 56 kDa was detected with antibodies purified with KETc1, 4, and 7, and 2 bands of 74 and 78 kDa were observed with antibodies purified with KETc11 and 12.

Nucleotide sequencing

Sequence analysis of inserts from the 5 clones demonstrated that all clones were unique in view of the fact that no homology was found in the approximately 400 bp of the 3' portion of them except for the insert of KETc11 from which 361 bp were previously reported in *T. crassiceps* HYG as full-length sequence (Zarlenga et al., 1994). Figure 2 shows the complete sequence of KETc7, which was the only one entirely sequenced. As shown, this sequence is 445 bp in length. The coding strand was identified by the presence of a polyA tail. The presence of *EcoRI* and *XhoI* sites in flanking regions of the gene shows that the cloning procedure was carried out correctly. From 3 possible reading frames of these sequences, only 1 appeared to be appropriate (300 bp); it was also in frame with the lacZ gene of λ ZAP and coded for a 100 amino acid polypeptide. The sequencing of the remaining 4 clones is now in process.

Effect of immunization with λ lysates from recombinant clones against murine cysticercosis

To test the potential of recombinant antigens on anti-cysticercosis immunity, crude lysates of the 5 clones in FCA were used to immunize BALB/cAnN female and male mice (Table II). As controls, mice injected with lysates from a clone without an insert in FCA were included. As shown in Table II, significant protection was obtained with 4 (KETc1, 4, 7, 12) of the 5 clones tested. For these 4 clones, higher levels of protection were observed in males than in females. The level of protection ranged from 73 to 84.4% in males and from 53.5 to 64.1% in females. In contrast, immunization with KETc11 clone lysate significantly increased the expected parasite load in males and did not significantly modify that obtained in females.

DISCUSSION

In this report we confirm, in pigs, the host-protective nature of 56-, 66-, and 74-kDa *T. crassiceps* antigens previously observed in mice against murine cysticercosis. Pigs immunized with 56-, 66-, and 74-kDa *T. crassiceps* cysticercosis antigen fractions were significantly (96.8%) protected against infection with *T. solium*, although few parasites were recovered from orally challenged animals, which is not unusual (Sciutto et al., 1995). This indicates the protective effect of isolated antigen fractions of *T. crassiceps* against pig cysticercosis and attempts to modify cysticercosis transmission can therefore be considered. To produce these antigens in plentiful supply, we prepared a cDNA library from *T. crassiceps* cysticercosis. Specific antibodies against the 56- and 74-kDa antigen fractions, produced in rabbits, enabled us to isolate clones that represent parts of the serologically related molecules of these 2 fractions. With this screening, we identified 13 recombinant clones. Only 5 of these proved to be of interest in the prevention of *T. solium* pig cysticercosis because they reacted with pooled serum from pigs infected with *T. solium*. The western blots using affinity-purified antibodies against each recombinant clone confirmed that KETc1, 4, and 7 correspond to a native antigen of 56 kDa, whereas KETc11 and 12 correspond to 74–78 kDa (Fig. 1).

We determined the efficacy of these 5 recombinant antigens in their protective capacity in inbred mice. Considering previous findings that BALB/cAnN is the strain with higher susceptibility to *T. crassiceps* cysticercosis and the strong differences in susceptibility observed between sexes (Sciutto et al., 1991), males and females of this strain were employed in the study. As Table II shows, 4 of these 5 recombinant antigens induce high levels of protection in mice (but not complete). This result points toward the existence of recombinant antigens of potential interest for *T. solium* pig cysticercosis prevention. On the other hand, mice immunized with lysates from KETc11 showed a higher parasite load than control male mice, whereas no significant effect was observed in susceptible females in which the parasitosis facilitating effect could be masked by the naturally high susceptibility of females. A systematic study of the immune response underlying this phenomenon is in process, with the aim of understanding the immunological mechanisms involved in this host-parasite relationship. Comparisons of the nucleic acid sequences and predicted amino acid sequences of our clones with databases revealed significant homology only with KETc11. A 100% homologous sequence has been previously reported by

TABLE II. Effect of immunization against *T. crassiceps* cysticercosis in BALB/cAnN mice.*

Group	Mean number of the parasite load ± standard deviation (% protection)	
	Female	Male
Control	61.3 ± 29.7	28.2 ± 18.4
Immunized with soluble antigens from crude lysates of:		
KETc1	28.5 ± 17.5† (53.5%)	6.6 ± 4.7† (76%)
KETc4	22.0 ± 15.9† (64.1%)	N.D.
KETc7	42.5 ± 6.4 (30.5%)	7.6 ± 7.6† (73%)
KETc11	46.0 ± 17.4 (24.9%)	40.6 ± 22.2† (-44%)
KETc12	26.3 ± 7.2† (57.1%)	4.4 ± 5.3† (84.4%)

* Fifty days after immunization with the recombinant antigen in FCA, mice were challenged with 10 cysticercosis each and killed 30 days later. Control mice were immunized with crude lysate from λ phage without insert emulsified in FCA. Groups of 5 males and 8 females were used. N.D.—not determined.

† Significantly different from control mice at $P < 0.05$.

2 different authors (Fischer et al., 1994; Zarlenga et al., 1994). Interestingly, in these reports evidence of a native protein of 10 kDa was presented, which we did not detect. As we found, anti-KETc11 monospecific antibodies react against native antigens of 74–78 kDa. At present, we have no explanation for this discrepancy, and more experiments are needed to gain further insight.

Although we only have the 3' portion of the KETc7 gene, this short segment encodes at least 1 protective epitope of the native protein as demonstrated in the vaccination experiments shown on Table II. This information opens the possibility of identifying epitope(s) more precisely by the use of synthetic peptides. Interestingly, in the KETc7 gene we found an open reading frame, encoding a polypeptide of 100 amino acids which is highly hydrophobic and proline rich (29%) as shown in Figure 2.

Varying degrees of protective immunity against some cestodes have been shown to be effectively induced in their mammalian hosts (Ito, Bogh, et al., 1991; Ito, Takami, and Itoh, 1991; Sciutto et al., 1991, 1995) with a variety of antigens; nevertheless, the epidemiological impact of a widespread vaccination program upon transmission dynamics should not be trivial (Gemmell et al., 1985). Oncosphere antigens, natural or recombinant, are held to be the most effective in protecting rats and sheep against challenge with eggs of *T. taeniaeformis* (Ito, Bogh et al., 1991) and *T. ovis* (Johnson et al., 1989), respectively, allegedly because of the oncosphere's greater sensitivity to antibodies compared with the metacystode stage (Johnson et al., 1989). It is interesting in this context that we were able to identify larval stage protective antigens. This may be due to the fact that they were from *T. crassiceps* cysticercosis, and this species can divide by asexual budding, apart from going through a sexual stage and, therefore, probably displays a much more heterogeneous group of antigens, some of which could share oncosphere determinants. So far, it is not known if the protective antigens

we identified are present in the oncospherical stage. However, the early cysticerci antigens used here would protect against oncospheres that managed to reach the metacystode stage. Although 100% protection has not been achieved yet, higher levels of protection could be obtained through an optimal combination of the purified protective antigens. The use of more appropriate adjuvants to increase levels of protection remains to be studied. Furthermore, considering the heterogeneity of the natural challenge, which includes variations in the host (genetic composition, health status, nutrition), in the parasite (antigenic variability), and in the circumstances of the natural infection, we consider highly unlikely that only 1 antigen could serve as an efficient vaccine; therefore, in this study we used a mixture of recombinant antigens. At the present time, we are evaluating our recombinant antigens against the challenge of pigs with *T. solium* eggs and with encouraging results.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Roberto Coria for help with database comparison, Mercedes Baca for her assistance, and Carlos Larralde and Edmundo Lamoyi for their comments. Original stocks of BALB/cAnN were obtained from M. Bevan (Seattle University). Isabel Pérez Montfort corrected the English version of the manuscript. This work was supported by grants from CONACyT and DGA-PA, UNAM, México.

LITERATURE CITED

- ALTSCHUL, S. F., W. GISH, W. MILLER, E. W. MYERS, AND D. J. LIPMAN. 1990. Basic local alignment search tools. *Journal of Molecular Biology* 215: 403-410.
- ALUJA, A., AND G. VARGAS. 1988. The histopathology of porcine cysticercosis. *Veterinary Parasitology* 28: 65-77.
- ANONYMOUS. 1985. Introductory guide for personal computers, version 6. SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, 111 p.
- FISCHER, C., R. NOSRATIAN, N. HABTEMICHAEL, R. TOLLE, V. RIEMENSCHNEIDER, AND E. GEYER. 1994. Preparation and sequence analysis of *Taenia crassiceps* metacystode recombinant antigens with potential for specific immunodiagnosis of human cerebral cysticercosis. *Tropical Medicine Parasitology* 45: 324-328.
- FREEMAN, R. S. 1962. Studies on the biology of *Taenia crassiceps* (Zeder, 1800) Rudolphi, 1810 (Cestoda). *Canadian Journal of Zoology* 40: 969-990.
- GEMMELL, M., Z. MATYAS, Z. PAWLOWSKI, E. SOULSBY, C. LARRALDE, G. S. NELSON, AND B. ROSICKY. 1985. Guidelines for surveillance prevention and control of taeniasis/cysticercosis. VPH/83.49 World Health Organization Geneva, Switzerland.
- ITO, A., H. O. BOGH, M. LIGHTOWLERS, G. MITCHELL, T. TAKAMI, M. KAMIYA, K. ONITAKE, AND M. D. RICKARD. 1991. Vaccination against *Taenia taeniaeformis* in rats using a recombinant protein and preliminary analysis of induced antibody response. *Molecular and Biochemical Parasitology* 44: 43-52.
- , T. TAKAMI, AND M. ITOH. 1991. Vaccine effect of intact metacystodes of *Taenia crassiceps* against *Taenia taeniaeformis* infection in rats. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 44: 696-701.
- JOHNSON, K. S., G. B. L. HARRISON, M. W. LIGHTOWLERS, K. L. O'HROY, W. G. COUGLE, R. P. DEMPSTER, S. B. LAWRENCE, J. G. VINTON, D. D. HEATH, AND M. D. RICKARD. 1989. Vaccination against ovine cysticercosis using a defined recombinant antigen. *Nature* 338: 585-587.
- LARRALDE, C., R. M. MONTOYA, E. SCIUTTO, M. L. DÍAZ, T. GOVEZENSKY, AND E. COLTORTI. 1989. Deciphering western blots of tapeworm antigen (*Taenia solium*, *Echinococcus granulosus* and *Taenia crassiceps*) reacting with sera from neurocysticercosis and hydatid disease patients. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 40: 282-290.
- , A. PADILLA, M. HERNANDEZ, T. GOVEZENSKY, E. SCIUTTO, C. GUTIERREZ, R. TAPIA-CONYER, B. SALVATIERRA, AND J. SEPÚLVEDA. 1992. Seroprevalencia de la cisticercosis en México. *Salud Pública de México* 34: 197-210.
- LOO, L., AND A. BRAUDE. 1982. Cerebral cysticercosis in San Diego. A report of 28 cases and a review of the literature. *Medicine* 61: 341-359.
- MOLINARI, J. L., R. MEZA, B. SUÁREZ, S. PALACIOS, AND P. TATO. 1983. *Taenia solium*: Immunity in hogs to cysticercosis. *Experimental Parasitology* 55: 340-357.
- , R. SOTO, P. TATO, D. RODRÍGUEZ, A. RETANA, J. SEPÚLVEDA, AND A. PALET. 1993. Immunization against porcine cysticercosis in an endemic area in Mexico. A field and laboratory study. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 49: 502-512.
- NASCIMENTO, E., C. A. PEREIRA-TAVARES, M. PEZZI-GUIMARAES, AND J. O. COSTA. 1987. Vacinação de suínos contra cisticercose. *Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária Zootecnia* 39: 135-150.
- OZAKI, L. S., D. MATTEI, M. JENDOUBI, P. DRUIHLE, T. BLISNICK, M. GUILLOTTE, O. PUJALON, AND L. P. DA-SILVA. 1986. Plaque antibody selection rapid immunological analysis of a large number of recombinant phage clones positive to sera raised against *Plasmodium falciparum* antigens. *Journal of Immunological Methods* 89: 239-245.
- RICHARDS, F., JR., AND P. SCHANTZ. 1991. Laboratory diagnosis of cysticercosis. *Clinical in Laboratory Medicine* 11: 1011-1028.
- SAMBROOK, J., E. F. FRITSCH, AND T. MANIATIS. 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, New York.
- SANGER, F., S. NICKLEN, AND A. R. COULSON. 1977. DNA sequencing with chain termination inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 74: 5463-5467.
- SCIUTTO, E., A. ALUJA, G. FRAGOSO, L. F. RODARTE, M. HERNÁNDEZ, N. VIELALOBOS, A. PADILLA, N. KEILBACH, M. BACA, T. GOVEZENSKY, S. DÍAZ, AND C. LARRALDE. 1995. Immunization of pigs against *Taenia solium* cysticercosis: Factors related to effective protection. *Veterinary Parasitology* 60: 57-67.
- , G. FRAGOSO, M. L. DÍAZ, F. VALDEZ, R. M. MONTOYA, T. GOVEZENSKY, C. LOMELI, AND C. LARRALDE. 1991. Murine *Taenia crassiceps*: H-2 complex and sex influence on susceptibility. *Parasitology Research* 77: 243-246.
- , L. TRUERA, D. LEMUS, R. M. MONTOYA, M. L. DÍAZ, T. GOVEZENSKY, C. LOMELI, G. TAPIA, AND C. LARRALDE. 1990. Cysticercosis vaccine: Cross-protective immunity with *Taenia solium* antigens against experimental murine *Taenia crassiceps* cysticercosis. *Parasite Immunology* 12: 687-696.
- SNYDER, M., S. ELLEDGE, D. SWEETSER, R. A. YOUNG, AND R. W. DAVIS. 1987. Agt11: Gene isolation with antibody probes and other applications. *Methods in Enzymology* 154: 107-128.
- VALDEZ, F., M. HERNANDEZ, T. GOVEZENSKY, G. FRAGOSO, AND E. SCIUTTO. 1994. Immunization against *Taenia crassiceps* cysticercosis. Identification of the most promising antigens in the induction of protective immunity. *Journal of Parasitology* 80: 931-936.
- ZARLENGA, D. S., M. L. RHOADS, AND F. M. AL-YAMAN. 1994. A *Taenia crassiceps* cDNA sequence encoding a putative immunodiagnostic antigen for bovine cysticercosis. *Molecular and Biochemical Parasitology* 67: 215-223.

b) DETERMINACIÓN Y ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS QUE CODIFICAN PARA LOS ANTIGENOS RECOMBINANTES PROTECTORES

En la Fig. 5 se presentan las secuencias de nucleótidos y aminoácidos obtenidas de las clonas secuenciadas, KETc1, KETc 7, KETc11 y KETc12. La secuencia de aminoácidos fue determinada de acuerdo al marco de lectura (ORF) generado bajo el promotor de LacZ.

Como se ilustra en la Figura 5, las clonas KETc1, 11 y 12 codifican para polipéptidos de 12, 6 y 8 aminoácidos, respectivamente. La clona KETc 7 para una proteína de 96 aminoácidos.

Clona KETc 1

1 GCT CCA ATG TCT ACA CCA TCG GCT ACA TCG GTT CCG TGA
1 A P M S T P S A T S V R *

Clona KETc 7

1 GCA TTT ATG CAG CCG CAT CCT TCC TTC TCT CCA CCG CCA GTT GAT TAT CTG TAC CAG ACA
1 A F M Q P H P S F S P P P V D Y L Y Q T

61 AAC TCT CCA CCG CCC TAT GGG GGC GCT GTC CCT CCA CCT TAC GCG CCG AAT CCA GGT CCA
21 N S P P P Y G G A V P P P Y A P N P G P

121 CCG CCG CCA TAC ACG GGT GCG GCA AGT TCG ATG CCG CCT TAT CCG ACC GGT GGT CCG CCA
42 P P P Y T G A A S S M P P Y P T G G P P

181 CCC GTC AAC ACC GGT TAT TAC TAT CCA TCT GAT CCA AAT ACC TTC TAC GCT CCA CCC TAC
61 P V N T G Y Y Y P S D P N T F Y A P P Y

241 AGC CAG GCT TCA GCA CCT CCT ATG GAA CCA GAA GAT AAG AAG AAT CTT TAG
81 S Q A S A P P M E P E D K K N L *

Clona KETc 11

1 GTG AAG CGA AAA CAA AGA TGA
1 V K R K G R *

Clona KETc 12

1 GGC AAC CTC TTA TTG AGT TGT TTG TGA
1 G N L L L S C L *

Figura 5. Secuencia de nucleótidos de las clonas recombinantes de interés para efectos de vacunación y secuencia de aminoácidos deducida bajo el promotor de Lac Z.

**ANÁLISIS DE SECUENCIAS DE INTERÉS EN EL DISEÑO DE UNA
VACUNA RECOMBINANTE**

Tabla IV. Características derivadas del análisis de secuencia de aminoácidos, utilizando el programa de PC/Gene Intelligent Inc.

Característica	Clona KETc 1	Clona KETc 7	Clona KETc 11	Clona KETc 12
No.de aminoácidos	12	96	6	8
Peso molecular Da	1204	10 235	743	832
Punto isoelectrico	11.08	3.85	12.51	5.25
Vida media estimada en:				
• Reticulocitos de mamifero <i>in vitro</i> .	4.4 hrs.	4.4 hrs.	100 hrs.	30 hrs.
• Levadura <i>in vivo</i>	> 20 hrs.	20 hrs.	> 20 hrs-	> 20 hrs.
• E. coli <i>in vivo</i>	> 10 hrs.	> 10 hrs.	> 10 hrs.	> 10 hrs.
Indice de inestabilidad	Valor= 71.6 Pred.Inestable	Valor= 82.36 Pred.Inestable	Valor= 48.33 Pred.Inestable	Valor= 62.96 Pred.Inestable
Indice alifático	40.83	25.52		195
Péptidos de anclaje a organelos:				
• Mitocodria	No hay	No hay	No hay	No hay
• Cloroplasto				
• Microcuerpos				
Secuencia para péptido señal				
• Procarionte	No hay	No hay	No hay	No hay
• Eucarionte	No hay	No hay	No hay	No hay
Predic. de hélices asociadas a membrana*	No hay	No hay	No hay	No hay
Segmentos integrados a membrana**	No hay	No hay	No hay	No hay

* Predicción de hélices transmembranales por el método de Eisenberg, Schwarz, Kamarony and Wall.

** Predicción de segmentos integrados a membrana utilizando el método de Klein, Kanehisa and Delisi

b.1 Análisis de secuencias con el programa PC/Gene Intelligent Inc.

Se presentan los resultados obtenidos de los análisis que nos brinda la utilización de dicho programa. Se señalan algunas de las características de las proteínas codificadas por las secuencias obtenidas (Tabla IV).

Alineamiento de secuencias de aminoácidos utilizando el programa de análisis TFASTA y la matriz PAM120

El alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos de las clonas KETc1, KETc7, KETc11 y KETc12, indica que no existe un grado de homología relevante entre éstas (con una identidad de 3 a 10 aminoácidos).

Los resultados de homologías y alineamientos se resumen en las siguientes tablas y figuras. Asimismo, se ilustra el alineamiento de las secuencias que presentaron mayor identidad con las secuencias KETc 1, 7, 11 y 12.

En el apéndice I se muestra la lista completa de proteínas que presentaron diferentes grados de identidad con las secuencias proteicas de las clonas recombinantes en estudio. Asimismo, se presentan detalladamente los datos que fueron considerados en dicho análisis de identidad (ORF, tamaño de la proteína etc..)

Análisis de la secuencia que codifica para el péptido recombinante KETc 1

* No. acceso	Secuencia de aminoácidos
KETc1	APMSTPSATSVR
W00946	NXTPLKIWPGQDXDNQEKQKGCAGWGGPLP APMSTPRASSVQ DAWSYSICSHGXPWVFNXQKG ::::: :::::
C0206	TRHPXRFGLGQDXDNQEKQKGCAGWGGTLP APMSTPRASSVQ TRVLVYLLPRMTLVENGLAGERY ::::: :::::
N7462	NXTPLKICLQDXDNQEKQKGCAGWGGPLP APMSTPRASSVQ TRVLLICSHGXPWSSMVSRRER ::::: :::::
N8310	XVIEQLDQCALARPFAGRVARFLGCGTTK MSVPSATSVR VLWX ::::: :::::
N8310	XFIEQLDQCALARPFAGRVARFLGCGTTK MSVPSATSVR VLWX ::::: :::::
Z6012	RDPVRRAPRSISASGLARS MSTPPASGVR VGVVGGIRKPLLGVLYSSPLVPT :: : : :::::
DMU478	KVTPISISNIYLVPLLSCRYHALSXWAPIW PMKSPRATSVR PQLVARTKSMARCCAISRRIT :: : : :::::
U47882	KVTPISISNIYLVPLLSCRYHALSXWAPIW PMKSPRATSVR PQLVARTKSMARCCAISRRIT ::::: :::::
emb A	XSPWTQWIWVXRRLCMRSSTPRFS PMS SATSAVRAQRNPRDLRRCXRWGPPHRGWRT :: : : :::::
emb AA	PAARASGTSLRNATWSXRRRIPTYPSXSAN APMCSPSSG PVRIWPRDECPFEQLQCXSGNQSPG :: : : :::::
L41251	EGDPYIYLXHLSCPLLSCRYHALSXWAPIW PMKSPRATSVR PQLVARTKSMARCCAISRRIT :: : : :::::
W0579	GSQGVRFHXETLRGAXRRRIPTYPSXSAN APMCSPSSG PVRIWPRDECPFEQLQCXSGNQSPGE ::::: :::::
ACYFIB	TGPVTRTASRVLSSRSTRPRTPTRTHAPRR PMGSPSPSTVR APSPPVRAARSTSRPCSSTPS ::::: :::::
T0740	TPSTSGRTAVRPXRRRMSLSXQELCVTSAY PM AVSSATAVRSSSSIVIGKRCSTQTSSGSERR ::::: :::::
I28422	APLNTPSPTSTQ

Figura 6. Alineamiento múltiple de la secuencia de aminoácidos KETc1 con las proteínas que presentaron mayor porcentaje de identidad de acuerdo al programa TFASTA utilizando la matriz PAM120. La secuencia KETc 1 presentó diferentes grados de homología con secuencias reportadas, comparte la secuencia ATSVR de 2 deshidrogenasas de *Drosophila* y de *Toxoplasma gondii*. Asimismo la secuencia APMSTP se presentó en algunas proteínas de las cuales no se han reportado datos adicionales. * No de acceso a la secuencia del GENBANK. **Nota:** Para identificar los nombres de las proteínas alineadas con KETc 1, considerar el número de la clona a identificar y el número de acceso, de la proteína alineada, en el GenBank (Ver apéndice I).

Alineamiento de la secuencia KETc7 con proteínas de la cubierta del huevecillo de *Schistosoma mansoni* y *hematobioum*

*No de acceso

Secuencia de aminoácidos

```

                10          20          30          40          50
KETc7          AFMQPHPSFSPPPVDYLYQTNSPPPYGGAVPPPYAPNPGPPPPYTGAASSMP
X13596 P P P P S P P P Y P A A P X S P P A P X P P P P X P P P X P P P C S P P V P Y P P P A P P P W P P P Y P P P C S P P V
SCMESP P Q S S P L Q P P P Y P P P S X P P P P P Y - - - - - P P P S X P P P P P Y P P P S X P P P P P Y L P P S X P
SCMES  P P X Q S G P P H P P P X T S P Y S P P P X L P P X T S P X P P P Y S P L P P P P P P P L P P P X Q S D P P H Q P
SCMEGP P P X Q S G P P H P P P X T S P Y P P P P X L P P X T S P X P P P Y S P L P P P P P P P L P P P X Q S D P P H Q P

                60          70          80          90
KETc7          P Y P T G G P P P V N T G Y Y Y P S D P N T F Y A P P Y S Q A S A P P M E P E D K K N L
X13596 P Y P P S P P P X P P P Y P P P C S P T A A Y P P P A P P P X P P P P P P C S P P A P Y P P P A P P P X P P P A P P
SCMESP P P P P P P P P S X P - - - - - P P P P P Y P P P P Y P P S P X P P P Q S L P X Q
SCMES  P X P P P P P P P P P P Y P L S X S D D G G X A I V X P M A A K N N N V N D D F I F
SCMEGP P X P P P P P P P P P P Y P L S X S D D G G X A I V X P M A A K N N N V N D D F I F
    
```

Figura 7 Bis. Continuación de los alineamiento obtenidos con la secuencia de aminoácidos que codifica la clona KETc7. El alineamiento múltiple de KETc7 presentó del 36-40 % de homología con un conjunto de proteínas ricas en prolina, extensinas, presentes en la cubierta del huevecillo de *Schistosoma*. **Nota:** Para identificar los nombres de las proteínas alineadas con KETc 7 considerar el número de la clona a identificar y el número de acceso, de la proteína alineada, en el GenBank (Ver apéndice I).

Análisis de la secuencia que codifica para la proteína recombinante KETc 11

El análisis de la secuencia de nucleótidos de la clona KETc 11 presentó 56 % de identidad con la secuencia que codifica para la subunidad de 8 kDa del antígeno B de *Echinococcus granulosus*, EgAgB.8/2 (Fernández *et al.*, 1996) y 100 % de identidad con la secuencia que codifica para la proteína pTcA 5.5 de cisticerco de *Taenia crassiceps* cepa HYG reportada por Zarlenga y col. (1994) como una proteína de interés en el inmunodiagnóstico de la cisticercosis bovina. Para lograr la alineación completas de EgAgB.8/2 y KETc11 fue necesario considerar la eliminación de 6 nucleótidos presentes en la secuencia EgAgB.8/2 y no en KETc11. A continuación se indican las posiciones de los nucleótidos eliminados en la secuencia KETc11 así como las secuencias de nucleótidos presentes en EgAgB.8/2 (Figura 8).

	120	130
KETc11	GAAGCA-----ATTGGGT	
	:: : :: :: ::	
EgAgB.8/2	AAAAAAAAAGATGGGGT	

	200	210
KETc11	TCT--CTATCTGCAA	
	: : : : : :	
EgAgB.8/2	ACTGCCATTTGCCA	

	240	250
KETc11	CCTTGGAGAA--TAC	
	:: :: :: ::	
EgAgB.8/2	TGCTGAAGAAGTAT	

	260	270
KETc11	GTCTTG--AAAATGA	
	: : : : :	
EgAgB.8/2	ATTTGGGTGGAAGAA	

Sec. Nucleótidos	TGA AGC GAA AAC AAA GAT GAG GGC ATC CAT CTT TCT CGC TCT
ORF 1	* S E N K D E G I H L S R S
ORF 2	E A K T K M R A S I F L A L
ORF 3	K R K Q R * G H P S F S L L
Sec. Nucleótidos	TGC CAT TCT CGT TAT TAC CGT TGT CGC TGC CCC TAC CGA TGA
ORF 1	C H S R Y Y R C R C P Y R *
ORF 2	A I L V I T V V A A P T D D
ORF 3	P F S L L P L S L P L P M I
Sec. Nucleótidos	TAA GGG ACC TGA GGA TCT GAA GAA GAA AAT GAT GAA GCA ATT
ORF 1	* G T * G S E E E N D E A I
ORF 2	K G P E D L K K K M M K Q L
ORF 3	R D L R I * R R K * * S N W
Sec. Nucleótidos	GGG TGA GGT GCG TCG CTT CTT CAG GGA GGA TCC TCT GGG CCA
ORF 1	G * G A S L L Q G G S S G P
ORF 2	G E V R R F F R E D P L G Q
ORF 3	V R C V A S S G R I L W A R
Sec. Nucleótidos	GAA GAT TAT TGA CCA TTT CCA AGA GAC GGT CTC TAT CTG CAA
ORF 1	E D Y * P F P R D G L Y L Q
ORF 2	K I I D H F Q E T V S I C K
ORF 3	R L L T I S K R R S L S A R
Sec. Nucleótidos	GGC CAT CAG AGA GCG GAT AAG AAA ACG CCT TGG AGA ATA CCT
ORF 1	G H Q R A D K K T P W R I P
ORF 2	A I R E R I R K R L G E Y L
ORF 3	P S E S G * E N A L E N T *
Sec. Nucleótidos	AAA GGG TCT TGA AAA TGA ATA GAT GTT GAG TTA AAT CCA CAA
ORF 1	K G S * K * I D V E L N P Q
ORF 2	K G L E N E * M L S * I H K
ORF 3	R V L K M N R C * V K S T R
Sec. Nucleótidos	GGA AAA GTG ATT AAA TAA AAG GAA CTC TTT CCC AGC
ORF 1	G K V I K * K E L F P S
ORF 2	E K * L N K R N S F P
ORF 3	K S D * I K G T L S Q

Figura 9. Secuencia de aminoácidos generados por la secuencia de nucleótidos KETc11/ pTcA 5.5 de acuerdo a los 3 posibles marcos de lectura.

Determinación de la secuencia de aminoácidos a partir de la secuencia de nucleótidos KETc11/ pTcA 5.5

Como se puede observar en la Figura 9 la secuencia KETc11/pTcA 5.5 es capaz de codificar para 3 diferentes péptidos de acuerdo al marco de lectura a considerar. La secuencia de aminoácidos reportada por Zarlenga y col. (1994) corresponde a la proteína sintetizada bajo el segundo marco de lectura que genera una proteína de 85 aminoácidos. Sin embargo, en nuestro caso la inducción de la expresión de la proteína clonada y expresada bajo el promotor LacZ indica que la traducción de la secuencia estuvo determinada por el tercer marco de lectura, el cual genera un péptido de 6 aminoácidos.

Análisis de la secuencia que codifica para la proteína recombinante KETc 11

* No. acceso	Secuencia de aminoácidos
KETc11	CRNSAR VKRKQR
emb AA	PGCRNSAR VPKKQR IAYGXVLSXKIKMCLH
D45299	EFKLDCCRN SAR AKRLR RPQLLPKETQKXRGPS
Y09452	YEFISPIRHCLSLQKASSRVINLICFAWLACRNSSR VKRC NRACFSTGTDNSLTRCSFCA
HSC0X	FRAATIFPTDTSGXVRNPVSEAVARRKWKGRNSSR VTRSQ RRIQWSSMPXLS
D6191	PGCRNSAR VKSGN FPFAXILSLYIAXMRDFPYF
G2214	YNLCPSWPPQHPLMNQMMEXLKFPRNTVNI KRKQ REPSTLEDLVYISKYIWMXP
N9035	QRKISHLLESLWATCFVKTKHRPLHSPCRRPTRLR RKQ FRLWGGEGRGGEDTWXGGS
T59644	I PRGCRNSAR VKHTASLHWQ KLPHESSRFFIDE
N7577	GCRNSAR VKGQC YSRXHVSFELLFRDLSPPP
T8876	RPGRGGAGRRRTRECRDEGR VQRK IRRSRGRGQEARGWITAPVNS
D2818	SMRRTSPRSLSPICLPPCEELCLLKFCCRSRKR RKHQ RQMMPSLIRRCTWSPCLGXW
emb A	GSITVTKGSSQGRRN IWQ ESFHPGVXCRHGAHLR RKQ LAQNLPQDPPRCVGRCCPL
H6103	KLYHCGKIGXIRNHTGKRNSPKI KRDOR PKENXXAYGTTTSXXYHIHI
emb AA	LWAPWSSWVQSSSQSSGGGLGLERICRDPGR VRAKQ FGSRGRAERNWVMEVIQRA
R1411	RAATIFPTDTSRXVRNPVSEAVARRKWKGRNSSR VTRSQ R

Figura 10. El alineamiento múltiple de KETc 11, considerando que el polipéptido consta de 6 aminoácidos se incluyeron 5 aminoácidos de β -galactosidasa con el fin de tener acceso a la utilización del programa de análisis computacional. En letras oscuras se indica la secuencia de KETc11 y los aminoácidos que presentaron identidad con ésta secuencia. * No acceso a la secuencia del GENBANK. Nota: Para identificar los nombres de las proteínas alineadas con KETc 11, considerar el número de la clona a identificar y el número de acceso, de la proteína alineada, en el GenBank (Ver apéndice I).

Análisis de la secuencia que codifica para el péptido recombinante KETc12

La secuencia del péptido KETc 12 estuvo contenida en dos secuencias reportadas con las cuales presentó identidad en el motivo XRGXLLLDCL.

* No acceso

Secuencia de aminoácidos

```
KETc12                ARGNLLLDCL
                       . . . . .
H5432  VSRTALTSSPVRSFSLNCEPQVVGNVGTGRGKLLLDCLYSYPFYILNLTFGILKDLCLCSX
                       . . . . .
BNAF08                TRHERIETGGSIFRPRSRLGQXSRGTLLLDCLPYPSSXSSLEVIVDCGEXFTQLG
```

Figura 11. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos del péptido KETc12 utilizando al programa TFASTA con la matriz PAM120. La secuencia del péptido KETc12 estuvo contenida dentro de la secuencia reportada para una proteína de brotes de coliflor. Nota: Para identificar los nombres de las proteínas alineadas con KETc 12, considerar el número de la clona a identificar y el número de acceso, de la proteína alineada, en el GenBank (Ver apéndice I).

La secuencia de aminoácidos de la proteína KETc 7 se sometió a un análisis de antigenicidad a fin de identificar los epítopes más inmunogénicos del mismo.

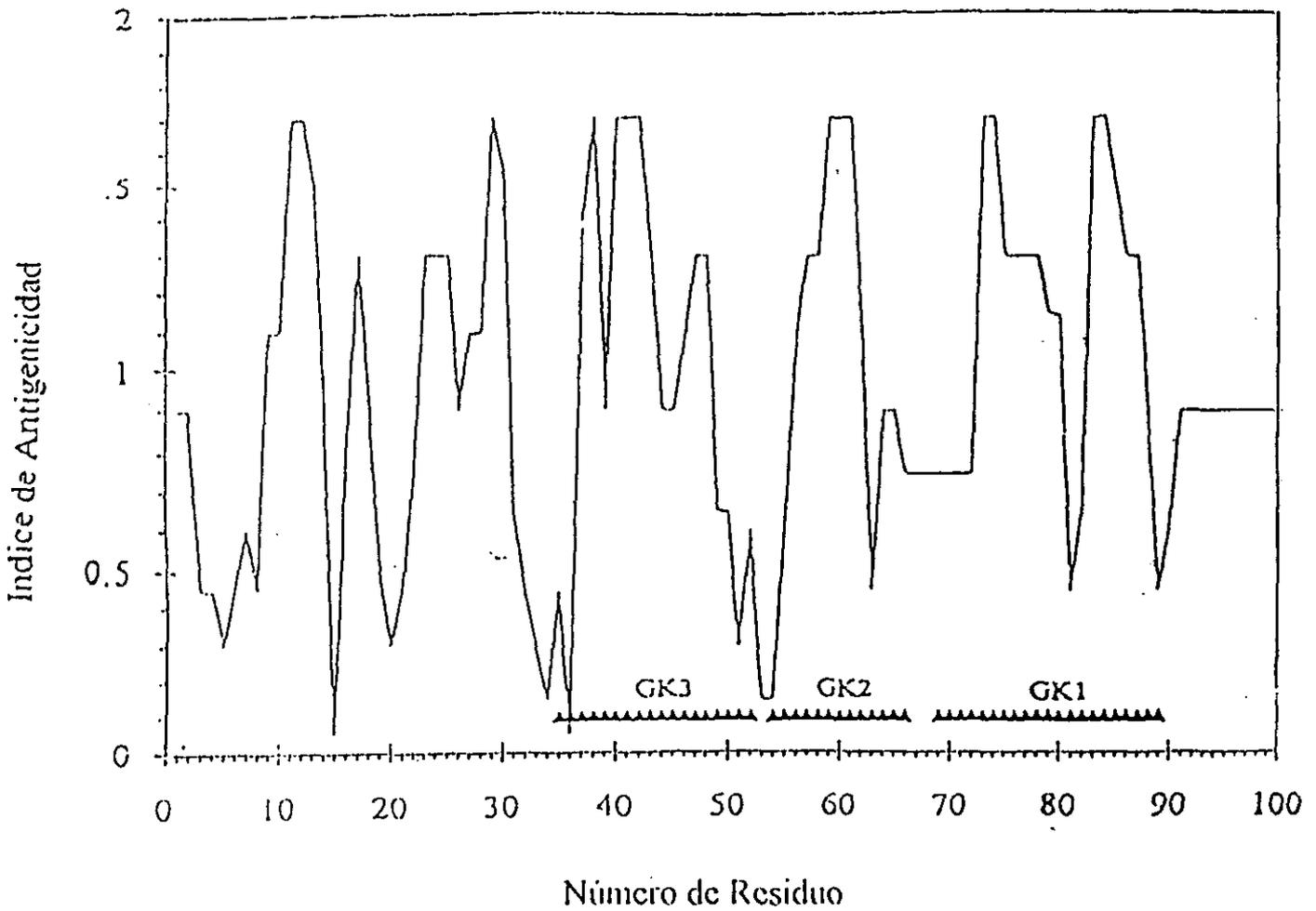


Figura 12. Determinación del índice de antigenicidad de la secuencia de aminoácidos de la clona KETc 7 de acuerdo a método de Wolf (Jameson y Wolf, 1988)

**c) EPITOPES ANTIGÉNICOS: PREDICCIÓN, SÍNTESIS Y EVALUACIÓN
EN EL INMUNODIAGNOSTICO DE LA CISTICERCOSIS**

c.1 Antígeno recombinante KETc7

Los resultados obtenidos en este estudio se anexan en el artículo **"IMMUNODOMINANT SYNTHETIC PEPTIDES OF *Taenia crassiceps* IN MURINE AND HUMAN CYSTICERCOSIS"**. Esencialmente se identificaron, sintetizaron y evaluaron con fines diagnósticos 3 péptidos sintéticos (GK-1, GK-2 y GK-3) que representan a las regiones más inmunogénicas de esta secuencia (Figura 12) (Gevorkian et al., 1996).

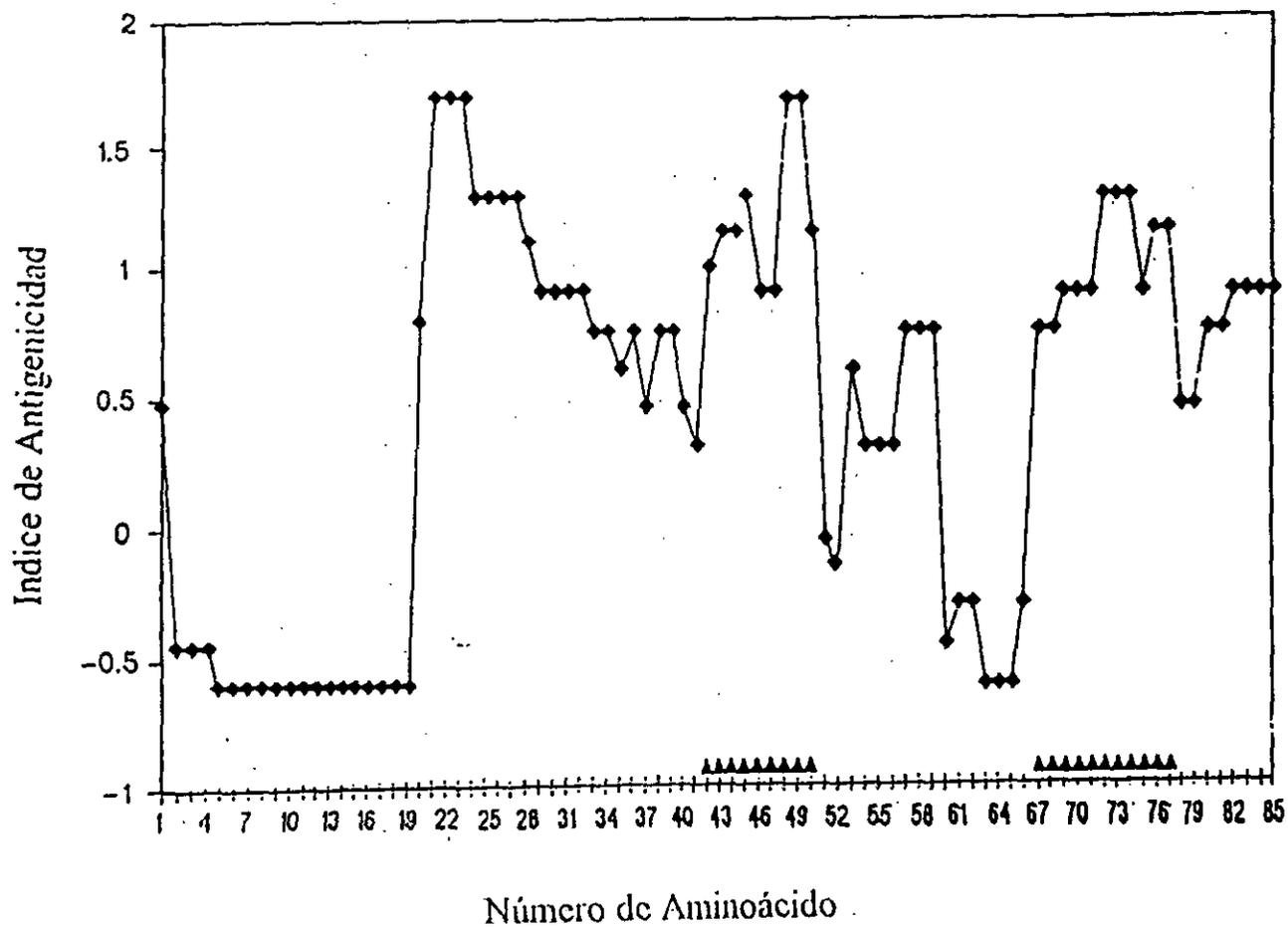


Figura 13. Determinación del índice de antigenicidad de la secuencia de aminoácidos de la clona KETc 11 de acuerdo al método de Jameson-Wolf (Jameson y Wolf, 1988). Identificación de dos epítopes antigénicos GE-111 que incluye la secuencia RFFREDPLG (residuo 42-50) y GE-111.1 IRERIRKRLGE (residuo 67-77),

c.2 Antígeno recombinante KETc11

Considerando que la secuencia codificada por la clona KETc11/pTcA 5.5 (Zarlenga *et al.*, 1994) se reportada como de interés en el diagnóstico de la cisticercosis por *Taenia saginata*, y considerando la extensa reacción cruzada que se presenta entre céstodos, se decidió someter la secuencia KETc 11 a un análisis de predicción de epítopes. Se identificaron dos regiones antigénicas, denominadas GE-111 (GLPDERFFR) y GE 111.1 (EGLRKRIRERI) (Figura. 13). Estas fueron sintetizadas químicamente originando los péptidos GE-111 y GE-112 (GE-111+ GE-111.1). Ambos fueron inicialmente evaluados en su capacidad diagnóstica en la cisticercosis murina y humana causada por *Taenia crassiceps* y *Taenia solium*, respectivamente. Los resultados se ilustran en la Figura 14.

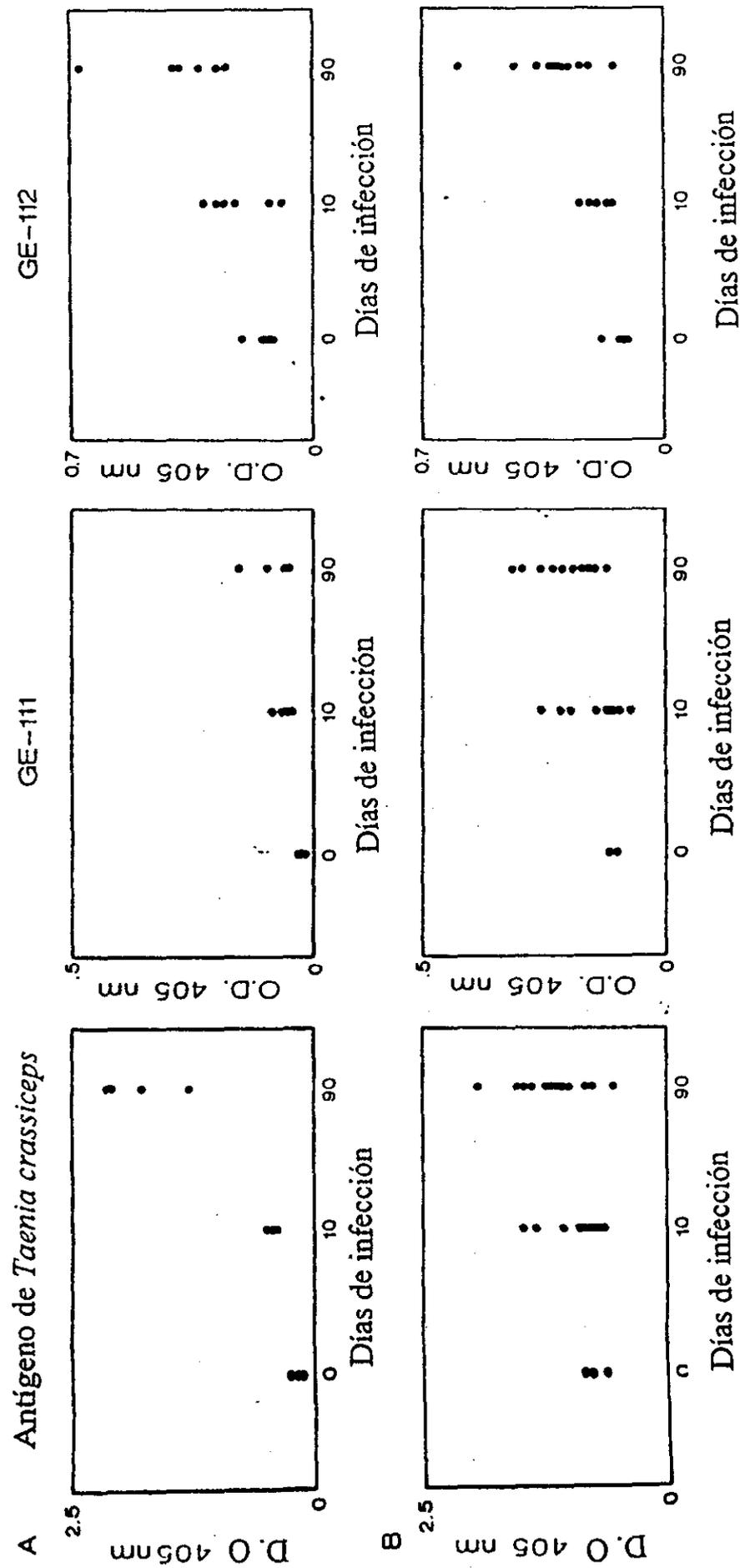


Figura 14. Evaluación del antígeno de cisticerco de *T. crassiceps* y los péptidos GE-111.1 y GE-112 en su capacidad para ser reconocidos por sueros de ratones A) susceptibles (Balb/cAnN) y B) resistentes (C57 Bl/6J) antes, 10 y 90 días después de la infección con 10 cisticercos de *T. crassiceps* cepa ORF.

Immunodominant synthetic peptides of *Taenia crassiceps* in murine and human cysticercosis

G. Gevorkian^{a,*}, K. Manoutcharian^a, C. Larralde^a, M. Hernandez^a, J.C. Almagro^b,
M. Viveros^a, J. Sotelo^c, E. Garcia^c, E. Sciuotto^a

^aInstituto de Investigaciones Biomedicas, Universidad Nacional Autonoma de Mexico, Apartado Postal 70228, Ciudad Universitaria, 04510 Mexico D.F., Mexico

^bInstituto de Quimica, Universidad Nacional Autonoma de Mexico, Ciudad Universitaria, 04510 Mexico D.F., Mexico

^cInstituto Nacional de Neurologia y Neurocirugia, Insurgentes Sur 3877, 14410 Mexico D.F., Mexico

Received 28 December 1995; revised 18 January 1996; accepted 23 January 1996

Abstract

The screening of a cDNA library of *Taenia crassiceps* revealed a clone designated KETc7 that induced high levels of protection against murine cysticercosis in previous experiments. The molecular structure of the deduced 100-amino acid sequence of the corresponding proline-rich polypeptide was studied to detect potentially immunologically active epitopes. Several candidate epitopes were identified, three of which were synthesized by solid-phase peptide synthesis and used as antigens in enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of specific antibodies in a selected panel of sera from mice infected with *Taenia crassiceps* and pigs infected with *Taenia solium*, as well as in the serum and cerebrospinal fluid of human patients with neurocysticercosis. The three peptides detected antibodies in serum from all infected mice. Seven of nine sera from patients with neurocysticercosis reacted strongly with peptide GK-3, and four of them with peptides GK-1 and GK-2. A lower reactivity was observed in sera from experimentally infected pigs. Peptide GK-3 reacted also with 45 out of 77 cerebrospinal fluids (CSF) from patients with confirmed neurocysticercosis and with 14 out of 68 CSF from control patients with other neurological disorders. This is the first report on synthetic peptides that are prominent in the humoral response of murine, porcine and human cysticercosis. Their identification implies finer molecular tools in the exploration of this form of host-parasite relationship, as well as hints to their application in immunodiagnosis and in vaccine design.

Keywords: *T. crassiceps*; *T. solium*; Synthetic peptides; Diagnosis; Cysticercosis

1. Introduction

Taenia solium causes pig and human cysticercosis, a highly prevalent and damaging parasitic disease in third world countries [1-4]. Since the pig is an obligatory host in maintaining the life cycle of this parasite, the possibility of hindering transmission to humans by vaccination of pigs has prompted the development and evaluation of recombinant and synthetic antigens as candidate vaccines [5]. The need to improve serological tests for diagnostic as well as epidemiological studies could also benefit from antigen simplification, because the enzyme-linked immunoelectrotransfer blot, regarded by some as the immunological test of choice for sero-

logical diagnosis, still has suboptimal sensitivity and specificity, it requires purified glycoprotein antigens from *T. solium* cysticerci of difficult or expensive procurement, and it is technologically demanding of highly skilled laboratory procedures to reproduce the high levels of performance obtained in the original procedure [6].

Because of the extensive cross-reactivity and cross-protecting immunity between *T. solium* and *T. crassiceps* cysticerci [7,8], the experimental murine cysticercosis, caused by *T. crassiceps* in mice [9,10] has been used as a laboratory model to test promising antigens for vaccination and immunodiagnosis. Thus, a cDNA expression library was constructed [5] using mRNA isolated from larvae of *T. crassiceps* ORF [7]. The screening was performed with specific polyclonal

* Corresponding author.

antibodies, prepared in rabbits against 56-, 66- and 74-kDa antigen fractions from *T. crassiceps* cysticerci, previously reported as the most promising vaccinating antigens against murine and pig cysticercosis [11]. Thirteen strongly positive clones were detected and isolated [5]. Five of them reacted with antisera from *T. solium* infected pigs and induced high levels of protection against murine *T. crassiceps* cysticercosis. The clone designated KETc7 was selected on account of its high reactivity for further study, by way of chemical synthesis of its peptide fragments followed by assessing their antigenic properties. The nucleotide sequence of KETc7 was elucidated and proved to represent the 3' portion of a native gene [12]. The deduced amino acid sequence was shown to contain 29% proline. In this study we analyze the antigenic profile of this proline-rich polypeptide by the Jameson and Wolf method [13], which indicated several potential antigenic epitopes. Three of them, designated GK-1, GK-2 and GK-3, were chemically synthesized and used as the antigens in enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of specific antibodies in sera from experimentally infected mice and pigs as well as in sera and CSF from patients with confirmed neurocysticercosis.

2. Materials and methods

2.1. Reagents

N^α-*tert*-Butyloxycarbonyl (BOC) protected amino acids were purchased from Sigma Chemical Co., St. Louis, MO. All other chemicals for peptide synthesis were obtained from Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI and were the purest grade available. Alkaline phosphatase-conjugated anti-human, anti-pig and anti-mouse IgG (whole molecule) and *p*-nitrophenyl phosphate disodium (5 mg/tablet) and human serum albumin were purchased from Sigma.

2.2. Antigens

Vesicular fluid from the cysticerci of *T. crassiceps* was used as the source of total antigen preparation [14]. The peptides GK-1 (aa69-85) GYYYSPDNTFYAPPYS(A); GK-2 (aa55-66) (KK)MPPYPTGGPPP(V)(K) and GK-3 (aa35-51) PPPYAPNPGPPPPYTGA were prepared manually by stepwise solid-phase synthesis [15] with the *N*^α-*tert*-butyloxycarbonyl (BOC) derivatives of L-amino acids on Merrifield resin (chloromethylated copolystyrene-1% divinylbenzene, Sigma). It has been found that the chaotropic salts are useful in solid-phase peptide synthesis to disrupt secondary structures and increase the rate of peptide bond formation [16], therefore, we used 0.4 M NaClO₄ in dimethylformamide:dichloromethane (1:1) during each coupling

step. Upon completion of the solid-phase part of the synthesis the removal of all side-chain protecting groups (2,6-dichlorobenzyl- for tyrosine; benzyl- for aspartic acid, serine and threonine; 2-chloro-benzyloxycarbonyl- for lysine) and simultaneous cleavage of the peptides from the resin were performed in the presence of trifluoromethanesulfonic acid (TFMSA). The crude peptides were purified on a column with Sephadex G-25 followed by chromatography on a column of carboxymethyl cellulose.

2.3. Sera and cerebrospinal fluids (CSF)

Serum samples from 14 mice experimentally infected by *T. crassiceps* [17] and eight control cestode-free mice as well as from 17 pigs experimentally challenged with *T. solium* eggs [18] and five normal control pigs were used for immunodiagnosis. Likewise, the human serum samples tested were obtained from the following groups: (I) nine patients with confirmed neurocysticercosis; (II) 32 HIV-1 infected individuals; (III) eight patients with rheumatoid arthritis (RA); (IV) 13 normal healthy individuals (members of the laboratory staff); and (V) 70 healthy blood donors. CSF specimens tested were obtained from 77 patients with neurocysticercosis confirmed by neuroimaging studies and immunodiagnosis in CSF (group VI) and 68 control patients affected with a comprehensive variety of neurological disorders (group VII). In group VII the diagnosis of neurocysticercosis had been excluded by imaging studies and CSF analysis.

2.4. ELISA

All ELISA tests were performed following standard laboratory procedure [18]. Flat-bottomed microtitration plates (96-well; Nunc, Denmark) were coated with the appropriate antigen diluted in 0.2 M carbonate-bicarbonate buffer (pH 9.6) and incubated overnight at room temperature (22°C) (when using peptides) or at 4°C (when using *T. crassiceps* antigen). After washing with phosphate-buffered saline (PBS) containing 0.3% Tween 20 (PBS-Tween) the plates were coated with test sera or CSF [9] diluted in PBS-Tween (1:100 and 1:10, respectively), containing 1% human serum albumin (Sigma) and incubated at 37°C for 1 h. Four washes with PBS-Tween followed. Alkaline phosphatase-conjugated anti-mouse IgG (whole molecule) (1:2000), anti-human IgG (whole molecule) (1:1000) and anti-pig IgG (whole molecule) (1:1000) were used, respectively. The reaction with *p*-nitrophenyl phosphate, (*p*-NPP) substrate in diethanolamine buffer (pH 9.8) followed and was stopped by 2 N NaOH. The absorbance of the plates were read at wavelength 405 nm using an automated ELISA reader. All samples were tested in duplicate, and each plate contained a conjugate control (no

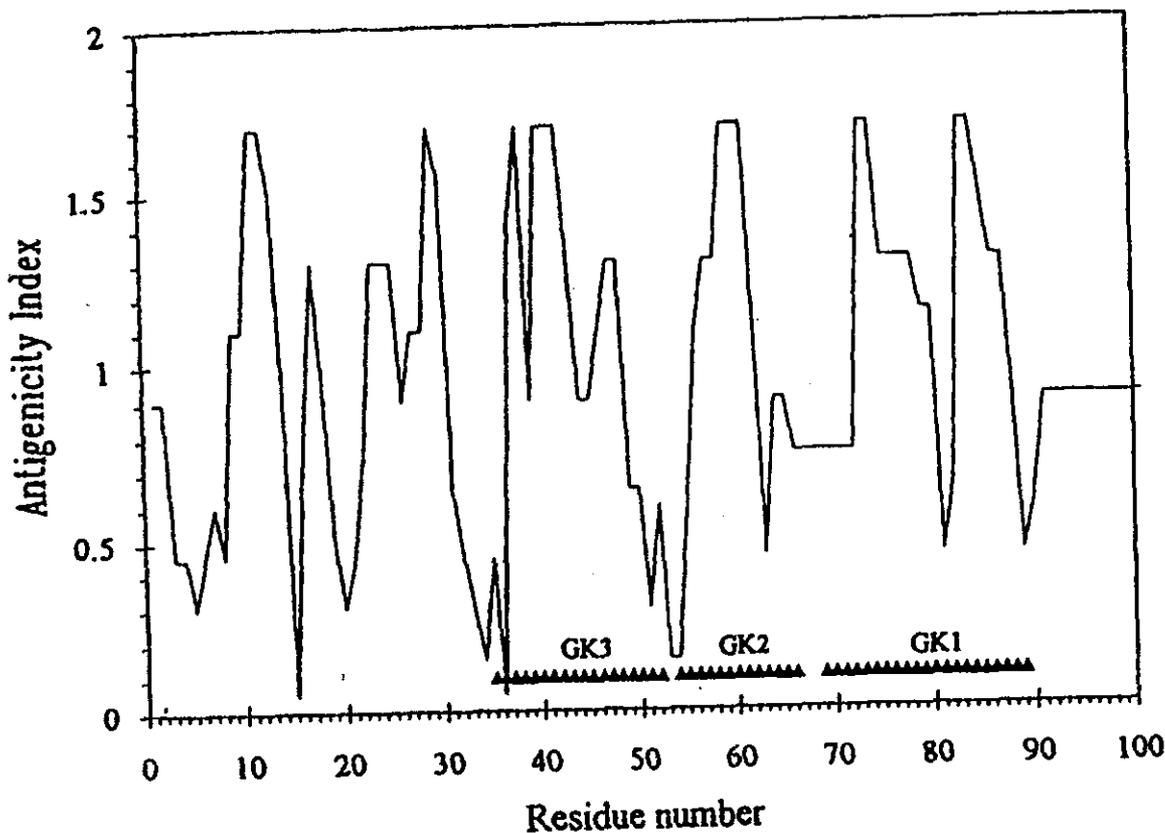


Fig. 1. Antigenicity plot showing the origin of the synthetic peptides, derived from KETc7 clone: GK-1 (aa69-85) GYYPSDPNTFYAPPYS(A); GK-2 (aa 55-66) (KK)MPPYPTGGPPP(V)(K); GK-3 (aa35-51) PPPYAPNP GPPPPYTGA. Added amino acids are shown in brackets. The single-letter abbreviations for the amino acids are as follows: A, alanine; N, asparagine; D, aspartic acid; E, glutamic acid; G, glycine; I, isoleucine; L, leucine; K, lysine; M, methionine; F, phenylalanine; P, proline; S, serine; T, threonine; Y, tyrosine; V, valine.

serum or CSF). Tests were scored positive if their O.D. exceeded the mean plus two standard deviations (SD) of sera from either cestode-free mice, control healthy humans or non-infected pigs, as corresponded, that were included on each plate.

3. Results and discussion.

To analyze the antigenic profile of this new proline-rich polypeptide from *T. crassiceps*, the software package presented by Wolf et al. [13] and distributed within the UWGCG (University of Wisconsin Genetics Computer Group) program collection, was used (Fig. 1). Several candidate epitopes were identified, three of them (aa69-85 (GK-1), aa55-66 (GK-2) and aa35-51(GK-3), were synthesized by the solid-phase peptide synthesis and used as antigens in ELISA for detection of specific antibodies with different panels of sera and CSF specimens. The three peptides detected antibodies in all sera from *T. crassiceps* infected mice, indicating that they represent immunodominant epitopes of *T. crassiceps* cysticerci. None of the sera from control cestode-free mice reacted with these peptides (Fig. 2). A

lower discriminant capacity of the peptides was observed when sera from experimentally *T. solium*-infected pigs were tested. The peptides GK-1 and GK-2 were reactive with four samples and peptide GK-3 with seven of nine sera from patients with confirmed neurocysticercosis (Fig. 2). To further evaluate the antigenic properties of peptide GK-3, a panel of CSF from neurocysticercotic patients and control patients with other neurological disorders was analyzed. Forty-five out of 77 (58%) CSF from individuals with confirmed neurocysticercosis were recognized by GK-3. CSF from patients with active forms of neurocysticercosis reacted with peptide more frequently (64%), than CSF from individuals with inactive forms of disease (31%). Peptide GK-3 reacted also with 14 out of 68 CSF (21%) from control patients with other neurological disorders.

As some amino acid sequence homology between GK-3 and collagen-like proteins was found in GenBank database, we tested peptide GK-3 against sera from patients with rheumatoid arthritis, HIV-1-positive individuals and blood donors (Table 1). Although anticollagen antibodies have been documented in a large proportion of HIV-infected individuals and AIDS patients [19,20], only one of the 32 tested HIV-1-positive

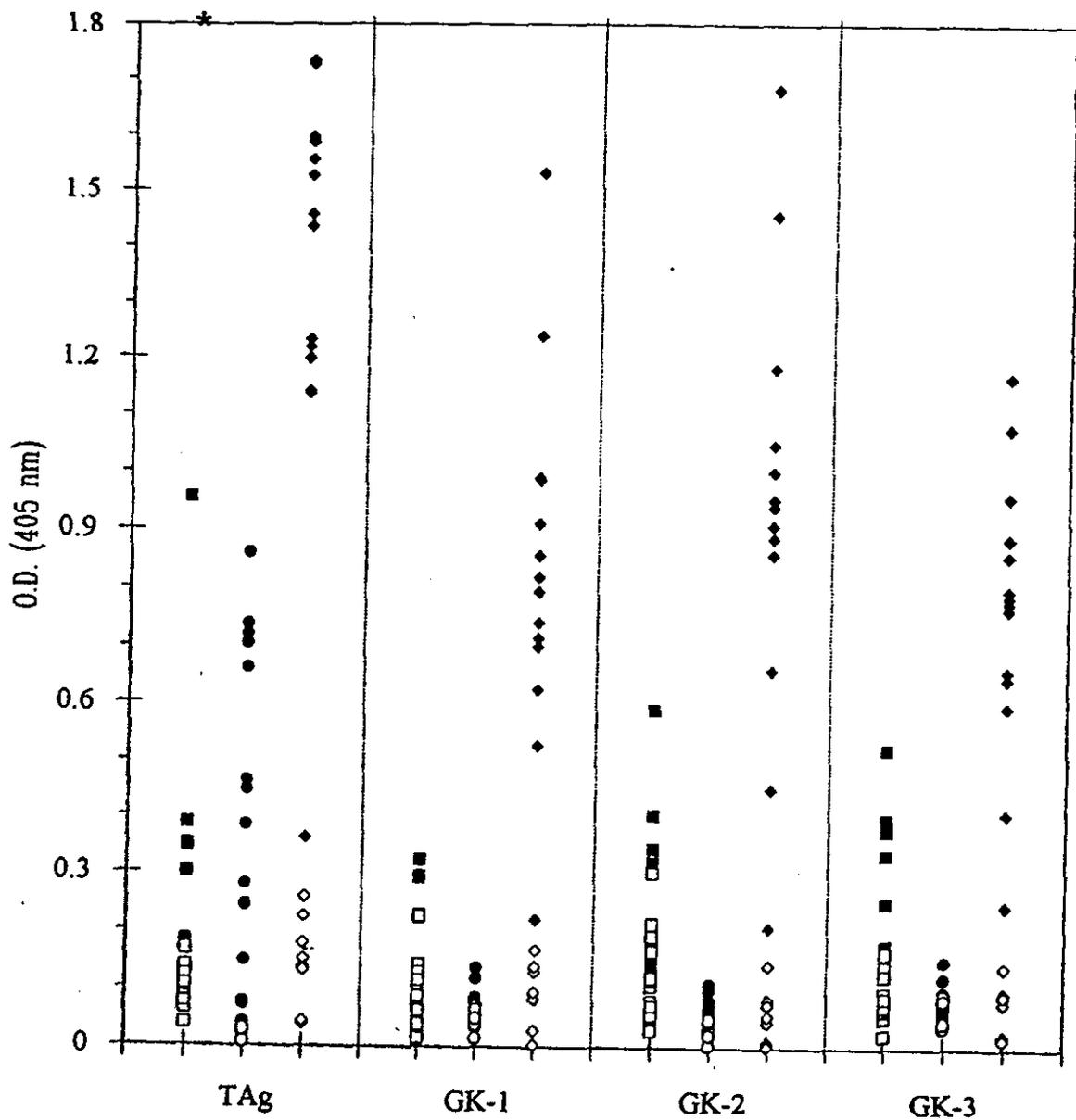


Fig. 2. ELISA absorbance values for individual mice (cestode-free (\diamond) and *Taenia crassiceps*-infected (\blacklozenge)), pigs (normal control (\circ) and *T. solium*-infected (\bullet)) and humans (healthy (\square) and with confirmed neurocysticercosis (\blacksquare)), using synthetic peptides GK-1, GK-2 and GK-3, as well as vesicular fluid from the cysticerci of *T. crassiceps* (TAG).

sera but none from the two other groups, showed reactivity with GK-3.

We have also compared results obtained with the synthetic peptide antigens with those from a whole antigenic extract of *T. crassiceps* (Fig. 2). Optical density values obtained with total antigen in most cases were higher than those obtained with the synthetic peptides, probably due to the presence of a large number of different antigenic determinants in the whole parasite extract.

We have presented here the first report on the serology of synthetic peptides of *T. crassiceps* and identified an antigenic peptide with the ability to positively iden-

tify 58% of confirmed human cysticercotic patients. The immune response of pigs to *T. solium* is not thoroughly documented, but ongoing observations have found extreme variation in quantity and nature of most prominent antigens. It is then no surprise that a single epitope presented by synthetic peptides GK-1, GK-2 or GK-3, was missed. Future diagnosis of cysticercosis will not be limited to the use of a single peptide. The synthesis and evaluation of other antigenic peptides representing different clones, obtained by screening of a *T. crassiceps* cDNA library, must be performed to progress the use of a multiple peptide approach to serodiagnosis of *T. crassiceps* and *T. solium* infection.

Table 1
Correlation between ELISA results and clinical diagnosis of neurocysticercosis (NCC)

ELISA	NCC	Other neurological diseases	Non-neurological (AIDS, RA)	Healthy donors
Positive	45	14	1	0
Negative	32	54	39	70
Total	77	68	40	70

Furthermore, peptides and their corresponding antibodies could be useful tools for evaluating the potential role they might play in the pathogenesis of cysticercosis.

Acknowledgements

This work was supported in part by Direccin General de Asuntos del Personal Academico (DGAPA-UNAM, IN209393, IN208394, IN213195) and by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnologia (CONA-CyT, 3427N), Mexico. The authors thank G. Garcia and G. Acero for providing sera from control normal and experimentally infected animals.

References

- [1] Dumas, M., Grunitzky, E., Deniau, M., Dabis, F., Bouteille, B., Belo, M., Pestre-Alexandre, M., Gatanzano, G., Darde, M.L. and D'Almeida, M. (1989) *Acta Leidensia* 57, 191-196.
- [2] Flisser, A. (1988) *Parasitol. Today* 4, 131-137.
- [3] Larralde, C., Padilla, A., Hernandez, M., Govezensky, T., Sciutto, E., Giutierrez, G., Tapia-Conyer, R., Salvatierra, B. and Sepulveda, J. (1992) *Salud Publica Mexico* 34, 197-210.
- [4] Schantz, P.M. and Sarti-Gutierrez, E. (1989) *Acta Leidensia* 57, 153-163.
- [5] Manoutcharian, K., Larralde, C., Fragoso, G., Rosas, G., Hernandez, M., Govezensky, T., Baca, M., Sciutto, E., Aluja, A., Villalobos, N. and Rodarte, L.F. (1995) In: *Vaccines 95: Molecular Approaches to the Control of Infectious Diseases* (Chanock, R.M., Brown, F., Ginsberg, H.S. and Norrby, E., eds.) pp. 63-68, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- [6] Tsang, V.C.W. and Wilson, M. (1995) *Parasitol. Today* 11, 124-126.
- [7] Larralde, C., Sotelo, J., Montoya, R.M., Palencia, G., Padilla, A., Govezensky, T., Diaz, M.L. and Sciutto, E. (1990) *Arch. Pathol. Lab. Med.* 114, 926-928.
- [8] Sciutto, E., Fragoso, G., Trueba, L., Lemus, D., Montoya, R.M., Diaz, M.L., Govezensky, T., Lomeli, C., Tapia, G. and Larralde, C. (1990) *Parasite Immunol.* 12, 687-696.
- [9] Freeman, R.S. (1962) *Can. J. Zool.* 40, 969-990.
- [10] Smith, K.J., Esch, G.W. and Khun, R.E. (1972) *Int. J. Parasitol.* 2, 262-263.
- [11] Valdez, F., Hernandez, M., Govezensky, T. et al. (1994) *J. Parasitol.* 80, 931-936.
- [12] Manoutcharian, K., Rosas, G., Hernandez, M., Fragoso, G., Aluja, A., Villalobos, N., Rodarte, L.F. and Sciutto, E. (1996) *J. Parasitol.*, in press.
- [13] Wolf, H., Modrow, S., Motz, M., Jameson, B.A., Hermann, G. and Fortsch, B. (1988) *Comput. Appl. Biosci.* 4, 187-191.
- [14] Larralde, C., Montoya, R.M., Sciutto, E., Diaz, M.L., Govezensky, T. and Coltorti, E. (1989) *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 40, 282-290.
- [15] Merrifield, R.B. (1963) *J. Am. Chem. Soc.* 85, 2149-2154.
- [16] Klis, W.A. and Stewart, M. (1990) in: *Peptides: Chemistry, Structure and Biology* (Rivier, J.E. and Marshall, G.R., eds.) p. 904, ECSOM Science Publishers B.V., Leiden.
- [17] Sciutto, E., Fragoso, G., Baca, M., Cruz, V., Lemus, L. and Lamoyi, E. (1995) *Infect. Immun.* 63, 2277-2281.
- [18] Sciutto, E., Aluja, A., Fragoso, G., Rodarte, L.F., Hernandez, M., Villalobos, M.N., Padilla, A., Keibach, N., Baca, M., Govezensky, T., Diaz, S. and Larralde, C. (1995) *Vet. Parasitol.* in press.
- [19] Voller, A. and Bidwell, D.E. (1975) *Br. J. Exp. Pathol.* 56, 338-340.
- [20] Grant, M.D., Weaver, M.S., Tsoukas, C. and Hoffmann, G.W. (1990) *J. Immunol.* 144, 1241-1250.

VIII. DISCUSION

En este trabajo se identificaron 5 clonas recombinantes de interés para la prevención y el diagnóstico de la cisticercosis causada por *Taenia solium*. De las cuales solo 4 fueron secuenciadas y analizadas (KETc1, KETc 7, KETc11 y KETc12). Los criterios que se utilizaron para su identificación y su evaluación funcional se describen y discuten en el artículo anexo a esta tesis (Manoutcharian *et al*, 1996).

El análisis de las secuencias de aminoácidos de las clonas identificadas permitieron determinar algunas de las características de las proteínas recombinantes codificadas. Las observaciones más interesantes en este sentido surgieron del análisis de la secuencia KETc7. Esta secuencia codifica para una proteína rica en prolina (30%), altamente insoluble y con un peso molecular de 10.23 kDa (Tabla IV). Ambas características resultan de interés en el diseño de estrategias para la expresión y purificación de la proteína recombinante a fin de poder confirmar el peso molecular estimado y su efecto protector. El análisis de identidad indica que presenta del 35-43 % de identidad con secuencias proteicas ricas en hidroxiprolina, prolina y glicina. Estas proteínas forman parte del grupo de proteínas denominadas extensinas (proteínas ricas en hidroxiprolina, HRGPs) o "extensinas-like" (proteínas ricas algún otro aminoácido como la glicina, prolina, serinas, tirosina, lisina, valina, ácido glutámico, histidina, treonina o alanina) (Showalter, 1993). Las extensinas representan a una familia de glicoproteínas ricas en hidroxiprolina (HRGPs) son proteínas básicas con un punto isoeléctrico ~ 10. Estudios previos indican que el tamaño y secuencia de las extensinas son altamente conservados e incluyen motivos de secuencias repetitivas ricas en Serina-Prolina 3-7, siendo el motivo más frecuentes Ser- Hyp₄ (Serina-Hidroxiprolina- Hidroxiprolina-Hidroxiprolina- Hidroxiprolina), y sus variantes solos o en combinación con otros aminoácidos como son la lisina, tirosina, histidina, valina. Además, se sugiere que la disposición de estos motivos podrían estar involucrados en la variabilidad estructural y funcional específica de cada proteína. La proteína KETc7 contiene 2 motivos Ser-Prolina 3-7 y XP 2-7 (donde X puede representar cualquier aminoácido), ambos interrumpidos por diferentes secuencias de aminoácidos (Kieliszewsky y Lampion, 1994). Recientemente, se ha propuesto una teoría sobre el origen de estos motivos repetitivos donde se indica que durante la evolución posiblemente surgió un fenómeno que indujo la duplicación y recombinación de regiones ricas en G-C (desoxiguanosina-desoxicitosina) contenidas en los genes de las proteínas de pared, tal que el número de motivos contenidos en cada una de las extensinas, sugeriría el número de eventos dados.

Las extensinas han sido identificadas en diferentes organismos y tejidos, principalmente en la constitución de la pared celular de diversos vegetales (maíz, zanahoria, frijol, tomate, tabaco, soya y fibras de algodón (Showalter *et al.*, 1991, 1993; Keller *et al.*, 1988, 1989; Hong *et al.*, 1994; John *et al.*, 1995)). En parásitos, proteínas “extensina-like” han ricas en glicina han sido identificadas formando parte de la cubierta del huevecillo de *Drosophila melanogaster*, *Fasciola hepatica*, *Schistosoma mansoni*, *japonicum* y *haematobium* (Petri *et al.*, 1976; Köster *et al.*, 1988; Henkle *et al.*, 1990; Bobek *et al.*, 1989; 1991). En ambas clases de organismos la expresión de las extensinas ha sido frecuentemente asociado a órganos, tejido o tipo celular específicos.

Los datos reportados en la literatura han convergido en la propuesta de 3 mecanismos funcionales:

1) Participación en el saneamiento de heridas y resistencia a patógenos a través de la formación, organización y mantenimiento de la estructura de la pared celular. Estudios previos en células vegetales indican la existencia de una correlación positiva entre la resistencia a patógenos y contenido de extensinas o sus precursores (McNeil *et al.*, 1984) capaces de formar una barrera estructural dado por un incremento en la deposición y formación de uniones entrecruzadas entre las extensinas y otras proteínas de la pared celular que impidan la infección de la planta por patógenos. Otro mecanismo de defensa propuesto sugiere que las extensinas pueden actuar como una clase de proteínas “papel mosca” capaz de inmovilizar a ciertos patógenos de plantas, en este caso la respuesta de aglutinamiento estaría dada por una interacción iónica entre la carga positiva propia de las extensinas y la negativa del patógeno. Dichas interacciones han mostrado ser reguladas por cambios en el pH y la concentración de Ca^{2+} , que resultan en la alteración de las propiedades fisicoquímicas de la pared (Showalter, 1993). En el estudio de la cisticercosis resultaría de gran interés el poder determinar la etapa en la cual el cisticerco es capaz de secretar el antígeno KETc7 y si éste es capaz de aglutinar a las células de la respuesta inmune a fin de impedir su destrucción y facilitar su establecimiento dentro de su hospedero.

Por otra parte, se tienen evidencias de que las extensinas interactúan con proteínas transmembranales que estabilizan los microtúbulos corticales de la pared celular. Estudios experimentales han demostrado que los microtúbulos corticales de protoplastos de tabaco son sensibles a bajas temperaturas, sin embargo, la adición de 100 μ g HRGP/ml es capaz de estabilizar y regenerar la pared celular. Evidencias adicionales indican que en estos experimentos los proteínas HRGP interactúan con un componente transmembranal sensible

localizado en la superficie externa de la pared y el cual es sensible a proteasas (Knox, 1995). Sin embargo, dicho componente aún no ha sido identificado. La caracterización de este tipo de interacciones HRGP- proteínas de membrana plasmática, proteínas de pared celular y componentes del citoesqueleto podrían ser de interés, principalmente en la regulación de señales de transducción que permitan la interacción del medio externo con el interior de la célula. Los avances en el conocimiento de este tipo de interacciones a nivel de superficie celular pueden ayudar al progreso en el conocimiento y comprensión de los mecanismos fundamentales en el estudio de la biología de plantas y animales (Knox, 1995). La importancia del sistema de microtúbulos no solo radica en la transducción de señales del interior al exterior sino también en el mantenimiento y regulación de la estructura celular. En este sentido es importante considerar que en el estudio de la cisticercosis no existe información al respecto así que solo podríamos especular sobre las posibles funciones que estarían asociadas a las extensinas y su posible función y relevancia en el cisticercosis y/o estudio de la cisticercosis. De esta forma resulta de gran importancia la localización de la proteína KETc7 en los diferentes estadios del parásito ya que nos permitiría ahondar más en el conocimiento de la biología y los cambios estructurales durante el desarrollo del parásito.

2) Participación en el mecanismo de expansión de la pared celular donde moléculas de celulosa u otros glicanos al unirse a una o diferentes tipos de extensinas (expansinas) establecerían un mecanismo de expansión generado por el desplazamiento de polímeros en ausencia de actividad hidrolítica (Brady, 1996). La presencia de dominios "extensina-like" han sido identificados en proteínas de la membrana plasmática que unen la pared y el citoesqueleto (Knox *et al.*, 1995).

3) Expresión etapa y tejido específica durante el desarrollo. En vegetales ha sido observada principalmente en las semillas de frijol (Keller *et al.*, 1988, 1989; Shcherban *et al.*, 1995) y en parásitos, específicamente en *Schistosoma japonicum* donde se ha observado un aumento en la concentración, síntesis y procesamiento de los RNAm que codifican para una proteína "extensina-like" rica en glicina, principalmente durante la maduración de la hembra, el apareamiento y la producción de huevecillos (Bobek *et al.*, 1991). Dichas evidencias señalan la importante participación de las proteínas "extensina-like" en la formación de la pared y en el crecimiento, desarrollo y diferenciación de diversos órganos u organismos *per se*. Sin embargo, aún queda por demostrar ampliamente las funciones atribuidas a dichas proteínas.

La homología de KETc7 con el grupo de las extensinas nos permite especular sobre su relevancia en la constitución, mantenimiento y desarrollo del cisticerco. Recientemente, estudios de inmunofluorescencia indican que la proteína KETc7 esta presente en la pared de la oncosfera de *T. solium*, estadio en el cual su presencia podría proteger al embrión ante las adversas condiciones medio ambientales a las cuales frecuentemente esta expuesto (Rosas et al., 1998). Considerando la localización y la homología de KETc7 con las extensinas podríamos especular que el efecto protector de KETc7 se deba a la estimulación de una respuesta inmune dirigida contra la superficie del parásito tal que aumente su vulnerabilidad e interfiera en su crecimiento y desarrollo.

Además, podríamos diseñar experimentos adicionales que confirmen si KETc7 pertenece y posee características funcionales asociadas a la familia de las extensinas o "extensinas-like".

Adicionalmente, el análisis de las secuencias proteicas permitió iniciar la identificación de epítopes antigénicos contenidos en las proteínas de interés para efectos de vacunación. El análisis de antigenicidad de la proteína KETc7 permitió la identificación, síntesis y evaluación de tres epítopes altamente antigénicos, GK-1, GK-2 y GK-3. Estos péptidos sintéticos están siendo utilizados para distintos propósitos; 1) En prevención, en base a la evaluación de su capacidad protectora contra la cisticercosis murina y 2) En el diagnóstico para la detección de la cisticercosis. Los 3 péptidos fueron evaluados en un ensayo de ELISA para confirmar su antigenicidad y determinar su capacidad diagnóstica en la cisticercosis humana, porcina y murina. Este procedimiento constituye la primera aproximación hacia el diseño de nuevos métodos de diagnóstico en la cisticercosis, basados en la utilización de péptidos sintéticos. Los resultados fueron promisorios, siendo el péptido GK-3 el que presentó mayor capacidad para el reconocimiento de individuos infectados. Sin embargo, GK-3 detectó un alto porcentaje de falsos negativos, lo que señala que estos péptidos no son adecuados para el diseño de un ensayo diagnóstico. No obstante, se requiere llevar a cabo estudios adicionales para la identificación de péptidos específicos para cisticercosis, además de considerar la optimización del ensayo, a fin de aumentar la sensibilidad de éste. En este sentido Chamekh y colaboradores reportan que el uso de péptidos de mayor tamaño o la detección de otras clases de inmunoglobulinas (IgE) han permitido aumentar la sensibilidad de las pruebas evaluadas en el diagnóstico de *Echinococcus granulosus* (Chamekh et al., 1992).

En la optimización de una prueba de ELISA basada en péptidos sintéticos se han considerado diversos factores que permitan aumentar la sensibilidad y especificidad de los ensayos. Al respecto, la combinación de más de un péptido ha logrado que en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas, la detección de anticuerpos contra *T. cruzi* utilizando una combinación de dos péptidos sintéticos, TcD y PEP2, provenientes de tripomastigote presente un 99.4% de sensibilidad y 98% de especificidad (Peralta et al., 1994). Asimismo, Vergara y col. (1991) reporta que la combinación de 3 péptidos sintéticos con secuencias repetidas es capaz de reconocer al 97% de las muestras evaluadas, con respecto al porcentaje de reconocimiento obtenido con los péptidos evaluados de forma individual (91%, 44% y 65%) (Vergara et al., 1991). De aquí que el tipo de secuencias contenidas en cada péptido también resulte ser de gran relevancia. En estudios posteriores dichos autores han sugerido que los péptidos evaluados probablemente contengan o representen epítopes estimulantes de células B que sean necesarios para la inducción una inmunidad efectiva o que estén participando importantemente en el control del crecimiento del parásito después de una infección natural (Vergara et al., 1992)

En el diseño de péptidos sintéticos es importante considerar el tamaño del péptidos y el tipo de secuencias que contenga ya que la detección de esporozitos de *Plasmodium falciparum* indica la utilización de péptidos sintéticos conteniendo un alto número de una secuencia repetida de cuatro aminoácidos presentó mejor sensibilidad y especificidad que la utilización de péptidos más cortos conteniendo menor número de repeticiones (Giudice et al., 1989)

Por otra parte, la síntesis de péptidos no solo ha mostrado gran relevancia en la optimización de nuevos métodos de diagnóstico. También ha mostrado gran aceptación en el campo de estudio dirigido al diseño y evaluación de nuevas vacunas sintéticas. En este sentido nuestro grupo de investigación ya ha evaluado la capacidad protectora de los péptidos sintéticos GK-1, GK-2 y GK-3 en contra de la cisticercosis murina. Los resultados señalan al péptido GK-1 como un candidato de interés en el diseño de una vacuna sintética en contra de la cisticercosis causada por *Taenia solium* (Sciutto, comunicación personal). En otros modelos animales, la inmunización con péptidos sintéticos ha sido considerada como una estrategia potencialmente promisorio ya que son capaces inducir una inmunidad protectora contra diversos patógenos (Steward y Howartd, 1987). Cabe mencionar que en el diseño de vacunas con péptidos sintéticos es importante considerar la estructura del péptido a evaluar ya que frecuentemente la inmunización con péptidos lineales actúan como débiles inmunógenos. Por otra parte, El análisis, evaluación y optimización de las propiedades

antigénicas y su capacidad inmunogénica de los péptidos sugieren que los péptidos sean acoplados a una proteína acarreadora o sean evaluados en diferentes presentaciones (péptidos lineales, MAP, acoplados a algún acarreador). Además, la evaluación de derivados de la proteína P-30 de *Toxoplasma gondii* sugieren que tanto la estructura como la secuencia del péptido resultan relevantes en el tipo de respuesta inmune capaz de inducir, si contiene epítopes tipo B y tipo T (Godard et al., 1994).

Respecto de los antígenos recombinantes identificados en este trabajo, la traducción de las secuencias nucleótidas de las clonas KETc1 y KETc12, indican que las proteínas de fusión responsables del efecto protector corresponden a péptidos de 12 y 8 aminoácidos, respectivamente. El tamaño de los péptidos de fusión representan una región muy pequeña, de acuerdo al tamaño del inserto originalmente clonado (Tabla III), sin embargo, la evaluación de su capacidad protectora contra la cisticercosis murina indico dichas clonas fueron capaces de proteger al 50-80 % de los animales inmunizados (Manoutcharian et al., 1996). El análisis de identidad del péptido recombinante KETc1 presentó el motivo ATSVR contenido en un grupo de secuencias que codifican para la enzima glicerol-3P-deshidrogenasa de *Drosophila miranda*. Sin embargo, en la literatura no se indica que éste represente o forme parte de alguna región relevante para la funcionalidad de dicha enzima. Considerando que si bien la deshidrogenasa se localiza en el citosol, hace difícil de imaginar su interacción con el sistema inmune y por consiguiente, la generación de un efecto protector. Los resultados obtenidos en el análisis del péptido KETc 12, mostraron la misma tendencia que el péptido KETc1, identificandose 7 de sus aminoácidos contenidos en la secuencia que codifica para una proteína proveniente de brotes de coliflor (Lim et al., 1996)

La traducción de la secuencia nucleótida de la clona KETc11 indica que la proteína de fusión expresada bajo el promotor de β - galactosidasa corresponde a un péptido de 6 aminoácidos que es sintetizado por el segundo marco de lectura (ORF). El análisis de identidad de dicho péptido indicó que no existía relevancia alguna entre el péptido KETc11 y alguna secuencia previamente reportada. El análisis de identidad de la proteína traducida bajo el segundo ORF indicó presentaba 100% de identidad con la proteína, pTcA 5.5 de cisticercos de *T. crassiceps* cepa HYG, la cual ya había sido previamente reportada por Zarlenga y col. (1994) como una proteína de secreción y de interés en el inmunodiagnóstico de la cisticercosis bovina. Curiosamente, la única diferencia entre ambas secuencias esta representada por la presencia, en KETc11, de una base pirimidica, Timina (T), en la posición número 1, la cual no está contenida en pTcA 5.5. Dicho evento trae como

consecuencia el desplazamiento del marco de lectura y, por consiguiente, que la proteína de fusión expresada bajo el promotor de β -galactosidasa sea el péptido KETc 11 y no la proteína pTcA 5.5. Este hallazgo resulta de gran interés dado que Zarlenga y col. en estudios adicionales reportan que un par de primers diseñados a partir de la secuencia pTcA 5.5; primer 206 [región 5', nucleótido 16-38] y primer 170 (región 3' nucleótido 272-294) han sido utilizados para la amplificación por PCR (Polimerase Chain Reaction) del gene completo a partir del ADN genómico del cisticerco. El producto de amplificación mostró ser un fragmento de 470 pares de bases [bp]. Sin embargo, el tamaño del ARNm y el fragmento secuenciado pTcA 5.5, confirman que la región codificadora es de 256 pb. Considerando que los primer fueron diseñados para la amplificación de la secuencia codificadora, los autores argumentan que la diferencia de tamaño entre pTcA5.5, el RNAm (256 pares de bases) y el producto genómico amplificado por PCR (470 pares de bases) esta justificada por la presencia, en éste último, de un intrón de 210 pb. Sin embargo, dicha información no esclarece la incertidumbre en cuanto a la confirmación de la secuencia inicial del gene, ya que la amplificación del gene a partir de la base 16 [base 1 de la región codificadora] y no incluyen primers que permitan la amplificación de secuencias adicionales en la región 5' [región promotora, sitios de reconocimiento para proteínas del complejo de transcripción etc....] que confirmen el marco de lectura reportado. Por otra parte, resultaría de interés la localización y secuenciación del intrón propuesto, a fin de ahondar más en el estudio de la genética y la comprensión de los mecanismos de transducción que podría estar utilizando el cisticerco.

La secuencia de nucleótidos KETc 11 presentó 56% identidad con la secuencia que codifica para la subunidad de 8 kDa del antígeno B de *Echinococcus granulosus* la cual forma parte de una lipoproteína de 160 kDa de secreción, termoestable, que ha sido reportada como la principal proteína del fluido hidatídico. Esta se ha localizado predominantemente en las células tegumentales de los protoescólex y en menor proporción en la capa laminal y germinativa de las cápsulas de Brood. El antígeno B es muy inmunogénico y reconocido por el 90% de los pacientes infectados por *Echinococcus granulosus* y 40% por *multilocularis* (Frosch *et al.*, 1994). El análisis de la proteína recombinante indica que la región C-terminal presenta actividad inhibitoria para elastasa y quimiotaxis de neutrófilos. Dichas actividades sugieren que posiblemente dicha proteína este participando en la generación de un mecanismo de mimetismo molecular que le permita, al parásito, establecerse y controlar la respuesta de un hospedero inmunologicamente competente.

Cabe señalar que la secuencia de nucleótidos de la clona KETc11 ya ha sido identificada en 3 librerías de ADNc de *Taenia crassiceps* (Johnson *et al.*, 1989; Zarlenga *et al.*, 1994; Manoutcharian *et al.*, 1996), lo cual sugiere que KETc11/pTcA 5.5, al igual que el antígeno B de *Echinococcus*, posiblemente sean antígenos altamente expresados en el cisticerco de *T. crassiceps* y aunque en nuestro caso el péptido de fusión expresado consta de 6 aminoácidos, su relevancia antigénica queda aún por ser confirmada.

Por otra parte, cabe la posibilidad de que la síntesis del péptido KETc11 sea consecuencia de la creación de un codón de terminación prematuro el cual puede haber sido generado a través de dos mecanismos, el primero por la introducción de un error en la síntesis de ADNc, llevada a cabo por la DNA polimerasa I (Frosch *et al.*, 1994) o por la introducción de una mutación puntual durante el proceso de clonación (Goldman *et al.*, 1992). La expresión del péptido KETc11 de no ser el resultado de un artefacto, la presencia de un ADNc de mayor tamaño podría sugerir que el parásito estaría sintetizando un ARNm capaz de dirigir la síntesis de diferentes transcritos a partir de una misma secuencia genómica. Esta posibilidad resulta de gran interés a evaluar, ya que los datos obtenidos nos permitiría aumentar nuestro conocimiento sobre la constitución genética y la fisiología de este organismo.

Utilizando la secuencia de aminoácidos reportada por Zarlenga y col. (1994) se realizó una predicción de antigenicidad, identificando dos regiones altamente inmunogénicas (GE111 y GE112) (Figura 13), mismas que fueron sintetizadas y evaluadas. En la Figura 14 se ilustra la reactividad de los dos péptidos con sueros de ratones obtenidos a diferentes tiempos de infección. Esta reactividad será comparada con la que se obtenga al evaluar el péptido de 6 aminoácidos a fin de considerar evidencias que nos permitan completar la interpretación de los resultados obtenidos.

Por último, la información recabada en este trabajo ha permitido la identificación de proteínas relevantes para la vida del parásito y ha establecido y establece interrogantes a considerar en trabajos ulteriores

IX. PERSPECTIVAS

La confirmación de KETc7 como una proteína "extensina-like" nos permitiría diseñar ensayos tendientes a determinar su función en el parásito y ahondar en el conocimiento de su biología. Por otra parte, el análisis de las secuencias resulta de suma importancia ya que nos permitirán avanzar en la identificación de sus funciones, propiedades biológicas, diseño de estrategias para la clonación, expresión y producción de las proteínas recombinantes. Asimismo, para la identificación y síntesis de los epítopes de mayor relevancia que serán utilizadas para el diseño y evaluación de nuevas vacunas y pruebas de diagnóstico en la detección y prevención de la cisticercosis

Una vez identificadas las proteínas recombinantes y/o péptidos sintéticos que induzcan mayor protección contra la cisticercosis, sería factible el poder establecer combinatorias de estos, conjugarlos a alguna proteína acarreadora, sintetizar el péptido de manera cíclica, en forma de MAP (Multiple Antigenic Peptide) etc., a fin de aumentar su efecto de protección o reconocimiento, en la continuación de la evaluación de estrategias para vacunación y por consiguiente en la estandarización y optimización de los métodos de diagnóstico que puedan ser diseñados en base a esta información.

El diseño de péptidos sintéticos podría representar en un futuro próximo un potente reactivo para el diagnóstico serológico y diseño de vacunas sintéticas. Considerando que pueden ser producidos en grandes cantidades a un bajo costo. Los resultados presentados en este trabajo muestran una primera aproximación a dichos campos de estudio, asimismo sugieren la aplicabilidad de la síntesis y evaluación de péptidos sintéticos bien definidos de forma individual o combinada en el diagnóstico de la cisticercosis humana, porcina y murina. Su utilidad en el ensayo de ELISA puede ser de gran relevancia porque permitiría contar con un ensayo estable, reproducible y de alta confiabilidad.

X. APENDICE I.

Técnicas y estrategias utilizadas en el desarrollo del trabajo experimental.

a. Obtención de ARNm y síntesis de ADNc de cisticercos de *Taenia crassiceps*.

Para la purificación del ARNm se utilizó un Kit comercial (Stratagene, la Jolla, California). Se purificó el ARNm de 15 ml de cisticercos de *Taenia crassiceps*, de acuerdo al protocolo sugerido por el fabricante. Este kit permite la obtención de ARNm de alta calidad sin el uso de agentes orgánicos y la utilización de β -mercaptoetanol que permite desnaturalizar eficientemente las ribonucleasas evitando la degradación del ARNm. El ARNm obtenido puede ser utilizado para Northern blot, amplificación de ADNc/PCR o producción de bibliotecas de ADNc.

a.1 Obtención de ARNm

1. Se obtuvieron cisticercos de *Taenia crassiceps* variedad ORF, recuperados de la cavidad peritoneal de hembras BALB/cAnN después de 30-60 días de infección, proporcionados por el bioterio del IIB, UNAM (Figura 15).
2. Los cisticercos se lavaron 4-5 veces con PBS 1X y con varios cambios de agua destilada estéril, ésta última a fin de lisar y eliminar el material genético de las células del hospedero que pudieran estar adheridas o contenidas en el interior de los cisticercos.
3. A cada 0.5 g de parásitos se adicionó 5 ml de solución desnaturalizante (con 50 μ l de β -mercaptoetanol) y se homogeneizó con un politrón hasta que la suspensión fuera uniforme.
4. Se adicionaron 10 ml. de buffer de elución y 1.3 ml. de buffer de elución con RNAsa previamente calentada a 68 °C.
5. Se centrifugó a 9 300 rpm por 10 min a temperatura ambiente
6. Se transfirió el sobrenadante a un tubo que contenía 5 ml de 0.04 g/ml de oligo(dT) celulosa libre de RNAsa. Mezclar.
7. Se centrifugó a 2 200 rpm por 3 min.
8. Se eliminó el sobrenadante con una pipeta libre de RNAsa y se resuspendió la pastilla de oligo (dT) celulosa, que contenía el ARN poli(A)+, en 5 ml de buffer de alta salinidad. Se repitió de la etapa 7-9

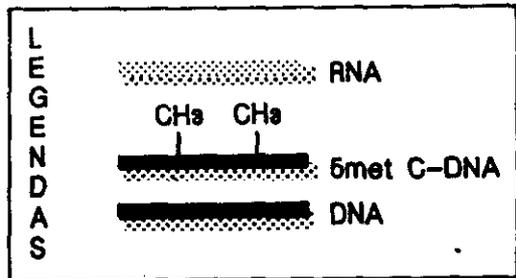
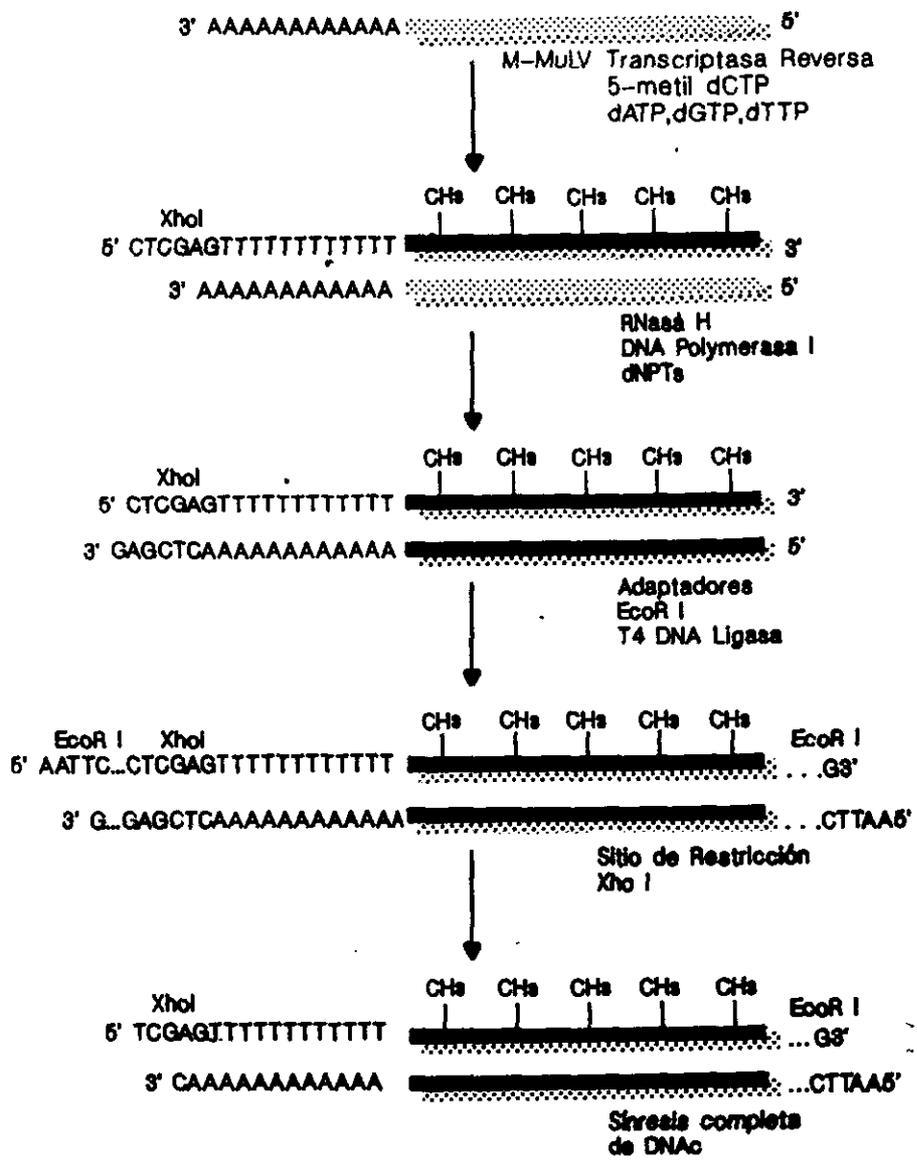


Figura 16. Síntesis de ADNc de cisticerco de *Taenia crassiceps*

9. En el tercer lavado se descarto el buffer de alta salinidad y la pastilla fué resuspendida en buffer de baja salinidad.
10. Se centrifugó la muestra y se descartó el sobrenadante. Se resuspendió la pastilla en 5 ml de buffer de baja salinidad.
11. Se transferieron 2.5 ml de la suspensión de resina y se empaquetó en una columna.
12. El ARNm se eluyó con 400 µl de buffer de elución a 68 °C y se colectó en un tubo de microcentrifuga. La elución se repitió 3 veces para recuperar la mayor cantidad posible de ARNm.
13. La cantidad de ARNm obtenido fue cuantificado a 260 nm

a.2 Síntesis de ADNc

El ARNm fue transcrito en ADNc utilizando el Kit de síntesis ZAP-cADN (Stratagene), de acuerdo al protocolo sugerido por el fabricante (Figura 16).

El siguiente protocolo fue optimizado para transcribir 5 µg de ARNm poli (A)+ a ADNc.

Síntesis de una cadena

La síntesis de la primera cadena de ADNc inicia apartir del ARNm. En esta etapa el ARNm se alinea con un primer de 50 pb (pares de bases) que contiene la siguiente secuencia:

poli (dT)

5'GAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAACTAGTCTCGAGTTTTTTTTTTTTTTTTTTT 3'

Secuencia "GAGA" Xho I

La síntesis se inicia cuando la región de poli (dT) se une a la región 3' poli (A) del templado de ARNm, y la Transcriptasa Reversa del Virus de la Leucemia Murina-Moloney (M-MuLVRT) inicia la síntesis de la primera cadena de ADNc, en presencia de los deoxinucleosidos adenina (A), timina (T), citocina (C) y guanosina (G). El uso de 5-metil dCTP durante la síntesis de la primera cadena permite la hemi-metilación del ADNc para protegerlo de su posible degradación por endonucleasas como Xho I.

Nota: La estructura secundaria del ARNm puede causar la síntesis de ADNc truncado. Para relajar la estructura secundaria, se puede utilizar hidróxido metil mercúrico. También es importante no contaminar el ARN con RNAsas hasta que se termine la síntesis de la primera cadena. Para lo que se recomienda utilizar guantes y agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC).

1. En un tubo de microcentrifuga, se adicionaron los siguientes reactivos:

5.0 μ l de buffer 10x para la síntesis de una cadena

5.0 μ l de 0.1 M DTT

3.0 μ l de la mezcla 10 mM de metil nucleótidos para la síntesis de la primera cadena

2.0 μ l de linker-primer (1.4 μ g/ml)

X μ l de agua tratada con DEPC

1.0 μ l de RNAsa (40 U/ml)

2. Se agitó la mezcla en vortex y se adicionó 5 μ g de ARNm poli(A)+, mezclar gentilmente.

3. Se dejó alinear el primer al templado por 10 min. a temperatura ambiente.

4. Se adicionó 2.5 μ l de M⁻MuLVRT (20 U/ μ l). El volumen final de la reacción puede ser aprox. de 50 μ l. Se mezcló gentilmente y se centrifugó por 15 seg.

5. Se transfirieron 5 μ l de la mezcla a un tubo que contenía 0.5 μ l de dNTP- P³² (800 Ci/mmol). Esta muestra es el control que nos permitirá analizar la cantidad y calidad de la síntesis de la primera cadena.

6. Se incubó la reacción y el control a 37 °C durante 1 hr.

7. Se guardó la reacción control a -20 °C para su análisis posterior. La reacción de síntesis de la primera cadena se incubó a 4 °C.

Síntesis de la segunda cadena.

Durante la síntesis de la segunda cadena, la RNAsa H rompe el ARN unido a la primera cadena de ADNc, se producen múltiples fragmentos que sirven como primers para la DNA polimerasa I (pol I), que sintetizara la segunda cadena de ADN en presencia de dCTP para reducir el grado de metilación y asegurar que éste pueda ser digerido con enzimas de restricción.

Es importante mantener todos los reactivos a menos de 16 °C cuando se adicione la DNA polimerasa I.

A los 45 µl de la reacción de síntesis de la primera cadena, se adicionaron los siguientes reactivos

- 40.0 µl de buffer 10 X para la síntesis de la segunda cadena
- 15.0 µl de 0.1 M DTT
- 6.0 µl de la mezcla 10 mM de nucleótidos para la síntesis de la segunda cadena.
- 276.3 µl de agua estéril
- 2.0 µl dNTP marcados con 32-P (800 Ci/mmol).

1. Se mezcló y se adicionó 4.5 µl de RNAsa H (1 U/µl) y 11.2 µl de DNA polimerasa I (9 U/µl).
2. Se incubó 2.5 hrs. a 16 °C (la temperatura a más de 16 °C puede causar la formación de estructuras secundarias, que no pueden ser clonadas ya que interfieren en la síntesis del ADNc)
3. Se colocó inmediatamente sobre hielo y se adicionaron 400 µl de fenol:cloroformo (1:1 (v/v)). Se agitó en vortex.
4. Se centrifugó por 2 min. a temperatura ambiente.
5. Se colectó el sobrenadante y se adicionó un volumen igual de cloroformo. Se agitó nuevamente en vortex.
6. Se centrifugó por 2 min. y se colectó el sobrenadante.

7. El ADNc fue precipitado por adición de:

33.3 μ l de acetato de sodio 3M
867.0 μ l de etanol absoluto

8. Se mezcló por inversión y se almacenó a -20 °C durante toda la noche.

9. Se centrifugó a 4 °C durante 60 min.

10. Se lavó la pastilla con 1.0 ml de etanol al 80%. Se centrifugó por 2 min.

11. La pastilla se secó y se resuspendió en 43.5 μ l de agua estéril.

12. Se tomó una alícuota de 4.5 μ l y se congeló a -20 °C para su posterior análisis de calidad y cantidad.

Se recomienda correr las muestras de calidad de las reacciones de la primera y segunda síntesis en un gel alcalino de agarosa.

a.3 Formación de terminaciones cohesivas del ADNc

Generalmente las terminaciones de la doble cadena de ADNc no son iguales por lo que se tienen que rellenar con Klenow, y los adaptadores que contienen el sitio EcoR I, son ligados a las terminaciones. La secuencia de estos es la siguiente

5' AATTCGGCACGAG 3'
3' GCCGTGCTC 5'

Estos adaptadores están compuestos por 9 y 13 mer, ambos son complementarios con la terminación cohesiva EcoR I. El 9-mer es fosforilado para permitir su unión a una terminal del ADNc y el otro adaptador. El 13-mer se conserva defosforilado para evitar su autoligación con el otro extremo cohesivo

1. A los 39 μ l restantes de la reacción, se adicionaron:

5.0 μ l buffer 10 X para ligación
2.5 μ l mezcla de dNTP 2.5 mM
2.0 μ l fragmento Klenow (5 U/ μ l)

2. Se incubó a 37 °C por 30 min. No exceder el periodo de incubación a más de 30 min.
3. Se adicionó 50 µl de agua destilada. Se extrajo la muestra con un volumen igual de fenol:cloroformo y, posteriormente, con un volumen de cloroformo.
4. Se colectó el sobrenadante y se precipitó el ADNc con
 - 7.0 µl de acetato de sodio 3M
 - 226 µl de etanol absoluto
5. Se incubó sobre hielo por 30 min. Se centrifugó a 4 °C por 60 min.
6. Se lavó la pastilla con 300 µl de etanol al 80%. Se eliminó el sobrenadante y se dejó secar la pastilla.

a.4 Ligación de adaptadores EcoR I

1. Se resuspendió la pastilla en 7.0 µl de la solución que contenía los adaptadores EcoR I
2. Se adicionó:
 - 1.0 µl buffer 10 X de ligación
 - 1.0 µl rATP 10 mM
 - 1.0 µl T4 DNA ligasa (4 Weiss U/µl)
3. Se centrifugó e incubó durante toda la noche a 4-8 °C (la eficiencia de la ligación de los adaptadores se incrementa cuando se amplía el tiempo de ligación).
4. Se inactivo la ligasa por calentamiento a 70 °C por 30 min.

a.5 Fosforilación de las terminaciones EcoR I

1. Después de inactivar la ligasa, se centrifugó 2 min. y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Se adicionaron:
 - 1.0 µl buffer 10 X de ligación
 - 2.0 µl de rATP 10 mM
 - 6.0 µl de agua estéril
 - 1.0 µl de T4 polinucleótido cinasa (10.0 U/µl)

2. Se incubó por 30 min. a 37 °C.
3. Se inactivó la cinasa durante 30 min. a 70 °C.
4. Se centrifugó por 2 min. y se dejó enfriar a temperatura ambiente por 5 min.

a.6 Digestión con Xho I

La digestión con Xho I libera el adaptador EcoR I y el primer-unido al extremo 3' del ADNc. Estos dos fragmentos son separados en una columna de Sephacryl. El ADN se fraccionó dependiendo de su tamaño y se precipitó para posteriormente ligarse al vector UNI-ZAP^{RM} XR

1. Se agitó el tubo de reacción y se adicionó:

28 µl de buffer para Xho I
3 µl de Xho I (40 U/µl)

2. Se incubó 1.5 horas a 37 °C.
3. Se enfrió a temperatura ambiente y se adicionaron 5.0 µl de STE 10X.
4. Se colocó la muestra en una columna de Sephacryl S-400 y se centrifugó a 400 xg. por 2 min.

a.7 Terminaciones para ligar el ADNc al vector UNI-ZAP^{RM} XR

Para determinar el tamaño de cada una de las fracciones de ADNc colectadas, se corrió 5 µl de cada fracción en un gel de acrilamida no desnaturizante al 5 %.

1. A las fracciones que contienen el ADNc, se adicionó un volumen de fenol:cloroformo (1:1 (v/v)).
2. Se agitó en vortex y se centrifugó por 2 min. a temperatura ambiente.
3. Se repitió las etapas 1 y 2.

Es importante considerar que la extracción del ADNc con fenol-cloroformo se utilizó para eliminar la cinasa, que generalmente retiene su actividad después de su tratamiento a 70 °C, ya que su actividad remanente puede inducir la autoligación del vector y por consiguiente un aumento en el fondo de reacción.

Precipitación de ADNc

1. A cada muestra extraída, se adicionó un volumen de etanol absoluto.
2. Se precipitó a 4 °C por 1 hora o a -20 °C toda la noche.
3. Se centrifugó por 60 min. a 4 °C.
4. La pastilla de ADNc fue resuspendida en 10 µl de agua estéril.

Se cuantificó la cantidad de ADNc obtenido y los mejores resultados de clonación se han obtenido al ligar 100 ng de ADNc / 1 µg. de vector.

El fagemido pBluescript SK (+/-) es un fagemido de 2958 pares de bases (pb) derivado de pUC19. La designación SK indica que la región de clonación está orientada tal que la transcripción de lacZ procede en la dirección del sitio Sac I a Kpn I.

Origen fl (+): (6-462) Origen de transcripción del fago filamentosos fl permite la recuperación de la cadena positiva del gene lacZ, cuando la cepa hospedera que contiene el fagemido pBluescript es coinfectada con un fago ayudador.

Origen fl(-): Origen de transcripción del fago filamentosos fl permite la recuperación de la cadena antisentido del gene lacZ cuando la cepa hospedera que contiene el fagemido pBluescript es coinfectada con un fago ayudador.

Origen ColE1: (1032-1912) Origen de replicación del plásmido utilizado en la ausencia del fago ayudador

LacZ: (promotor LacZ: 816-938) Esta región del gene Lac Z proporciona α -complementación para la selección azul-blanco de los fagemidos recombinantes. Es un promotor lac inducible que se localiza río arriba del gene lac Z y que permite la fusión de proteínas de expresión con el producto del gene β -galactosidasa.

MCS: (657-759): Sitio de clonación flanqueado por los promotores T3 y T7

Ampicilina (1975-2832): Gene de resistencia a ampicilina para la selección de antibiótico del fagemido

Nota: La cadena superior se designa (+) y la inferior es designada como la cadena (-).

Número de acceso al Banco de genes GeneBank #52325 (SK(+)) y #52324 (SK(-)).

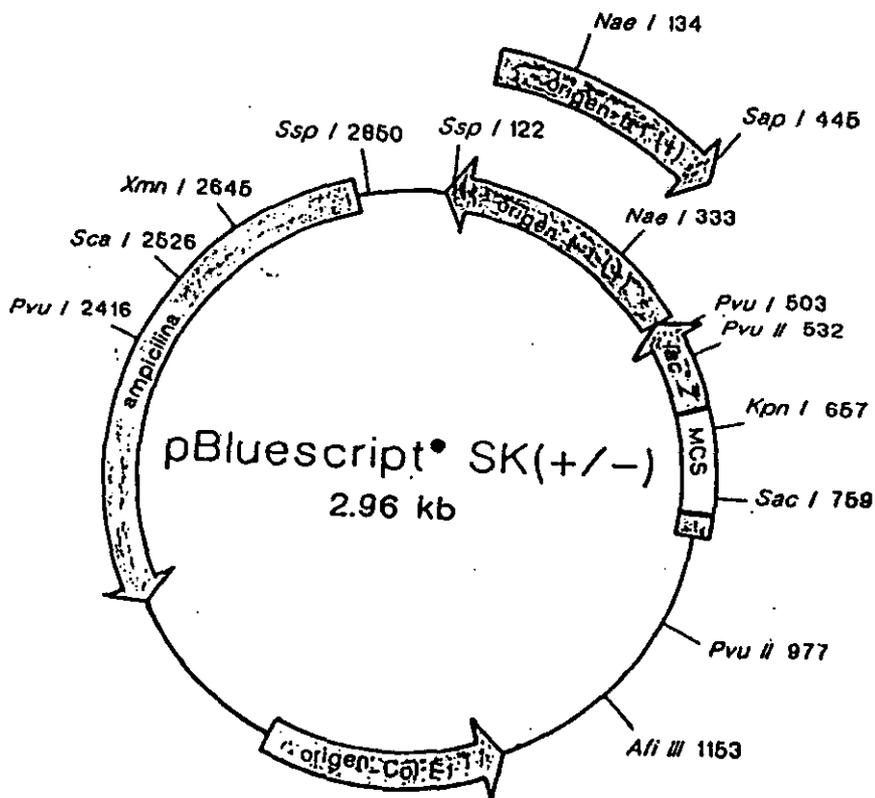


Figura 17. Mapa circular y secuencia de la región de clonación del fagemido pBluescript SK (+/-)

b. Construcción de una biblioteca de ADNc de cisticerco de *Taenia crassiceps* utilizando el vector UNI-ZAP^{RM} XR

b.1 Ligación del ADNc al vector UNI-ZAP^{RM} XR

El vector Uni-ZAP^{RM} XR fue digerido con Xho I y EcoR I para ligarse al ADNc. Dicho vector es capaz de ligar insertos de hasta 10 kb (kilobases) de longitud. Este vector puede ser de gran utilidad para la clonación de sondas de ADN o anticuerpos, ya que permite su liberación *in vivo* en la forma de fagemido y recuperar los insertos clonados en la forma de plásmido (Figura 17).

1. Se adicionó.

X µl de ADNc resuspendido anteriormente (aprox. 100 ng.)
0.5 µl de buffer 10 X de ligación
0.5 µl rATP 10 mM
1.0 µl de Vector UNI-ZAP^{RM} XR (1 mg/ml)
X µl de agua para un volumen final de 4.5 µl.

2. Entonces, se adicionó

0.5 µl de T4 DNA ligasa (4 Weiss U/µl)

3. Para el control de la reacción de ligación se autoligó el vector Uni-ZAP^{RM} XR.

1.0 µl Uni-ZAP XR (1 µg)
1.6 µl inserto para ligar (0.4 µg)
0.5 µl buffer 10 X de ligación
0.5 µl rATP 10mM (pH=7.5)
0.5 µl T4 DNA ligasa (4 Weiss U/µl)
0.9 µl de agua.

4. Se incubó toda la noche a 12 °C o 2 días a 4 °C. La reacción de ligación ADNc-vector puede formar concatámeros muy grandes. El rompimiento de estas cadenas se da por sobremaniplulación o múltiples ciclos de congelación-descongelación que pueden producir una baja eficiencia.

5. Al día siguiente, se creció una colonia de células E.coli XL1-Blue MRF', previamente seleccionadas en tetraciclina, en 50 ml de medio de cultivo LB-broth. Al mismo tiempo, se crecieron 50 ml de células VCS257 como control positivo del empaquetamiento del ADN silvestre en el extracto de Gigapack II.

6. Después se tomó 1 ml de cada una de las reacciones de ligación, incluyendo el control de ligación, y se empaquetó en Gigapack II. Si la biblioteca producida de este empaquetamiento tiene un título alto ($> 50,000$ pfu (plate formation unit)/reacción de empaquetamiento), entonces, empaquetar los 4 ml. restantes en 4 reacciones individuales.

b.2 Empaquetamiento de ADNc.

El ADNc ligado fue empaquetado en cabezas de lambda utilizando el Kit Gigapack Packing Extract (Stratagene) de acuerdo a las indicaciones del fabricante.

1. Se descongeló el número de extractos a utilizar y se colocaron sobre hielo. Al mismo tiempo se descongeló el extracto sonicado (tubo amarillo)
2. Rápidamente se congeló -descongeló el extracto (tubo rojo)
3. El ADN se adicionó, inmediatamente, al extracto (tubo rojo) y se colocó sobre hielo
4. Se adicionaron 15 μ l del extracto sonicado. Se agitó y se mezcló
5. Se centrifugó por 3-5 seg.
6. Se incubó a temperatura ambiente (22 °C) por 2 horas. No exceder el tiempo de incubación
7. Se adicionaron 500 μ l de buffer SM y 20 μ l de cloroformo. Mezclar gentilmente
8. Se centrifugó para sedimentar los restos bacterianos.
9. Se tituló el sobrenadante para determinar el número de pfu/ μ l. Almacenar a 4 °C.

b.3 Plaqueo y titulación de la biblioteca de ADNc

1. Para plaquear el producto de ligación empaquetado, se mezcló lo siguiente:

1 μ l de la reacción de empaquetamiento.

200 μ l de células XL1- Blue MRF' a D.O₆₀₀ = 0.5

y

1 μ l de una dilución 1:10 de la reacción de empaquetamiento

200 μ l de células XL1- Blue MRF' a D.O₆₀₀ = 0.5

Nota: El uso de otra línea celular puede disminuir dramáticamente el título de la biblioteca, ya que XL1- Blue MRF^r es una cepa rec A-, mcrA-, y mcrCB- mrr- que no degrada el ADN metilado.

2. Se incubó 15 min. a 37 °C.

3. Se adicionaron:

2-3 µl Top agar (48 °C)

15 µl IPTG 0.5 M (en agua)

50 µl de X-gal 250 mg/ml (en DMF)

4. Se plaqueó inmediatamente sobre cajas con NZY-Agar y se dejó solidificar por 10 min. Incubar a 37 °C

5. La formación de placas pueden ser visibles después de 6-8 horas de incubación. Las placas del fondo de reacción son azules y su título puede ser de 1×10^5 pfu/mg, las placas recombinantes son de color blanco y pueden ser de 10 a 100 veces más que las otras.

La biblioteca primaria puede ser inestable, por lo tanto, se recomienda amplificarla inmediatamente.

b.4 Amplificación de la biblioteca Uni-ZAP^{RM} XR

Usualmente se recomienda amplificar las bibliotecas producidas en vectores de lambda para hacerlas más estables y aumentar el título de éstas. Sin embargo, no se recomienda realizar más de una amplificación ya que disminuye el crecimiento de las clonas y puede ser poco representativo.

Nota: Es importante que la biblioteca en Uni-ZAP^{RM} XR no sea contaminada con fagos ayudadores filamentosos ya que bajas cantidades de fagos es suficiente para que éste se convierta en un fagemidos pBluescript. Si se llegara a contaminar la biblioteca del fago Uni-ZAP^{RM} XR, con el fago filamentosos, adicionar pocos microlitros de cloroformo.

Protocolo de amplificación

El siguiente protocolo se utilizó para amplificar la biblioteca Uni-ZAP^{RM} XR.

Día 1

1. Se inoculó una colonia de la cepa de E. coli XL1- Blue MRF'o alguna otra cepa disponible en 50 ml de LB- broth suplementado con 0.2% de maltosa y 10 mM de MgSO₄.
2. Se creció toda la noche en agitación a 30 °C. La baja temperatura asegura que las células no sobrecrezcan, ya que al adicionar el fago, éste se adhiere a las células muertas y puede inducir la subestimación del título de la biblioteca.

Día 2

3. Las células se centrifugaron a 2, 000 rpm. por 10 min.
4. Se eliminó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 15 ml de 10 mM de MgSO₄ (No agitar con vortex)
5. Las células se diluyeron a D.O₆₀₀ = 0.5 en 10 mM de MgSO₄.
6. Se infectaron 600 µl de las células con aprox. 50, 000 bacteriofagos/ placa de 150 mm.

Nota: No adicionar más de 300 µl de la dilución del fago.

7. Se incubó a 37 °C por 15 min.
8. Se adicionaron 6.5 ml de top agar fundido, agitar y vertir sobre la placa de NZY
9. Las placas se incubaron a 37 °C por 6-8 horas. No permitir que las placas crezcan más de 1-2 mm.
10. Se adicionaron 8-10 µl de buffer SM. Almacenar en agitación durante toda la noche a 4 °C (en agitación lenta). Esto permite que el fago difunda en el buffer.

Día 3

11. Se recuperó la suspensión de bacteriofagos de cada una de las placas, y se lavaron con 2 ml de buffer SM. Hacer un pool y adicionar cloroformo a una concentración final del 5 % e incubar por 15 min a temperatura ambiente.
12. Se eliminaron los restos bacterianos por centrifugación a 2, 000 xg. por 10 min.
13. Se recuperó el sobrenadante y se adicionó cloroformo a una concentración final del 0.3%. Almacenar a 4 °C. Se recomienda almacenar algunas alicuotas en 7% de DMSO a -70 °C.
14. Se determinó el título de la biblioteca amplificada, infectando células con diferentes diluciones del fago. (Asumiendo que la biblioteca tiene un título de aprox. 10^9 - 10^{12} pfu/ml).

c. IDENTIFICACION Y ANALISIS DE CLONAS RECOMBINANTES

Para la identificación de las proteínas protectoras contenidas en las fracciones de 56, 66 y 74 kDa compartidas por el cisticerco de *T. solium* y *T. crassiceps*. Después de la preparación de la biblioteca de bacteriofagos recombinantes, la identificación y aislamiento de las clonas de interés se llevo a cabo utilizando el método del inmunoscreening con proteína A marcada con I-125. Los bacteriofagos se plaquearon a una densidad apropiada, y se transfirieron por capilaridad a un filtro de nitrocelulosa. Este se puso en contacto con un anticuerpo policlonal, dirigido contra las fracciones de 56, 66 y 74 kDa del cisticerco de *T. crassiceps*, marcado con proteína A I-125 radiactivo. Las placas hiridizadas fueron identificadas por el alineamiento de la autorradiografía con la placa de agar originalmente transferida. Estas colonias fueron aisladas y almacenadas para su posterior análisis. Este método es válido para la identificación de un bajo número de bacteriofagos recombinantes que contienen secuencias de interés en bibliotecas de ADNc o ADN genómico (Manniatis, 1989). Las clonas seleccionadas fueron reconfirmadas por una segunda y tercera inmunodetección utilizando anticuerpos de cerdos infectados experimentalmente con cisticercos de *T. solium*

c.1 Screening inmunológico de la biblioteca de expresión de cisticerco de *T. crassiceps* en Uni-ZAP^{XR} utilizando anticuerpos policlonales marcados con proteína A I-125.

El método inmunológico puede ser utilizado para detectar alguna proteína de la cual ya se tiene un anticuerpo específico. A pesar de que los anticuerpos son ligandos complejos, tienen la ventaja de unirse específicamente, y con alta afinidad, a una pequeña región del antígeno (epítope). Por otra parte, también se debe considerar que algunos epítopes pueden formar estructuras complejas debido al plegamiento de las regiones no continuas de una o más cadenas polipeptídicas (Geysen, 1987). Sin embargo, las proteínas de fusión o fragmentos de la proteína expresada pueden formar epítopes simples capaces de retener, al menos en parte, su reactividad inmunológica. Idealmente, el anticuerpo es capaz de detectar de 50-100 pg. de antígeno en una área tan pequeña como el de una colonia bacteriana. Sin embargo, la cantidad de antígeno presente en colonias y placas de proteínas de fusión expresadas varia ampliamente dependiendo de la toxicidad de la proteína, su proporción de degradación, y su estado físico. Considerando la capacidad de detección de los anticuerpos, éste procedimiento permite que hasta la proteína de fusión más lábil pueda ser reconocida. Para la identificación de las clonas de interés para efectos de vacunación, se utilizó el siguiente panel de sueros policlonales, suero de ratón anti- cisticerco de *Taenia crassiceps*, suero de cerdo anti-cisticerco de *Taenia solium* y sueros de conejo contra las fracciones antigénicas de 56, 66 y 74 kDa del cisticerco de *Taenia crassiceps*.

Cabe mencionar que los antisueros utilizados para dichos efectos, frecuentemente, contienen moderados títulos de anticuerpos anti-E. coli. Por lo que fueron previamente adsorbidos para eliminar la posibilidad de identificar clonas falsas positivas. La adsorción se llevó a cabo por el método de inmovilización de bacterias a filtros de nitrocelulosa, y ésta se continuó hasta que el título de anti- E. coli fue eliminado completamente (Manniatis, 1989).

Metodología.

1. Se infectaron 0.1 ml de bacterias XL-1 Blue MRF' con 0.1 ml de SM que contenía 3×10^4 pfu (placa de 90 mm) o 10^5 pfu (placa de 150 mm) de la biblioteca de expresión y se incubó por 20 min. a 37°C .
2. Se adicionaron 2.5 ml (placa de 90 mm) ó 7.5 ml (placa de 150mm) de top agar e inmediatamente se agitó y vertió sobre una placa de NZY-agar. Se dejó solidificar y se incubó de 3.5 a 5 horas a 42°C
3. Se numeraron los filtros de nitrocelulosa y se sumergieron en una solución de 10 mM de isopropiltio- β -D-galactosidasa (IPTG) en agua destilada estéril. Se dejaron por 5-10 min. Posteriormente se secaron y esterilizaron bajo luz UV durante aprox. 20 min.
4. Se colocó un filtro por placa evitando la formación de burbujas y se incubó por 18 horas a 37°C
5. Al día siguiente se quitó la tapa de la caja y se continuó la incubación por 30 min. Con ayuda de una aguja, se marcaron tres puntos para dar una orientación al filtro sobre el agar. Posteriormente, se quitó el filtro y se sumergió en una solución de bloqueo (20 % de suero fetal en 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH=8.0 (TBS)) para eliminar los restos de agarosa.
6. Los filtros se lavaron de 2-4 veces en TBS 1x durante 10 min.
7. Cada filtro se colocó en TBS que contenía el anticuerpo primario a la dilución óptima (7.5 ml para filtros de 82 mm y 15 ml. para filtros de 138 mm) y se agitó lentamente durante 18 horas a 4°C . La utilización de altas diluciones del anticuerpo dan un fondo bajo y permiten la detección de antígenos desnaturalizados o concentraciones de 50-100 pg.).

Nota: La solución de anticuerpo puede ser almacenada a 4°C y rehusada varias veces, la adición de azida de sodio a una concentración de 0.05 % inhibe el crecimiento de microorganismos.

8. Los filtros se lavaron durante 10 min. en cada una de las siguientes soluciones (usar 7.5 ml para filtros de 82mm y 15 ml para filtros de 138 mm).

TBS + 0.1 % de suero fetal bovino

TBS + 0.1 % de suero fetal bovino + 0.1% Nonident P-40.

TBS + 0.1 % de suero fetal bovino

9. El complejo antígeno-anticuerpo se detectó por marcación de éste último con proteína A I-125 radiactivo diluido en TBS + 0.1 % BSA e incubado de 1.5-2.5 horas en agitación lenta. Se colocó 1mCi de proteína A I-125 por cada filtro de 132 mm.

10. Lavar durante 10 min. en agitación lenta con cada uno de las siguientes soluciones

TBS + 0.1 % de BSA

TBS + 0.1 % de BSA + 0.1% Nonident P-40. Lavar dos veces.

TBS + 0.1 % de BSA

11. Se secaron sobre papel Whatman No 3 y se expusieron para autoradiografía a -70 °C durante 3 días.

12. Después de revelar la autoradiografía se alineó el filtro con la placa original, identificando las colonias positivas. Estas se tomaron con un palillo y se colocaron en 1.0 ml de SM con 30 µl de cloroformo. Se almacenaron a 4 ° C de esta forma la muestra es estable por 1 año.

c.2 Liberación *In vivo* del pBluescript de UNI-ZAP^{RM}XR utilizando el sistema ExAssist/ SOLR

El sistema ExAssist/ SOLR permite la liberación eficiente del fagemido pBluescript Uni-ZAP^{RM}XR. El fago ayudador Exassist presenta una mutación ámbar que evita la replicación de su genoma en la cepa de *E. coli* SOLR no supresiva. Permitiendo la liberación y replicación del fagemido en la célula hospedera, evitando su coinfección con el fago ayudador Exassist, ya que éste no puede replicarse en la cepa SOLR, por lo que éste no es el método recomendable para la obtención de ADN de cadena sencilla.

El vector Uni-ZAP^{RM}XR permite, *in vivo*, la obtención, liberación y recircularización del inserto clonado en el vector lambda así como su obtención en la forma de fagemido. Esta liberación *in vivo* depende de la secuencia de ADN que Stratagene ha colocado en el fago lambda que codifica para las proteínas que reconocen el origen de replicación del bacteriofago fl e inician la síntesis de la cadena positiva de ADN. Sin embargo, el origen de replicación puede ser dividido en dos partes sobrepuestas (1) el sitio de iniciación y (2) el sitio de terminación de la síntesis de ADN. Durante la infección simultánea de *E. coli* con el vector lambda y el bacteriofago fl, las proteínas "ayudadoras" (proteínas fl del vector lambda o M13) reconocen el punto de origen del vector lambda y rompe una de las cadenas del ADN. En éste sitio se inicia la nueva síntesis de ADN que duplica la región. La síntesis de la nueva cadena de ADN continua a través del inserto clonado hasta la señal de terminación localizada en la región 3' del vector. Entonces, la cadena sencilla de ADN que contiene la secuencia de iniciación y terminación, es recircularizada por el producto del gene II del fago fl (Figura 17). Cuando el vector Uni-ZAP^{RM}XR, es recircularizado, las señales de iniciación, terminación y no están contenidas dentro de éste ADN. El origen fl se vuelve funcional y esto permite que el ADN sea empaquetado y secretado de *E. coli*, el fagemido es recolectado en el sobrenadante de las células tratadas por calentamiento a 70 ° C. Este tratamiento mata todas las células de *E. coli*, en tanto el fagemido permanece resistente al calor. La producción del ADN de doble cadena, se logra al incubar el fagemido con células frescas de *E. coli* y ampicilina. Posteriormente, se purifica el plásmido para la determinación del tamaño del inserto, secuenciación de ADN de doble cadena, subclonación, mapeo y expresión de la proteína. Sin embargo, las colonias de pBluescript también pueden ser utilizadas en la secuenciación de ADN de cadena sencilla utilizando el método de Sanger y/o estudios de mutagénesis.

Procedimiento

1. Se tomó la placa lítica de interés y se colocó en 500 μ l de buffer SM y 20 μ l de cloroformo. Se agitó en vortex, para liberar las partículas del fago, y se incubó 1-2 horas a temperatura ambiente o a 4 ° C durante toda la noche.

2. Se mezclaron:

200 μ l de células XL 1-Blue D.O₆₀₀ = 1.0

100 μ l del stock del fago ($> 1 \times 10^6$ pfu/ml)

1 μ l fago ayudador ExAssist ($> 1 \times 10^6$ pfu/ml)

y se incubó a 37 ° C por 15 min.

3. Se adicionaron 3 ml de medio 2x YT y se incubó 2-2.5 horas a 37 ° C en agitación.

Nota: No siempre se observó un crecimiento de aspecto turbio

4. El tubo se calentó a 70 ° C por 20 min. y se centrifugó a 4000 xg. durante 15 min.

5. Se colectó el sobrenadante que contenía el plásmido empaquetado en forma de partículas de fago filamentoso. Esta muestra es estable a 4 ° C por 1-2 meses.

6. Para recuperar el fagemido se infectaron 200 μ l de células SOLR (D.O₆₀₀ = 1.0) con 50 μ l del fago. Se incubó a 37 ° C por 15 min.

7. Se plaquearon 100 μ l de dos diluciones de células infectadas en cajas LB-ampicilina (50 μ g/ml). Se incubaron toda la noche a 37 ° C:

Nota: Las colonias que aparezcan sobre la placa continen en el fagemido pBluescript de doble cadena que contiene el inserto de ADN clonado, las bacterias infectadas sólo con el fago ayudador no pueden crecer porque no contienen los genes de resistencia a ampicilina. Almacenar a -20 ° C en un stock con 15% de glicerol.

c.2.1 Purificación de plásmido de las clonas de interés para determinar el tamaño del inserto

Para la purificación del plásmido, se utilizó el Kit Clear Cut Miniprep (Stratagene), de acuerdo al protocolo sugerido por el fabricante. El kit tiene como principio la purificación de ADN libre de fenol. El protocolo de purificación es una modificación del método de lisis alcalina de Birnboim y Doly (1979), utilizada para preparación en pequeña escala. Después de la lisis bacteriana, el plásmido de ADN es unido a una resina de sílica, la cual es filtrada y lavada. El plásmido de ADN es eluido con un buffer de baja salinidad y éste puede ser utilizado directamente para análisis de restricción, ligación y reacciones de secuenciación.

1. Se inoculó una colonia bacteriana en medio LB-ampicilina (50 mg/ml) y se incubó en agitación a 37 ° C durante toda la noche.
2. Del cultivo se tomó una alicuota de 1.5 ml y se centrifugó por 1 min.
3. Se eliminó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió con tres gotas de la solución 1 (una gota contiene aprox. 35 µl), se agitó en vortex para resuspenderla completamente.
4. Se adicionaron cinco gotas de la solución 2. Se mezcló varias veces por inversión (no agitar con vortex)

Nota: Tener precaución al utilizar la solución 3, la cual contiene guanidina-HCl, que es un fuerte irritante.

5. Se centrifugó por 5 min.
6. La resina de unión a ADN se agitó en vortex y se adicionaron 15 µl de ésta al sobrenadante recuperado. Se mezcló gentilmente.
7. La mezcla se transfirió a un copa de centrifugación y se centrifugó por 30 seg. (la resina y el plásmido de ADN son retenidos en la copa de cetrifugación).
8. Se lavó la resina con 400 µl de buffer de lavado diluido en etanol y se centrifugó por 30 seg. asegurandose de haber eliminado todo el buffer de lavado.
9. Se transfirió la copa de centrifugación a otro tubo y se adicionaron 50-100 µl de buffer TE y se centrifugó por 30 seg. Se descartó la copa de centrifugación y se colectó el plásmido de ADN en el receptáculo inferior.

c.2.2 Digestión del plásmido con Bam HI y Xho I para determinar el tamaño del inserto

1. Se adicionó

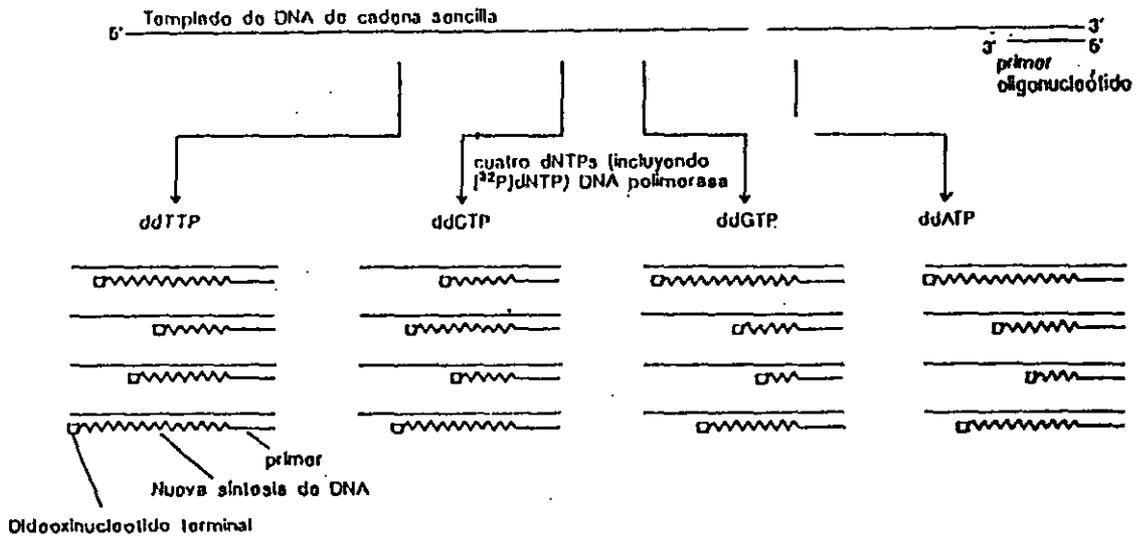
- 2.0 μl de plásmido (200 μg)
- 6.0 μl agua estéril
- 1.0 μl buffer universal 10 X
- 0.5 μl Bam HI (Amersham, 10 U/ μl)
- 0.5 μl Xho I (Stratagene 10 U/ μl)

2. Se incubó a 37 ° C por 2 horas

3. Se tomó una alícuota de 5 μl para su análisis de digestión.

4. Se corrió una electroforesis en un gel al 0.8 % de agarosa, 0.07% de bromuro de etidio, a 100 volts durante 2 horas, utilizando TBE 1 X como buffer de corrida.

El gel se observó sobre un transiluminador de luz UV (Ver Resultados. Figura 4)



Las cadenas nuevamente sintetizadas terminan cuando un ddNTP es incorporado en lugar del dNTP normal

Desnaturalización y separación de fragmentos de DNA marcados por electroforesis

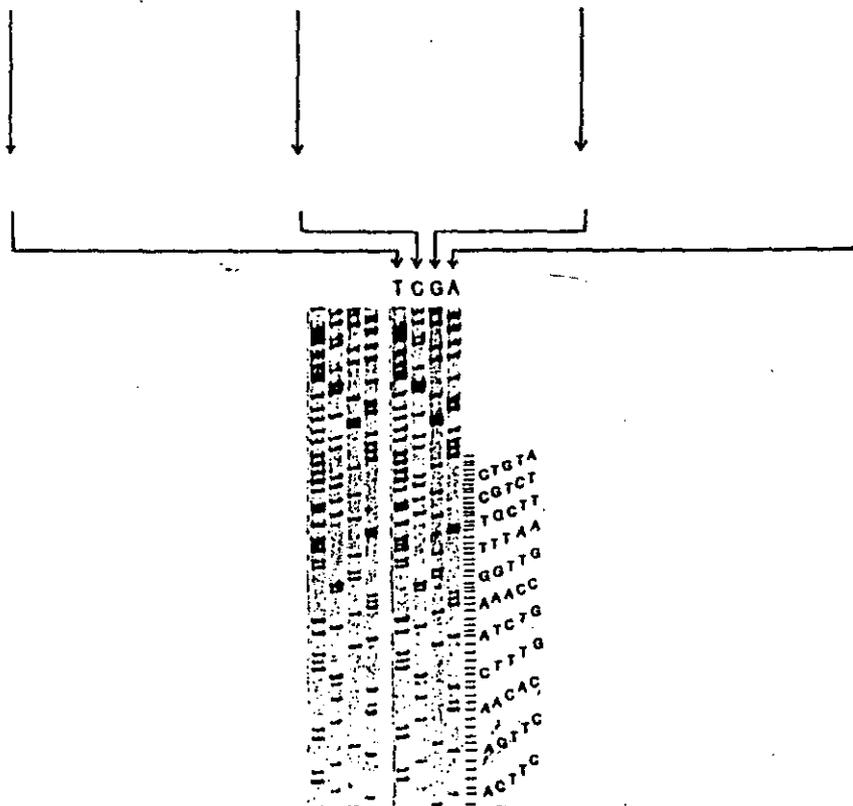


Figura 18. Diagrama de la estrategia de secuenciación por el método de Sanger o terminación en cadena (Tomado de Maniatis, 1989)

d. Determinación de las secuencias que codifican para las proteínas recombinantes de interés para efectos de vacunación

Secuenciación directa con ADN de doble cadena utilizando el Kit de Secuensa
Versión 2.0

La secuenciación de ADN se basa en el método de terminación en cadena y la construcción de vectores de clonación de cadena sencilla. Este método involucra la síntesis *in vitro* de una cadena de ADN utilizando una ADN polimerasa, un templado de ADN de cadena sencilla y un primer (Maniatis, 1989). La síntesis es iniciada en el sitio donde un oligonucleótido se alinea al templado y la reacción es detenida por la incorporación de un nucleótido análogo, 2'3'-dideoxynucleósido 5' trifosfato (ddNTPs), que ha perdido el grupo 3'-OH necesario para la continuación de la elongación de la cadena. Cuando se mezclan los cuatro nucleótidos y un ddNTP, la polimerización catalizada por la enzima es terminada en el sitio donde el ddNTP fue incorporado. Este tipo de secuenciación involucra la preparación de cuatro reacciones donde cada una de estas contiene un diferente ddNTP y un nucleótido marcado radiactivamente, el cual al ser incorporado permite que las cadenas sintetizadas y separadas en geles de acrilamida de alta resolución puedan ser visualizadas por autorradiografía (Figura 18).

d.1 Método de Sanger para secuenciación de ADN o reacción de terminación en cadena.

1. Desnaturalización del ADN de doble cadena.

El ADN se desnaturalizó por adición de 0.1 vol de 2M NaOH, 2 mM EDTA y se incubó por 30 min. a 37 ° C. La mezcla se neutralizó por adición de 0.1 vol. de 3 M de acetato de sodio pH= 4.5 - 5.5 y se precipitó con 2- 4 vol. de etanol (-70°C, 15 min.). La pastilla se lavó con etanol al 70%. Se dejó secar y posteriormente se disolvió en 7 µl de agua destilada.

Para la secuenciación de las clonas identificadas se utilizaron los siguientes primers

- Primer -20 de M13 3' TGACCGGCAGCAAAATG 5'
- Reverse Primer 5' AACAGCTATGACCATG 3'
- T3 Primer 5' ATTAAGGGTGAGTAAAG 3'
- T7 Primer 3' GATATCACTCAGCATAA 5'
- 1016 Primer 5' CTTCTTAAATTCATAGACA 3'
- 1017 Primer 5' TTCATGTCAAGTCGACTGT 3'
- 1018 Primer 5' CCTCAGAAGGAGATGCAA 3'

2. Se mezcló:

ADN	7 µl
H ₂ O	µl (para ajustar el volumen total)
buffer de reacción	2 µl
primer a utilizar	1 µl

Total 10 µl

La mezcla se alineó por calentamiento a 65 ° C durante 2 min. Se dejó enfriar a < 35°C. Se centrifugó y se colocó en hielo. Se utilizó en la etapa 6.

3. Se colocaron 2.5 μ l de cada una de las mezclas de reacción G, A, T y C. Se conservaron a temperatura ambiente para continuar en la etapa 5 y 7.

4. Se diluyó el labeling mix 5 veces a la concentración necesaria, dGTP o dTTP y se conservó para la etapa 7.

Labeling mix ----- 2 μ l
H₂O----- 8 μ l

5. Se preincubaron los 4 tubos de la etapa 3 (G,A,T y C) a 37°C

6. Reacción de marcación

A la mezcla de ADN alineado con el primer	10 μ l
Adicionar: DTT 0.1M	1 μ l
Labeling mix diluido	2 μ l
(35S) dATP (10 mCi/ml)	0.5 μ l
Polimerasa Secuencasa Version 2.0 diluida (1:8)	2 μ l

	μ l

Se mezcló e incubó a temperatura ambiente por 2-5 min.

7. Reacción de terminación.

Se transfirieron 3.5 μ l de la reacción de marcación a cada uno de los tubos de terminación (G,A,T y C), se mezcló y continuó la incubación a 37 °C por 5 min.

8. La reacción se detuvo por adición de 4 μ l de la solución de stop

9. Inmediatamente antes de correr en el gel de secuenciación las muestras se calentaron a 75 °C por 2 min. Poner 2-3 μ l de la reacción por carril.

d.2 Gel de acrilamida desnaturalizante.

1. Para un gel tamaño regular al 8% (porcentaje estándar) mezcle:

Urea	49.5 gr.
Agua MilliQ	23 ml
Acril/Bis 38/2	20 ml.
5x TBE	20 ml.

2. Esta mezcla tardará en disolverse a temperatura ambiente. Para acelerar la disolución, ponga el vaso de precipitado dentro de un baño de agua a 45-50 ° C (a temperaturas mayores a 50 ° C la solución de acrilamida/bisacrilamida polimerizará espontáneamente). Ya disuelta, deje que la solución se enfríe a temperatura ambiente. El volumen final de la mezcla es aproximadamente 100 ml.
3. CUIDADOSAMENTE lave y seque los vidrios del gel. Una vez secos, aplique el agente siliconizante al vidrio pequeño (de preferencia dentro de la campana). Limpie el exceso de siliconizante y ensamble los vidrios y espaciadores.
4. Inicie la polimerización de la solución del gel agregando 0.675 μ l de persulfato de amonio al 10% y 25 μ l de TEMED. Sin demora alguna, vacíe la solución del gel en los vidrios previamente ensamblados, cuidando de no dejar burbujas. Deje que el gel polimerice en posición horizontal.
5. Cuando el gel ha polimerizado completamente, lavar con agua el molde que contiene el gel. Liberar cuidadosamente el peine y montar la cámara de electroforesis. Llenar la cámara superior e inferior con TBE 1x, aprisionando el peine al gel.
6. Precorrer el gel a 1700 volt por 30- 60 min.
7. Incubar las muestras a 75-80 ° C por 2 min. Llenar una jeringa con un poco de TBE 1x, sumergir y pasar la jeringa sobre la superficie del gel para eliminar los restos de acrilamida y urea.
8. Señalar cada carril e identificarlos con cada una de las letras que se van a colocar en cada uno de estos. Colocar 1-3.5 μ l de reacción por carril y correr a 1700 volts durante el tiempo seleccionado
9. Al terminar de correr la electroforesis transferir el gel a un papel filtro Whatman No. 3 del tamaño del gel.

10. Secar a 80 ° C con vacío durante 45 min. a 2 hrs.
11. Exponer el gel a una autorradiografía.
12. Revelar la autorradiografía y proceder a leer la secuencia.

e. Análisis de las secuencias de interés para efectos de vacunación.

El análisis de las secuencias codificadas por las clonas recombinantes de interés para efectos de vacunación se realizó utilizando el programa computacional PC/Gene Intelligent A.C Release 6.01 (1989). Asimismo, el análisis de identidad se llevó a cabo con el programa TFASTA con la matriz PAM120.

El programa PC/GENE contiene 70 programas para el análisis de secuencias de ácidos nucleicos y proteínas. Cada programa lleva a cabo su análisis de acuerdo a los algoritmos, parámetros o bases en los cuales está diseñado cada uno de estos. Los programas de análisis están basados sobre la información publicada en años recientes. La utilización de los programas permiten organizar los datos de una secuencia de ADN o proteína evaluando todas las opciones y parámetros. Dentro de cada una de estas dos categorías es factible utilizar programas para análisis de estructura primaria, estructura secundaria, comparación de secuencias, análisis de restricción, así como un análisis estadístico de la secuencia analizada.

El programa de TFASTA permite que una secuencia desconocida sea traducida y comparada con una banco de secuencias de ADN o proteínas. Por ejemplo, FASTA puede comparar la secuencia de una proteína con todas las secuencias proteicas contenidas en la base de datos NBRF PIR. El programa utiliza el algoritmo descrito por Lipman y Pearson (1985), el cual lleva a cabo un análisis rápido, alineando regiones similares entre las dos secuencias a comparar. Además, éste programa reporta únicamente los mejores alineamientos identificados entre las secuencias comparadas e incluye un análisis estadístico específico de regresión en base al número de secuencias contenidas en la biblioteca

SINTESIS QUIMICA DE PEPTIDOS

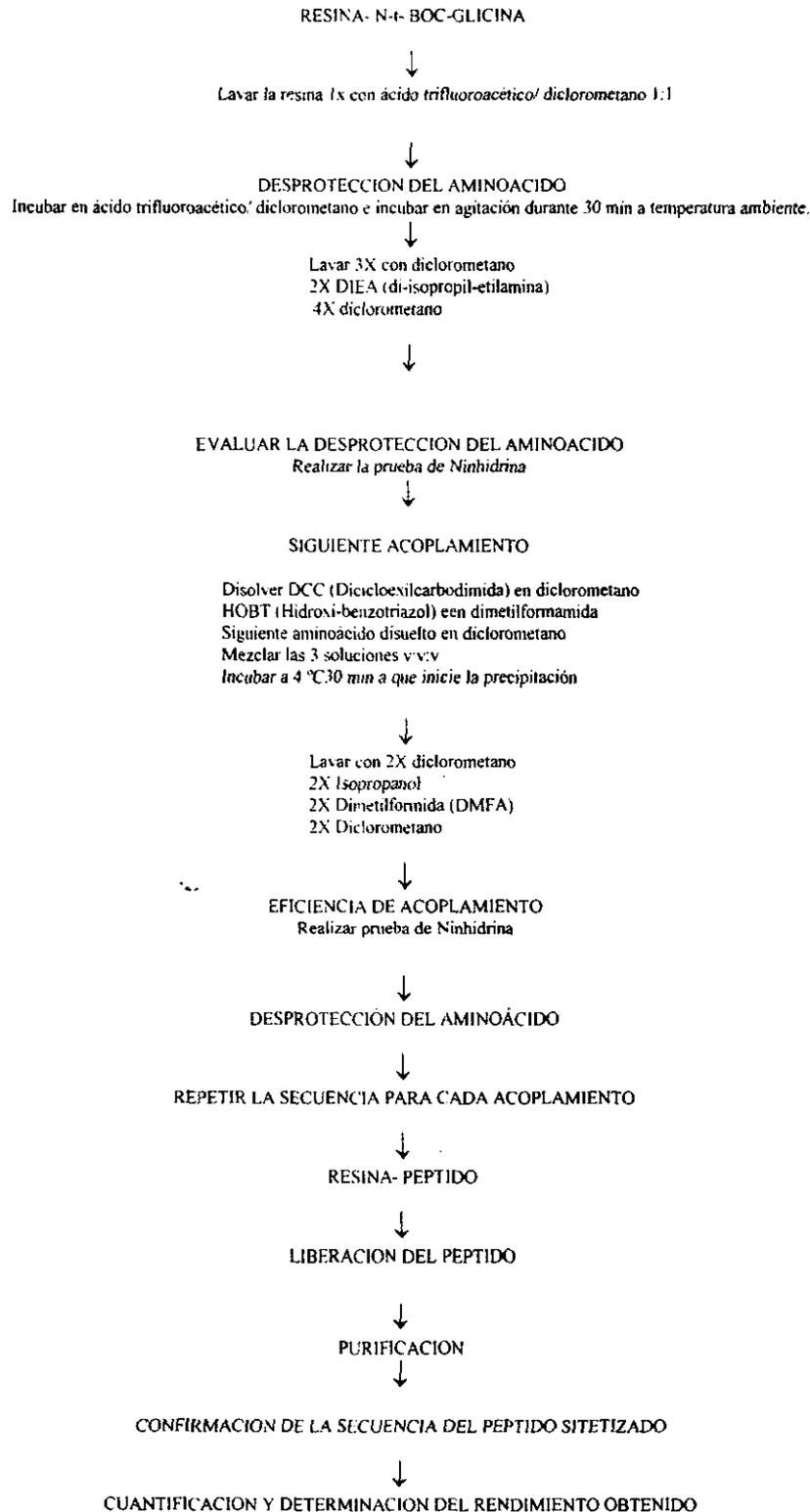


Figura 19. Diagrama de la síntesis química de péptidos en fase sólida (Van Regenmortel, 1988)

f. Identificación, selección y síntesis de epítopes (regiones más inmunogénicas) de relevancia para efectos de vacunación, utilizando el método de WOLF, 1988.

Dada una secuencia que codifique para una proteína de interés, utilizando alguno de los diversos métodos de predicción de epítopes, puede en ella llevarse a cabo la predicción de las regiones más inmunogénicas. Estos programas varían de acuerdo a los algoritmos y criterios considerados en cada uno como es la posición de horquillas, giros, flexibilidad de la secuencia proteica e identificación de regiones de alta hidrofobicidad, las cuales son consideradas como un factor que contribuye al plegamiento y periodicidad de residuos hidrofóbicos. Además, el conocer la estructura de varias proteínas ya bien caracterizadas, ha permitido establecer parámetros para la predicción de epítopes continuos considerando únicamente la estructura primaria de la proteína a analizar..

Una vez realizada la predicción de epítopes se seleccionan aquellas que posiblemente presenten mayor inmunogenicidad. Posteriormente se lleva a cabo la síntesis de las regiones más relevantes, utilizando el método de fase sólida (Van Regenmortel, 1988). Este método implica el crecimiento de una cadena peptídica la cual esta unida covalentemente, a través del C- terminal, a un soporte sólido insoluble. La síntesis se lleva a cabo por la adición sucesiva de los aminoácidos que conforman el péptido a sintetizar. Al finalizar la síntesis del péptido, éste es separado de la fase sólida y de los grupos protegidos de la cadena lateral de aminoácidos.

En la figura 19 se resume la metodología utilizada para la síntesis de péptidos sintéticos en fase sólida.

g. Evaluación de péptidos sintéticos a través de la detección de su capacidad de ser reconocidos por sueros de individuos infectados mediante un ensayo de ELISA

Una vez realizada la predicción de epítopes tipo B e identificación de regiones altamente inmunogénicas se procedió a evaluar, a través de un ensayo de ELISA, la capacidad de tienen cada uno de los péptidos para ser reconocidos por sueros de individuos sanos e infectados.

La prueba de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) es un ensayo simple, específico, altamente reproducible para la detección del nivel de inmunoglobulinas en sobrenadantes de cultivo celular y otros fluidos biológicos, e incluso puede ser utilizado para detectar subclases de inmunoglobulinas (IgG, IgM e IgA) e incluso aquellas que se presentan un muy bajas concentraciones (IgG₄ e IgE).

Estudios previos indican que el ensayo de ELISA para IgG, IgM e IgA permite la detección de 500 ng./ml. a 1 ng./ml de anticuerpos, en tanto para IgE y subclases de IgG, la sensibilidad se da desde 100 ng./ml hasta 100 pg./ml. (Coligan, 1992).

Técnica de ELISA para la evaluación de péptidos sintéticos en el diagnóstico de la cisticercosis

- a) Se utilizan placas para ELISA fondo en U de 96 pozos tipo Immulon 1 (Maxisorp 96, Nunc)
- b) Las placas se sensibilizan con 100 μ l de una solución de 1-2 μ g/ pozo del péptido a evaluar en buffer de carbonatos pH= 9.5 se sella herméticamente y se incuba toda la noche a temperatura ambiente (25 ° C).
- c) Se descarta la solución y las placas se lavan 5 veces con 200-250 μ l /pozo de PBS-Tween al 0.3%.
- d) Se bloquean con 100 μ l de una solución de albúmina sérica bovina al 1% en PBS y se incuba durante 1 hr. A 37 C
- e) Se lava como en el paso c)
- f) Se adicionan 100 μ l /pozo de:
 - PBS-BSA 1% para blancos de reacción
 - Sueros controles diluidos 1:100 en PBS-BSA%:
 - 1 positivo alto, 1 positivo bajo y 10 negativos.
 - Los sueros en estudio diluidos 1:100 en PBS-BSA%
- g) Se incuba 1 hr. A 37 C
- h) Se lava como en c).
- i) Se adicionan 100 μ l /pozo del conjugado acoplado a fosfatasa alcalina (anti-IgG de ratón acoplada a fosfatasa alcalina) dilución 1:1000 en PBS-BSA 1%. La dilución del conjugado se determina previamente partiendo de la sugerida por el comerciante. Se incuban 1 hr. a 37 C.
- j) Se lava como en c).
- k) Se adicionan 100 μ l/ pozo del sustrato (p-nitrofenil fosfato disódico 1 mg/ml en amortiguador de dietanolamina). Se incuba 15-30 min. a 37 c.
- l) Se adicionan 50 μ l / pozo de NaOH 2N para parar la reacción.
- m) Las placas se leen inmediatamente en un lector de microplacas a 405 nm.

XI. APENDICE II

**Análisis de identidad de las secuencias de aminoácidos de las clonas recombinantes
KETc1, KETc7, KETc11 y KETc12,
utilizando el programa TFASTA y la matriz PAM120**

Análisis de la secuencia que codifica para el péptido recombinante KETc1

Tabla V. Análisis de identidad de la secuencia de aminoácidos codificada por la clona KETc1 de acuerdo al programa TFasta utilizado la matriz PAM120.

Homología con la secuencia codificadora	No. de acceso	ORF	No. de aminoácidos de la proteína homóloga	No de aminoácidos sobrelapados	Porcentaje de identidad
*za55c04.rl DNAc de la clona INLsF de soares de hígado y bazo fetal de <i>H. sapiens</i>	W00946/W00946 za55c04	3	109	12	75
*Secuencia de la región 3' del DNAc del Gene humano HUMGS0006304	CO2064	1	126	12	75
* za55c04.sl DNAc de la clona 296454 de <i>Homo sapien</i>	N74626	4	165	12	75
* ThESTzy73d08.rl Región 5' del DNAc de la clona tgyz73d08.rl de <i>Toxoplasma gondii</i>	N83109	2	91	10	90
* ThESTzy73d08.rl TgRH Región 5' del DNAc de la clona tgyz73d08.rl de taquizoito de <i>Toxoplasma gondii</i>	N83109	2	91	10	90
Fragmento Msel DNA genómico de islas CpG de <i>H. sapiens</i> . clona l8e3	Z60121/HST8E3R	5	104	11	63.6
Secuencia parcial de G-P-DH de <i>Drosophila miranda</i> NDSSC 14011-0101.1	DMU47882	2	326	11	72.7
*z070a11.rl clona de DNAc de pancreas de <i>H. sapiens</i> Stratagene (# 937208)	emb/AA155605	1	69	12	41.6
*zr65f07.rl región 5' de la clona de DNAc 668293 de soares NhHMPu S1 de <i>H. sapiens</i>	emb/AA242911	4	119	12	58.3
Secuencia parcial de Glicerol 3 P-Deshidrogenasa de <i>Drosophila miranda</i>	L41251/DMLGPDHM	1	347	11	72.7
*za 89d07.rl clona DNAc de clona 299725 de soares de pulmón fetal NbHL19W de <i>H. sapiens</i>	W05792	6	130	12	58.3
Secuencia completa de la subunidad del gene tipo 2 de fimbriae de <i>A. anaestlundii</i>	ACYFIB	2	719	11	54.54
DNAc de la clona HFBE159 de <i>H. sapiens</i> EST05292	T074037HS4033	5	90	11	63.6

* Única información disponible ya que no existen referencias adicionales respecto a la descripción y función de la secuencia reportada.

La proteína KETc1 presentó homología con 13 proteínas, algunas con pequeñas regiones de la deshidrogenasa de *Drosophila miranda* y dos clonas de *Toxoplasma gondii*

Análisis de la secuencia que codifica para la proteína recombinante KETc 7

Tabla VI. Análisis de identidad de la secuencia de aminoácidos codificada por la clona KETc 7 de acuerdo al programa TFASTA utilizado la matriz PAM120.

Homología con la secuencia codificadora	No. de acceso	ORF	No. de aminoácidos de la proteína homóloga	No de aminoácidos sobrelapados	Porcentaje de identidad
Cosmido T20B6 de <i>Caenorhabditis elegans</i>	emb/AF000193/CEAF193	3	4753	91	38.4
DNA de proteína de la GRP 1.8 rica en glicina, localizada en la pared celular de frijol	X13596/PVGRPI8	4	641	68	39.7
RNAm de una proteína tomate rica en glicina de (clona wl-8)	X55691/LEEXTEN11	5	206	93	43
Secuencia de RNAm (clona wl-8 L) de una extensina de tomate	X55692/LEEXTEN12	2	206	93	43
Secuencia parcial del RNAm de una proteína rica en hidroxiprolina (sbHRGP1) de soya	SOYHRGPC	1	118	91	34
RNAm del exón 2 que codifica para una proteína rica en hidroxiprolina (HRGP) de <i>P. vulgaris</i>	PHVHRGPA	1	371	97	41.2
ORFs del gene de <i>S. haematobium</i> que codifica para una proteína localizada en la cubierta del huevecillo	SCMESPAB	6	345	83	39.7
Clona I20N2IT7 de DNAC de <i>Arabidopsis thaliana</i> T249	T43986	6	115	57	45.6
DNAC de la clona I98H4T7 de <i>Arabidopsis thaliana</i> 18275	H76570	5	187	87	33.3
* Gene GRP22 de <i>B. napus</i> que codifica para la proteína aa1-291 rica en glicina	Z15045/BNGRP22G	5	385	86	34.8
Gene HRGPnt3 que codifica para una extensina de tabaco	X13885	3	1447	88	36.3
* Secuencia no reportada previamente	D82429/HUMHBC4702	3	115	88	36.3
DNAC de la clona I98H4T7 de <i>Arabidopsis thaliana</i> 18375	H76570/AT57016	5	187	88	32.9
DNAC de la clona I59F24T7 de <i>Arabidopsis thaliana</i> 12886	R30281	6	78	69	33.3
* Secuencia de RNAm de <i>V. unguiculata</i> que codifica para una proteína similar a la extensina, ext26	X86030	1	236	97	40.2
* Clona de DNAC z181d12.r1 de colón de <i>H. sapiens</i> Stratagene (-937204)	emb/AA100476/AA100476	1	139	88	36.3
* Región 5' de la clona I87015 de DNAC yp10d04.r1 de <i>H. sapiens</i>	H50796	3	104	69	34.7
* Secuencia de RNAm de <i>V. unguiculata</i> que codifica para una proteína parecida a la extensina, ext127	X86028/VUREXT127	2	279	89	39.2
* Secuencia de completa de RNAm que codifica para una extensina de <i>Citharanthus roseus</i>	D86854/D86854	3	301	85	36.4
Secuencia completa del RNAm de <i>Gossypium hirsutum</i> que codifica para una proteína de pared celular rica en prolina	COTCWPPR	1	303	85	37.6
* Secuencia 3' de la patente US 5474925	I16155	3	303	85	37.6
Secuencia parcial del RNAm de mucina del epitelio de ratas Spregue-Dawley tratadas con dióxido de azufre	S65019	3	129	52	38.4
Secuencia completa del RNAm de la proteína ESG-2AA de <i>S. japonicum</i>	SCMESG2A	4	663	60	38.3
Terminal 3' del RNAm de <i>P. vulgaris</i> que codifica para una proteína rica en hidroxiprolina (HRGP)	PHVHRGPC	2	501	97	36
Secuencia completa del gene que codifica para una proteína localizada en la cubierta del huevecillo de <i>S. japonicum</i>	SCMEGP	5	380	60	36.6
* Región 5' de la clona I94685 yp90b11.r1 de <i>H. sapiens</i>	R89903	3	129	81	35.8
* Región 5' de la clona 353831 del DNAC de mc69h12.r1 soares de embrión de ratón NbNE 13.3 14.5	W42217/W42217	5	347	63	41.2

* Única información disponible ya que no existen referencias adicionales respecto a la descripción y función de la secuencia reportada.

Análisis de la secuencia que codifica para la proteína recombinante KETc 11

Tabla VII. Análisis de identidad de la secuencia de aminoácidos codificada por la clona KETc11 de acuerdo al programa TFasta utilizado la matriz PAM120.

Homología con la secuencia codificadora	No. de acceso	ORF	No. de aminoácidos de la proteína homóloga	No de aminoácidos sobrelapados	Porcentaje de identidad
*Región 5' de la clona AFCE9A05 de la hembra adulta <i>Malayi Brugia</i>	AA123537	3	42	4	66.6
DNAc de cerebro humano	D45299/HUMHG2802	1	345	12	75
*DNA de la región de inserción IS801 de <i>P. syringae</i>	Y09452/PSY09452	5	398	9	88.8
Secuencia parcial de DNAc de <i>H. sapiens</i>	HSCOXDO91	6	66	4	66.6
*DNAc de la región 5' del gen-223F03 de aorta humana	D61916/HUM223F03B	2	74	8	100
*STS WI-31157 de humano	G22146	4	126	5	83.3
* yz88f07.r1 Región 5' de la clona 290149 de soares multiple esclerosis 2NbHMSP de <i>H. sapiens</i> .	N90357	6	132	11	54.5
*Región 3' de la clona 80559 de DNAc vcl3d08.sl de <i>H. sapiens</i>	TS9644	5	134	9	88.8
*Región 3' de la clona 253733 de DNAc yw30d03.r1 de <i>H. sapiens</i>	N75774	3	85	8	100
*Región 5' de la clona 115522 de DNAc yd90e06.r1 de <i>H. sapiens</i>	T88766	1	149	12	58.3
*Secuencia parcial (CO335-3A) de DNAc de arroz	D28184/RICC0335A	5	108	12	66.6
*Región 3' de la clona 632454 de DNAc zq43c04.sl de neuron hNT de <i>H. sapiens</i> (Stratagene)	emb/AA191664/AA191664	6	173	11	54.5
*Región 3' de la clona 208774 del DNAc yr50g12.sl de <i>H. sapiens</i>	H61035	4	119	11	63.6
*DNAc de piel de ratón de la clona ms13e03.r1 de Stratagene (# 937313)	emb/AA154993/AA154993	4	77	11	54.5
*Secuencia parcial (R1411-1A) del DNAc de arroz.	R14111	5	125	11	72.7

* Única información disponible ya que no existen referencias adicionales respecto a la descripción y función de la secuencia reportada.

Análisis de la secuencia que codifica para la proteína recombinante KETc 12

Tabla VIII. Análisis de identidad de la secuencia de aminoácidos codificada por la clona KETc12 de acuerdo al programa TFASTA utilizado la matriz PAM120.

Homología con la secuencia codificadora	No. de acceso	ORF	No. de aminoácidos de la proteína homóloga	No de aminoácidos superpuestos	Porcentaje de identidad
*DNAC de la clona 203068 de <i>H. sapiens</i>	H5432	3	135	7	87.5
Secuencia de la clona F0893 de <i>Brassica rapa</i>	BNAF0893E	6	113	7	87.5

* Unica información disponible ya que no existen referencias adicionales respecto a la descripción y función de la secuencia reportada.

XII. APENDICE III

Respuesta inmune y susceptibilidad a infecciones parasitarias

HIPOTESIS 1

HIPOTESIS 2

HIPOTESIS 3

SELECCION NATURAL

INDUCCION ANTIGENICA

ENMASCARAMIENTO ANTIGENICO

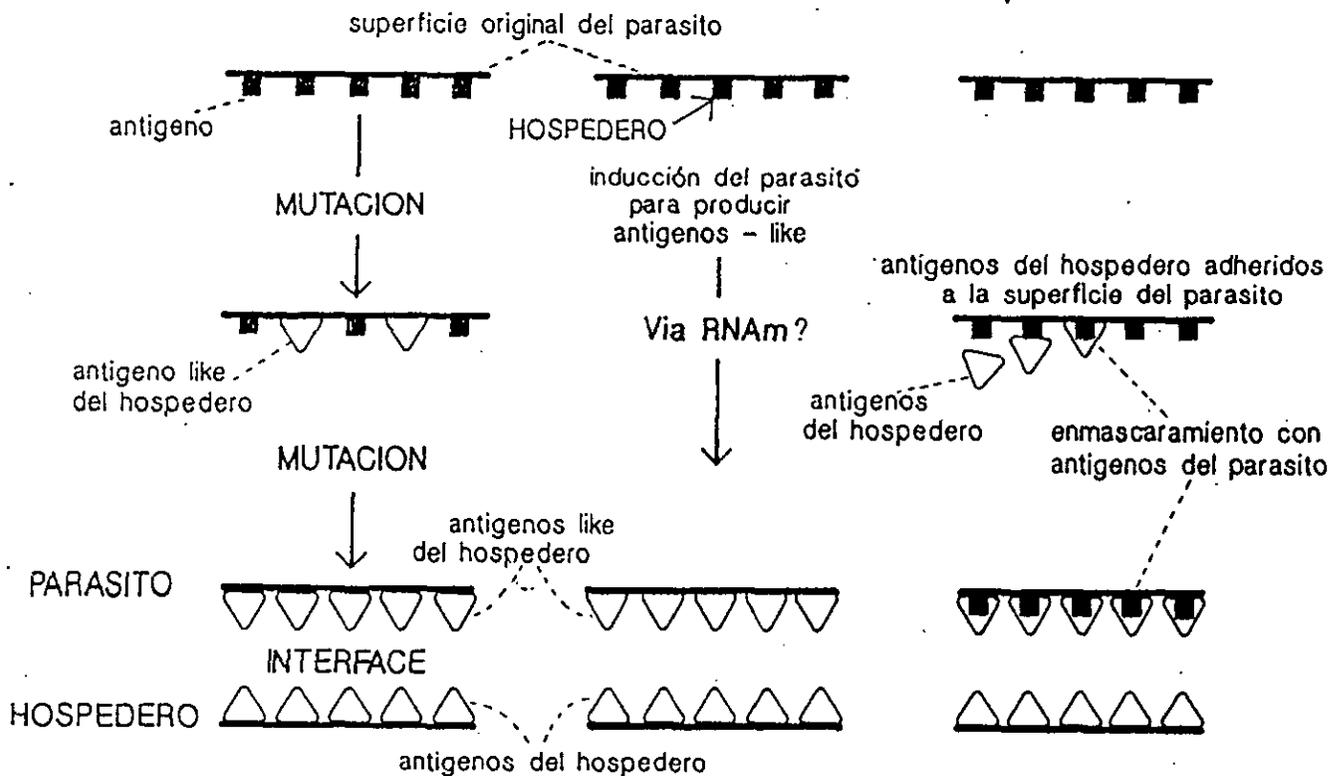


Figura 20. Comparación del mecanismo de 3 hipótesis propuestas, que indican la participación de las facultades del parásito para modular o modificar la respuesta del hospedero y/o alterar su propia estructura, e involucradas en el aumento de susceptibilidad a la parasitosis (Tomado de Fragoso, 1991a)

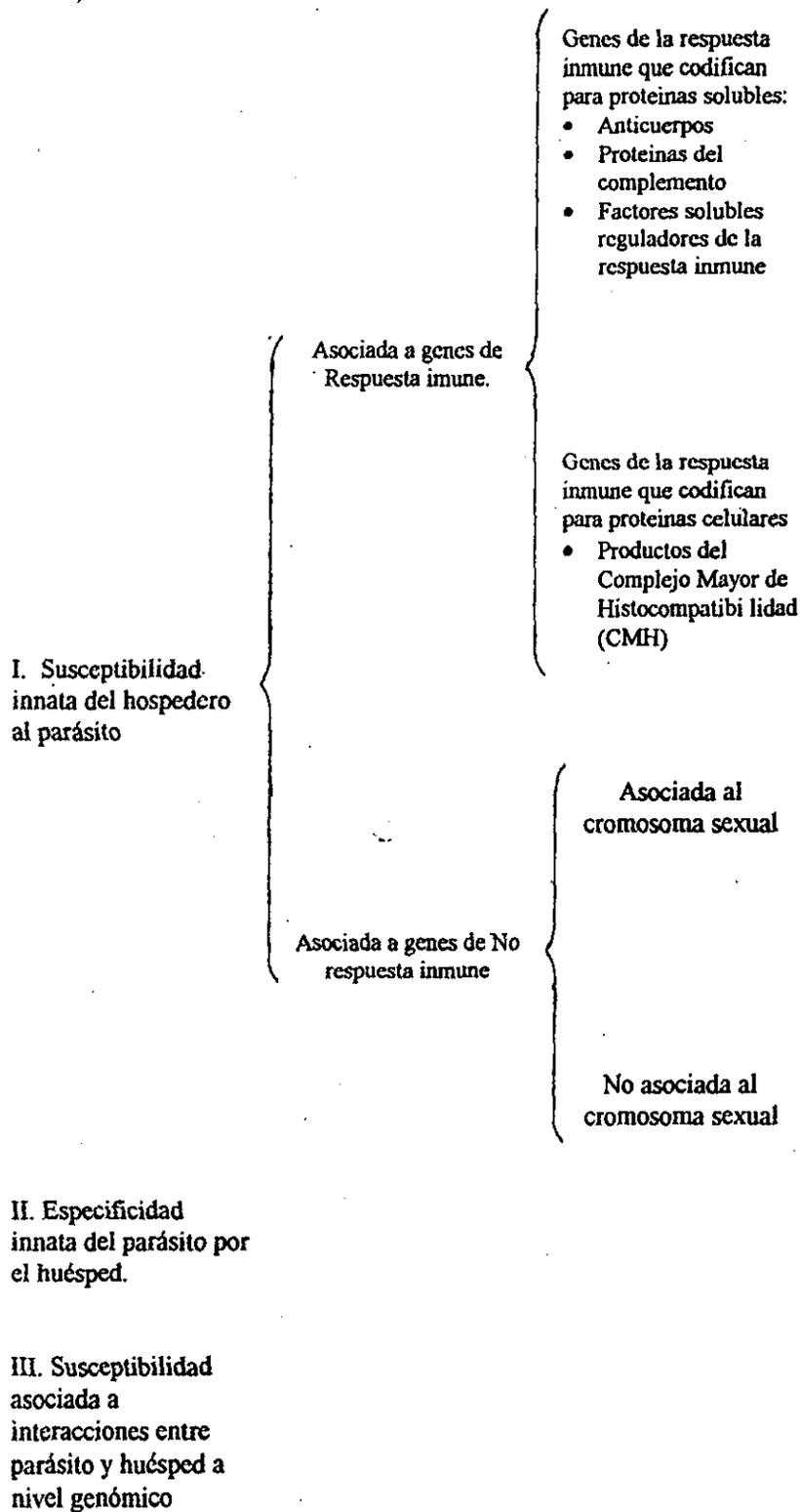
A continuación se hará una breve mención sobre la participación de algunos de los factores que han sido reportados y que influyen importantemente en el aumento de susceptibilidad a la cisticercosis u otra infección parasitaria.

El estudio de los mecanismos involucrados en la resistencia a las infecciones parasitarias se ha concentrado, principalmente, en la identificación de los componentes del hospedero y su modo de acción durante la inducción y regulación eficiente de una respuesta inmune protectora, así como aquellos componentes que emplea el propio parásito para su sobrevivencia y transmisión.

Entre los factores que influyen en la resistencia o susceptibilidad a una infección parasitaria se encuentran; las facultades del parásito para modular o modificar la respuesta del hospedero y/o alterar su propia estructura (Figura 20), factores del hospedero determinados genéticamente (Tabla IX) (Fragoso *et al.* 1991a, 1991b). Asimismo, el fondo genético del hospedero, la cepa del parásito, la participación de algunos componentes del sistema del complemento, el efecto de una doble infección, la influencia del sexo, el tipo de respuesta inmune y su mecanismo de regulación durante el proceso y/o desarrollo de la infección, y por último, la posible participación de mecanismos de evasión inmune. Es importante considerar que los factores anteriormente citados podrían estar participando independientemente o en conjunto a fin de permitir el establecimiento y mantenimiento del parásito dentro de un hospedero inmunológicamente competente.

En un principio, el aumento de susceptibilidad a una infección parasitaria puede deberse a la presencia de componentes compartidos entre el hospedero y el parásito. Estudios previos indican que diferentes helmintos presentan moléculas de reacción cruzada (Fragoso *et al.*, 1991a). Sin embargo, se desconoce si estas moléculas han sido adsorbidas a la superficie del parásito o son productos expresados por éste *per se*. Willms y col. (1977) han propuesto una hipótesis la cual sugiere que la adsorción de moléculas propias del hospedero enmascaran al parásito ante una respuesta inmune, facilitando su establecimiento y sobrevivencia. En el estudio de la cisticercosis ha sido reportada la participación de algunos de estos mecanismos como el enmascaramiento con antígenos del hospedero, modulación antigénica a nivel de membrana y su recubrimiento con tejido fibroso. Dichos mecanismos no son los únicos que inducen un aumento de susceptibilidad a la infección, sin embargo, son pocos los reportes que existen al respecto.

Tabla IX. Factores genéticos asociados a la susceptibilidad a infecciones parasitarias (Tomado de Fragoso, 1991b).



Determinismo genético, fondo genético y cepa del parásito.

El determinismo genético de las infecciones parasitaria ha sido estudiado considerando las diferencias genéticas entre los individuos de una misma especie. Este puede o no estar relacionado con genes asociados (genes que codifican para proteínas solubles y factores que intervienen en la respuesta inmune) o no (los demás genes que se encuentran o no relacionados al cromosoma "Y") a una respuesta inmune. En el hospedero, el fondo genético también es importante ya que ante una misma una misma infección una cepa puede resultar más susceptible que otra. En el parásito, la constitución genética es de gran relevancia ya que un mismo tipo de parásito puede variar en su constitución genética dependiendo de su localización geográfica, número de generación etc.... La importancia de estos factores pueden verse reflejados en la capacidad infectiva que presenten diferentes cepas del parásito ante una misma cepa de hospedero.

Componentes del sistema del complemento.

En el estudio de la susceptibilidad a la cisticercosis se ha observado que la presencia de productos de secreción son capaces de inhibir la coagulación sanguínea (Hammerberg *et al.*, 1977) y consumir inespecíficamente el complemento (Laclette *et al.*, 1989), ésta degradación posiblemente influye de manera crítica en el estado de inmunosupresión que se genera en el hospedero. Estudios morfológicos indican la presencia del componente C3b en la superficie de la oncosfera y el metacéstodo de *T. solium*. Sin embargo, el parásito no es susceptible de sufrir daño alguno (Correa *et al.*, 1985) manera el parásito tiene la capacidad de controlar y/o inhibir la activación eficiente del sistema del complemento y por consiguiente el establecimiento del parásito. En el modelo de cisticercosis causada por *Taenia taeniaeformis*, Davis y Hammerberg (1990) han demostrado que en estudios *in vitro* la molécula C3b es capaz de depositarse sobre la superficie de larvas oncosferales y postoncosferales provenientes tanto de la cepa resistentes como de la susceptible. *In vivo* solo la cepa resistente es capaz de producir C5a y destruir al parásito. En tanto, las oncosferas provenientes de la cepa susceptible no sufren daño alguno y conservan la capacidad de modular la activación del complemento (Davis y Hammerberg, 1990), que se manifiesta en la alteración de la respuesta inflamatoria mediada a través del efecto quimiotáctico que ejercen los componentes C3a y C5a sobre eosinófilos y neutrófilos (Goetzal y Austen, 1977). Si bien la inhibición o reducción del daño por complemento también puede deberse a la capacidad del parásito para secretar factores anticomplementarios, enzimas proteolíticas y su enmascaramiento con antígenos del hospedero.

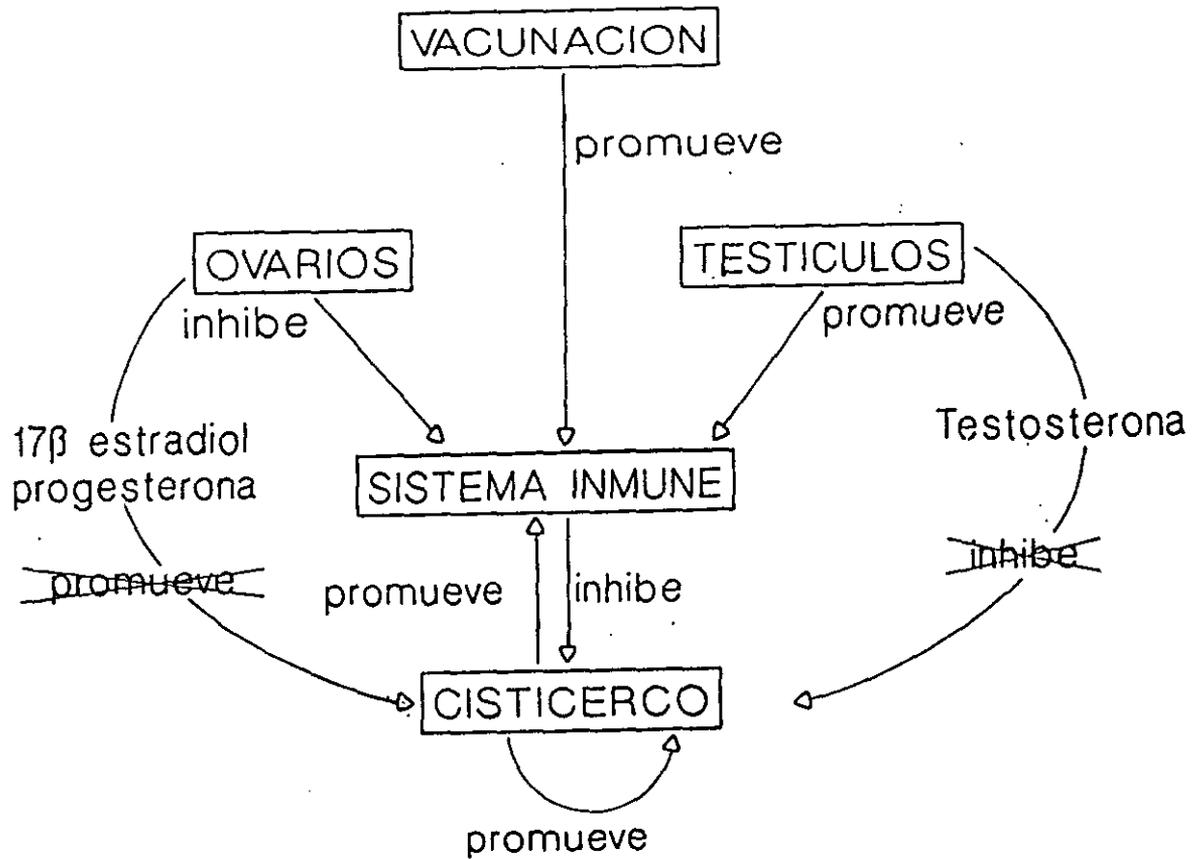


Figura 21. Modelo de la red inmunoendócrina en la inducción de la susceptibilidad a la cisticercosis experimental murina por *Taenia crassiceps* (Tomado de Huerta et al., 1992)

Efecto de una doble infección.

El aumento de susceptibilidad a las enfermedades parasitarias también puede estar dado a través de un efecto acumulativo donde un mismo hospedero es sometido a una doble infección. Este fenómeno ha sido descrito en ratones infectados con *H. polygyrus* (Behnke et al., 1983) y re infectados con SBRC (eritrocitos de carnero), el efecto de la doble infección inducen una disminución en la respuesta intestinal que va acompañada con una baja infiltración de células cebadas a nivel de la lámina propia. Por otra parte, ratones infectados con *T. spiralis* y re infectados con el virus japonés de la encefalitis B presentan una mastocitosis con depresión en la infiltración de células cebadas (Lubiniecki y Cypess, 1974; Dehlawi et al., 1987). Otros de los sistemas en los cuales se ha reportado la influencia de una doble infección sobre la susceptibilidad a la parasitosis incluyen la infección de ratones con *Hemoligmosomoides polygyrus* (*Nematospiroides dubius*) y re infectado con eritrocitos de carnero (SRBC) (Shimps et al. 1975) y en el modelo de infección ratón- *Taenia crassiceps* sometido a una re infección con SRBC (Good y Miller, 1976). Los mecanismos involucrados en el aumento de susceptibilidad en cada sistema es específico de cada uno, por lo que no se dará ampliara la información al respecto.

Influencia del sexo.

La influencia del sexo entre individuos de una misma especie ha sido considerada como otra de las características que se a tratado de asociar a un aumento de susceptibilidad a la infección. Estudios previos indican que en los modelos de infección murina las hembras siempre son más resistentes que los machos, excepto en la infección por *T. crassiceps* y *Trichomonas vaginalis* (Fragoso et al., 1991b; Sciutto et al., 1991). Una posible explicación indica que la susceptibilidad podría estar determinada por el cromosoma "Y" o por la influencia hormonal de cada sexo. Estudios previos en la cisticercosis murina indican que las hembras son más susceptibles a la infección que los machos. De aquí que Huerta y col. (1992) han propuesto un modelo el cual indica que el progreso de la infección involucra la participación de una red neuroinmunoendócrina integrada por el eje hipófisis-timo-gónadas. En los machos, se sugiere que el nivel de andrógenos estimula el sistema inmune el cual es capaz de inhibir el crecimiento del parásito. Sin embargo, en las hembras el efecto de los estrógenos, 17 β -estradiol, inhibe la actividad del sistema inmune y por consiguiente permite que el parásito se establezca (Ver figura. 21) (Bojalil et al., 1993; Terrazas et al., 1994). El efecto de los andrógenos o estrógenos no actúan directamente sobre el crecimiento del parásito, ya que estudios *in vitro* indican que la adición de una otra hormona no afecta el crecimiento del parásito (Huerta et al., 1992). Sin embargo, el efecto de la testosterona parece ser mediado inmunológicamente ya que ratones machos sometidos

a una supresión en el nivel testosterona y un incremento en los niveles de estrógenos induce un aumento de susceptibilidad a la infección. Por otra parte, la participación inmunológica del timo indica que la timentomía neonatal es capaz de igualar el grado de infección en ambos sexos (Larralde *et al.*, 1995).

Respuesta inmune y su regulación en el aumento de susceptibilidad a una infección parasitaria.

La descripción y análisis de los componentes celulares involucrados en el establecimiento de una infección resultan de gran relevancia tanto en el conocimiento de la respuesta inmune inducida como en la identificación de los sucesos biológicos que se establecen en la interacción hospedero-parásito. Aunque existen diversos reportes sobre el tipo de respuesta inmune estimulada y algunos aspectos que involucran la regulación de ésta, aún se desconocen los mecanismos por los cuales se suceden la mayoría de estos cambios.

En el estudio de las enfermedades parasitarias han sido diversos los mecanismos identificados y a través de los cuales diferentes parásitos son capaces de inmunosuprimir a su hospedero. La actividad inmunomodulatoria local asociada a la parasitosis ha sido propuesta como una de las estrategias que emplean ciertos parásitos para su sobrevivencia.

La supresión de la respuesta inmune no es un reflejo de la incapacidad del hospedero para responder al parásito, ya que en la vacunación experimental con *T. solium* se observa claramente que tanto en humanos neurocisticercosos como en cerdos vacunados con extracto de cisticercos es posible estimular una respuesta inflamatoria capaz de destruir al parásito (Molinari *et al.*, 1983). Sin embargo, al parecer el parásito establece un mecanismo que inhibe el desarrollo de una respuesta inmune granulomatosa efectiva.

En el modelo murino de la enfermedad de Chagas se ha reportado que la inmunosupresión se manifiesta en una reducción en la producción de anticuerpos, interleucina 2, reacción de hipersensibilidad retardada y linfoproliferación de células de bazo a mitógenos o antígenos del parásito. Estos efectos han sido atribuidos a un aumento en la influencia de la actividad supresora de células T o macrófagos sobre el nivel de células T ayudadoras y secreción de IL-2. Estudios *in vitro* indican que *T. cruzi* además de suprimir la producción IL-2, reduce la expresión de receptores para IL-2 (RIL-2) y receptores para transferrina (TfR), siendo estos últimos necesarios para la proliferación de linfocitos y células mononuclear (Beltz *et al.*, 1989). Dichos eventos también han sido identificados en infecciones temprana *in vivo*, que el cultivo de células esplénicas provenientes de ratones infectados son capaces de proliferar en respuesta a la adición

de algún mitógeno exógeno, inclusive IL-2. lo que sugiere que durante la infección, la expresión de los receptores para IL-2 no se encuentran alterados (Klaus y Hawrylowicz, 1984). Sin embargo, los estudios en el hombre indican que el parásito inhibe la expresión de RIL-2 sin afectar la producción de ésta (Tarleton y Kuhn, 1984). Asimismo, estudios *in vitro* sugieren que células de humanos y ratones normales e infectados, previamente estimulados con algún mitógeno (concanavalina A, anticuerpos específicos, lectina etc..) y puestos en contacto con *T. cruzi* (Beltz et al., 1987, Szein et al., 1990) y *Trypanosoma brucei rhodesiense*, afectan la capacidad de proliferación de los linfocitos, a través de la inhibición de la producción de IL-2 y expresión de receptores RIL-2. Sin embargo, células de ratones infectados y estimulados con antígenos del parásito son capaces de proliferar y producir niveles normales de dicha interleucina. El análisis cinético del efecto inmunosupresor indica que éste se presenta como un efecto temprano en la infección y que la recuperación de las células T en su actividad proliferativa se da aproximadamente 6 horas después de su estimulación. Es importante considerar que son múltiples los eventos que pueden estar ocurriendo y/o afectando la respuesta inmune tal que se induzcan cambios críticos intra y/o extracelularmente (alteración en el transporte de calcio, reciclamiento de fosfatidil inositol, potencial de membrana, transcripción del gene para IL-2, traducción o estabilidad del RNAm del receptor para IL-2, reciclamiento de receptores de membrana, y/o aumento en el intercambio del RIL-2) (Kierszenbaum et al., 1991).

En la cisticercosis murina causada por *T. crassiceps* se sugiere que el efecto de la infección induce una depresión inmunológica con un alto nivel de linfocitos T supresores y macrófagos y proliferación de linfocitos activados en respuesta a algún mitógeno o antígenos del parásito, asimismo una supresión en la capacidad para inducir la producción de anticuerpos, una disminución en la producción de IL₂ (Sciutto et al., 1995) y expresión de receptores celulares y un alto nivel de IL-4 (Villa y Kuhn, 1996). La descripción y análisis de los componentes celulares involucrados en el establecimiento de una infección de tipo crónico, resultan de gran relevancia en el conocimiento de la respuesta inmune inducida. Sin embargo, aún se desconocen los mecanismos por los cuales se suceden la mayoría de estos cambios

En la infección por *T. cruzi*, estudios enfocados a la identificación de los mecanismos involucrados en la supresión de la producción de IL-2 y su importancia en el transcurso de la infección, sugieren que la supresión no es debido a la pérdida de células productoras de IL-2, sino a la alteración del estado de maduración de éstas, observándose que las células T supresoras Ly-2+ y L3T4- son las responsables de esta supresión. Dicho efecto fue revertido por la adición de prostaglandinas (PG) lo cual sugiere que posiblemente los macrófagos al ser estimulados, por los antígenos del parásito, liberan prostaglandinas con capacidad para activar a las células T supresoras e inducir, indirectamente, un fenómeno de inmunosupresión similar al que se presenta durante la infección (Tarleton et al., 1988).

Avances en el estudio de la respuesta inmune celular asociada a las enfermedades parasitarias sugieren que la participación de las células T en la resistencia o susceptibilidad a una parasitosis presenta un patrón en el cual la respuesta a la infección por parásitos intracelulares se ha asociado a una respuesta tipo Th1 (caracterizada por la secreción de linfocinas IL-2, INF- γ) y la de parásitos extracelulares a una respuesta Th 2 (IL-4 e IL-5). Sin embargo, habremos de considerar que en cada tipo de parasitosis podría presentarse un patrón de respuesta Th 1, Th 2 ó Tho dependiendo del tiempo de infección y del tipo de parásito. La situación se complica si consideramos la capacidad del parásito para inmunomodular la respuesta del hospedero a través de la activación de una u otra subpoblación celular.

La asociación de la resistencia a un tipo de respuesta de tipo Th1 o Th2 se observa en la infección por *Leishmania major* en la cual la resistencia esta dada por la activación de la subpoblación Th1 y la susceptibilidad por la Th 2. Al parecer, en este caso, la destrucción del parásito esta mediada por la producción de IFN- γ y la activación de macrófagos (Boom et al. 1990, Scott et al. 1989).

En la infección por parásitos extracelulares como *Schistosoma mansoni* la susceptibilidad o resistencia no están asociados a un tipo de respuesta en particular ya que durante el desarrollo de la infección se ha detectado una interacción Th1/ Th2. En este caso la resistencia a la infección esta asociada a una respuesta Th1. Sin embargo, la respuesta Th 2 es responsable de la reacción granulomatosa elimina al parásito (Scott et al. 1989).

Durante la infección causada por *T. crassiceps* la detección de altos niveles de inmunoglobulinas, principalmente IgG1 e IgE, y de IL-6 tanto en suero como en esplenocitos de ratones infectados establecen la estimulación de una respuesta Th2. Asimismo, en infecciones causadas por otros céstodos se sugiere que la IL-6 actúa directamente sobre la producción de IgG1 e IgE, importante en el proceso de destrucción del cisticerco, la estimulación de una respuesta granulomatosa inflamatoria y producción de IgG2a, ésta última asociados a la producción de interferón gamma característico de una respuesta Th1 (White et al., 1997). Recientemente Terrazas y col. (1998) sugieren que en la cisticercosis murina durante el proceso de infección se desencadena un mecanismo activa progresivamente una respuesta Th1 a Th2. Donde el predominio de la segunda permite el desarrollo de una infección de tipo crónico (Terrazas et al., 1998) a través de la producción de citocinas supresoras de la respuesta Th1. Importantemente se ha observado que a las 4 semanas de infección predomina una respuesta Th1 que favorece la destrucción del parásito. Sin embargo, cuando la respuesta Th1 disminuye y se estimula la Th 2 se permite el establecimiento y desarrollo de una infección de tipo crónico.

La asociación de una respuesta Th1/Th2 a proceso de infección ha sido considerada en el estudio de otras parasitosis como es la infección causada por *L. major* y *S. mansoni*, en ambos la respuesta Th1 a sido asociada a la resistencia y la Th2 a la susceptibilidad. Sin embargo, en la infección por *T. spiralis*, similar al modelo murino, el patrón de respuesta es revertido (Terrazas et al., 1998).

Mecanismo de evasión inmune o mimetismo molecular.

En la interacción hospedero- parásito la sobrevivencia de éste último es importante en el mantenimiento de la continuidad de su ciclo de vida. El estudio de los mecanismos involucrados en la susceptibilidad a las infecciones parasitarias se encuentra la participación de mecanismos de evasión inmune que son generados por el propio parásito a fin de controlar la respuesta del hospedero y permanecer dentro de éste. Así, en la infección por *Taenia taeniaeformis* la cepa BALB/ c es resistente a la infección y es capaz de expulsar al parásito a los 6 días post-infección (Letonja et al., 1984). En este caso el rechazo parece estar mediado por un mecanismo celular que no esta presente en la cepa susceptible, donde el parásito es capaz de invadir el tejido del hospedero sin que éste presente señales de rechazo. Una posiblemente explicación es que el parásito induzca un mecanismo de evasión inmune capaz de controlar la respuesta del hospedero (Damian, R. 1964). En este sentido Oldestone y col. (1989) han postulado un mecanismo de mimetismo molecular que involucra la presencia de estructuras similares entre moléculas producidas por diferentes genes del parásito y el hospedero. Este hecho se ve reflejado en la detección de reacción cruzada que se presenta principalmente, entre moléculas altamente conservadas, tal que las moléculas del parásito con mayor homología a las del hospedero, son capaces de mimetizar la respuesta en contra de éste último (Bloom, 1979). Sin embargo, se han planteado otras hipótesis alternativas, postuladas por Capron (1989) y Smithers (1969), quienes sugieren que el parásito *per se* es capaz de adquirir o sintetizar antígenos parecidos al hospedero, respectivamente. Sin embargo, no son los únicos mecanismos propuesto ya que Damian ha quién postulado que el parásito es capaz de inducir la síntesis de antígenos "homólogos" que mimetizan la respuesta del hospedero (Fragoso, 1991a) (Fig. 20).

Estudios de divergencia molecular, sugieren la presencia de una alta homología, entre proteínas de reconocimiento (inmunoglobulinas, receptores para células T, antígenos del MHC) del hospedero con proteínas de virus, bacterias o parásitos, capaces de influir en la susceptibilidad de éste. El análisis del grado de divergencia determinado entre un grupo de ligandos y 75 moléculas receptoras del hospedero (interleucinas, interferón, factores estimulantes, quimioatrayentes, quimocinas, factor de necrosis tumoral y sus receptores, así como receptores para el fragmento Fc y diversas moléculas CD del sistema inmune) indican que estos presentan un grado de divergencia del $35\% \pm 1\%$. Es importante considerar que todas estas moléculas son de localización extracelular o membranal y participan en la

transducción de señales que involucran el desarrollo y/o activación de linfocitos y células fagocíticas que median la respuesta inflamatoria y de defensa del hospedero contra diversas infecciones (Lechler et al., 1992). Un ejemplo de este tipo de asociación esta dada por la alta homología que se presenta entre la proteína SCIP- 1, localizada en la superficie de *Schistosoma mansoni*, y CD59 de humano (Parizade et al., 1994).

Los avances en el estudio de las enfermedades parasitarias indica que en muchos casos, el patrón de eventos varia de acuerdo a la especie del parásito, a la cepa del hospedero y al progreso de la infección. Se considera que ningún tipo de parásito es capaz de estimular un tipo de respuesta inmune aislada; en todos los casos reportados se observa la participación conjunta de varios de los elementos de la respuesta inmune, por ejemplo la estimulación de una respuesta inmune citotóxica mediada por células y dependiente de anticuerpos la cual involucra la participación de células activadas, productoras de anticuerpos, del factor de necrosis tumoral y del interferón gamma, aún cuando estos dos últimos actúan sinérgicamente

En la evaluación de susceptibilidad y resistencia a diferentes infecciones, la presencia del parásito es capaz de estimular una respuesta de tipo humoral y/o celular, que puede conferir diferentes niveles de protección dependiendo del tipo de relación hospedero - parásito que se establezca. La identificación de éste tipo de relación es de gran importancia para dilucidar los mecanismos involucrados en dicha interacción en la esperanza de poder modificar el destino de la parasitosis.

Hasta el momento, las investigaciones realizadas en el estudio de la inmunosupresión asociada a la cisticercosis indica que el proceso de infección genera una disminución en la efectividad de la respuesta inmune en contra del parásito y trae como consecuencia un aumento en la susceptibilidad a la infección tanto en pacientes como en animales experimentales ante una respuesta secundaria. De aquí que nuestro grupo de trabajo se ha interesado en el desarrollo de un sistema de cisticercosis murina *in vitro* que permita explorar los mecanismos inmunológicos capaces de controlar la parasitosis, así como la identificación de proteínas que participen de manera importante en la resistencia y/o supresión de la respuesta inmune del hospedero. En este sentido, la librería de ADNc del cisticercos de *T. crassiceps* posteriormente será utilizada para continuar identificando proteínas del parásito que resulten de interés en el estudio y evaluación de la relación hospedero - parásito

XIII. BIBLIOGRAFIA.

- Aluja, A.S., Escobar, A., Escobedo, F., Flisser, A., Laclette, J.P., Larralde, C., Madrazo, I., Velázquez, V. y Willms, K. (1987). Cisticercosis: Fondo de Cultura Económica. México, D. F. pág: 38-43.
- Beltz, L.A. y Kierszenbaum, F. (1987). Suppression of human lymphocyte response by *Trypanosoma cruzi*. Immunol. 60: 309-315
- Beltz, L.A., Kierszenbaum, F. y Szein, M.B. (1989). Selective suppressive effects of *Trypanosoma cruzi* on activated human lymphocytes. Infect. Immunol. 57: 2301-2305.
- Behnke, J. M. Hannah, J. y Pritchard, D.I. (1983). *Nematospiroides dubius* in the mouse: evidence that adult worms depress the expression of homologous immunity. Parasit. Immunol. 5: 397-408.
- Bianchi, E., del Giudice, G., Verdini, A.S. y Pessi, A. (1991). Synthetic peptides for *Plasmodium vivax* malaria sero-epidemiology. Application of Fmoc-polyamide y displacement chromatography. Int. J. Pept. Protein. Res. 37: 7-13.
- Birnboim, H. y Doly, C. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acid Res. 7: 1513.
- Bloom, B. R. (1979). Games parasites play. Nature. 279:21-26
- Bobek, A. L., Lo Verde, T. P. y Rekosh, M. D. (1989). *Schistosoma haematobium*: Analysis of eggshell protein genes and their expression. Exp. Parasitol. 68:17-30.
- Bobek, A. L., Rekosh, M. D. y Lo Verde, T. P. (1991). *Schistosoma japonicum*:: Analysis of eggshell protein genes, their expression and comparison with similar genes from other schistosomes. Exp. Parasitol. 72:381-390.
- Bojalil, R., Terrazas, L.I., Govezensky, T., Sciutto, E. y Larralde, C (1993). Thymus- related cellular immune mechanism in sex-associated resistance to experimental murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). J. Parasitol. 79: 384-389
- Boom, W.H., Liebster, L., Abbas, A.K. y Titus, R.G. (1990). Patterns of cytokine secretion in murine leishmaniasis: correlation with disease progression or resolution. Infect. Immun. 58: 3863-3870.

- Brady, J. D., Sadler, I. H. y Fry, S. C. (1996). Di- isodityrosine a novel tetrameric derivative of tyrosine in plant cell wall proteins: a new potential cross-link. Biochem. J. 315: 323-327.
- Campbell, D. H. (1936). Active immunization of albino rats with protein fractions from *Taenia taeniaeformis* and its larval for *Cysticercus fasciolaris*. Am. J. Hyg. 23:
- Capron, A. y Dessaint, J. P. Molecular basis of host-parasite relationship towards the definition of protective antigens. (1989). Immunol. Rev. 112: 27-48.
- Chamekh, M., Gras-Masse, H., Bossus, M., Facon, B., Dissous, C., Tartar, A. y Capron, A. (1992). Diagnostic value of a synthetic peptide derived from *Echinococcus granulosus* recombinant protein. J. Clin. Invest. 89:458-464.
- Coligan, J. E., Kruisbeek, M. A., Margulies, H. D., Shevach, M. E. y Strober, W. Current protocols in immunology. 1992. National Institutes of Health. Vol. 2.
- Correa, D., Dalma, D., Espinoza, B., Plancarte, A., Rabiela, T., Madrazo, I., Gorodezky, C., Flisser, A. (1985). Heterogeneity of humoral immune components in human cysticercosis. J. Parasitol. 71: 535-541.
- Damian, R. T. (1964). Molecular mimicry: antigen sharing by parasite and host and its consequences. Am. Naturalist. 98: 129
- Davis, S. W. y Hamnerberg, B. (1990). *Taenia taeniaeformis*: Evasion of complement-mediated lysis by early larval stages following activation of the alternative pathway. Int. J. Parasitol. 18: 591-597.
- Dehlawi, M.S., Wakelin, D., Behnke, J.M. (1987). Suppression of mucosal mastocytosis by infection with intestinal nematode *Nematospiroides dubius*. Parasite Immunol. 9: 187-194
- Dixon H.B.F y Lipscom, F. M. (1961). Cysticercosis: A analysis and follow up of 450 cases. Priv. Council Med. Res. Special Rep. Serial No. 229 (Londres) pág.58
- Fernandez, V., Ferreira, H. B., Fernyez, C., Zaha, A. y Nieto, A. (1996). Molecular characterization of a novel 8-kDa subunit of *Echinococcus granulosus* antigen B. Mol. Biochem. Parasitol. 77: 247-250.
- Ferreira, H.B. y Zaha, A. (1994). Expression and analysis of the diagnostic value of an *Echinococcus granulosus* antigen gene clone. Int. J. Parasitol. 24: 863-870.

- Fisher, C., Nosratian, R., Habtemichael, N., Tolle, R., Riemenschneider, V. y Geyer, E. (1994). Preparation and sequence analysis of *Taenia crassiceps* metacestode recombinant antigens with potential for specific immunodiagnosis of human cerebral cysticercosis. Trop. Med. Parasitol. 45: 324-328.
- Flisser, A., Pérez Montfort, R. y Larralde, C. (1979). "The immunology of human y animal cysticercosis: a review". Bull. W. H. O. 57: 839-856.
- Flisser, A., Woodhouse, E. y Larralde, C. (1980). Human cysticercosis: antigens, antibodies y nonresponders. Clin. Exp. Immunol. 39:27-37.
- Flisser, A., Malagón, F. Cisticercosis humana y porcina. 1989. Ed. Limusa México., D. F.
- Fragoso, G. (1991a). Estudio de la susceptibilidad a la cisticercosis experimental murina por *Taenia crassiceps*. Tesis de Maestría en Ciencias Químicas (Bioquímica). Facultad de Química. U.N.A.M.
- Fragoso, G., Sciutto, E., Estrada, I. y Larralde, C. (1991b). Susceptibilidad genética a infecciones parasitarias en *Mus musculus*. Rev. Lat. Amer. Microbiol. 33: 171-180.
- Freeman, R. S. (1962). Studies of the biology of *Taenia crassiceps* (Zeder, 1800) Rudolphi, 1810 (Céstoda). Cann. J. Zool. 40: 969-990.
- Frosh, P., Hartmann, M., Muhlschlegel, F. y Frosh, M. (1994). Sequence heterogeneity of the echinococcal antigen B. Mol. Biochem. Parasitol. 64:171-175-
- Gevorkian, G., Manoutcharian K., Larralde, C., Hernandez, M., Almagro, J.C., Viveros, M., Sotelo, J., Garcia, E. y Sciutto, E. (1996). Immunodominant synthetic peptides of *Taenia crassiceps* in murine and human cysticercosis. Immunol. Lett. 49: 185-189.
- Geysen, H.M., Tainer, J.A., Rodda, S.J., Mason, T.J., Alexyer, H., Getzoff, E.D. y Lerner, R.A. (1987). Chemistry of antibody binding to a protein. Science 235: 1184-1190.
- Giudice Del, G., Douglas, A., Verhave, J. P., Wirtz, R. A. y Zavala, F. (1989). Comparative analysis of ELISA employing repetitive peptides to detect antibodies to *Plasmodium falciparum* sporozites. Bull. W.H.O. 67: 515-523.
- Godard, I., Estaquier, J., Zenner, L., Bossus, M., Auriault, C., Darcy, F., Grass-Masse, H. y Capron, A. (1994). Antigenicity and immunogenicity of P-30 derived peptides in experimental models of toxoplasmosis. Mol. Immunol. 31: 1353-1363.

- Goetzel, E. y Austen, K.F.A. (1977). Cellular characteristics of the eosinophil compatible dual role in host defense in parasitic infections. Am. J. Trop. Hyg. 26: 142-150 (suppl).
- Goldman de S, M. E., Pezzotti, M., Seurinck, J. y Mariani, C. (1992) Developmental expression of tobacco pistil-specific genes encoding novel extensin -like proteins. Plant Cell. 4: 1041-1051.
- Good, A. H. y Miller, K. L. (1976). Depression of the immune response to sheep erythrocytes in mice infected with *Taenia crassiceps* larvae. Infec. Immunol. 14: 449-456.
- Hammerberg, B., Musoke, A.J., Williams, J.F. (1977). Activation of complement by hydatid cyst fluid of *Echinococcus granulosus*. J. Parasitol. 63: 327-331.
- Hemmings, L., McManus, D.P. (1989). The isolation, by differential antibody screening, of *Echinococcus multilocularis* antigen gene clones with potential for immunodiagnosis. Mol. Biochem. Parasitol. 33: 171-182.
- Henkle, J. K., Cook, A. G., Foster, A. I., Engman, M. D., Bobek, A. L., Cain, D. G y Donelson, E. J. (1990). The gene family encoding eggshell proteins of *Schistosoma japonicum*. Mol. Biochem. Parasitol. 42: 69-82.
- Hong, J. C., Cheong, Y. H., Nagao, R. T., Bank, J. D., Cho, M. J. y Key, J. L. (1994). Isolation and characterization of three soybean extensin cDNAs. Plant Physiol. 104: 793-796.
- Huerta, L., Terrazas, L.I., Sciutto, E. y Larralde, C. (1992). Immunological mediation of gonadal effects on experimental murine cysticercosis caused by *Taenia crassiceps* metacestodes. J. Parasitol. 78: 471-476.
- Inclán, M. Ma. C. (1981) Comparación de la técnica de inspección sanitaria e inmunoelectroforesis en el diagnóstico de la cisticercosis porcina. Tesis de Licenciatura. FMVZ, UNAM. México, D.F.
- Ishida, C., Matsumoto, K., Fukada, K., Matsushita, K., Shiraki, H. y Maeda, Y. (1993). Detection of antibodies to hepatitis C virus (HCV) structural proteins in anti-HCV- positive sera by an enzyme-linked immunosorbent assay using synthetic peptides as antigens. J. Clin. Microbiol. 31:936-940.
- Ito, A.H., Bogh, O., Lightowers, G., Mitchell, G., Takami, T., Kamila, M., Onitake, K. y Rickard D. (1979). Vaccination gainst *Taenia taeniaeformis* in rats using a recombinant protein and preliminary analysis of induced antibody response. Mol. Biochem. Parasitol. 44: 43-52
- Ito, A., Tsuyoshi, T. y Makamoto, Y. (1991). Vaccine effect of intact metacestodes of *Taenia crassiceps* against *T. taeniaeformis* infection in rats. Am. J. Trop. Med. Hyg. 44: 696-670.

- Jameson, B. A. y Wolf, H. (1988). The antigenic index: A novel algorithm for predicting antigenic determinants. Comp. Appl. Biosci. 4:181-186
- John, M. E. y Keller, G. (1995). Characterization of mRNA for a prolin rich protein of cotton fiber. Plant Physiol. 108: 669-676
- Johnson, K.S., Harrinson, G.B.L., Lightowlers, M.W., O'Hoy, K.L., Cogle, W.G., Dempster, R.P., Lawrence, S.B., Vinton, J.G., Heath, D.O. y Rickard M. (1989). Vaccination against ovine cysticercosis using a defined recombinant antigen. Nature 338: 585-587.
- Keller, B. Sauer, N. y Lamb, C. J. (1988). Glycine- rich cell wall proteins in bean: Gene structure and association of the protein with the vascular system. EMBO. J. 7: 3625-3633.
- Keller, B. y Lamb, C. J. (1989). Specific expression of a novel cell wall hydroxiprolin-rich glycoprotein gene in lateral root initiation. Genes. Dev. 3: 1639-1646.
- Kieliszawsky, M. J. y Lamport, D. J. (1994). Extensin: repetitive motifs, functional sites, post-translational codes and phylogeny. Plant. J. 5: 157-172.
- Kierszenbaum, F., Muthukumar, S., Beltz, L.A. y Szein, M.B. (1991). Supression by *Trypanosoma brucei rhodesiense* of the capacities of human T lymphocytes to express interleukin-2 receptors and proliferate after mitogenic stimulation. Infect. Immunol. 59:3518-3522.
- Klaus, G. C. y Hawrylowicz (1984). Cell- cycle control in lymphocyte stimulation. Immunol. Today 5: 15-19.
- Knox, J. (1995). Developmentally regulated proteoglycans and glycoproteins of the plant cell surface. FASEB. J. 9: 1004-1012.
- Köster, B., Dargatz, H., Schröder, J., Hirzmann, J., Haarmann, C., Symmons, P. y Kunz, W. (1988). Identification and localization of the products of a putative eggshell precursor gene in the vitellarium of the *Schistosoma mansoni*. Mol. Biochem. Parasitol. 31:183-198
- Kumar, D. Gaur, S. N. S. y Pathak, K. M. L. (1987). Immunization of pigs against cysticercosis of *Taenia solium* using fractionated 1st. Y 2nd peak of *Cysticercus cellulosae* scolex antigens. Indian. J. Anim. Sci. 57:932-935.
- Laclette, J.P., Rodriguez, M., Lya, A., Arcos, L., de Alba, P., Mancilla, R., y Willms, K. (1989). The coexistence of *Taenia solium* cysticerci y the pig: role of the antigen B. Acta. Leiden. 57: 115-122.

- Larralde, C. Laclette, J. P., Owen, Ch. S., Madrazo, I., Syoval, M., Bojalil, R., Sciutto, E., Contreras, L., Arzate, J., Diaz, M.L., Govezensky, T., Montoya, R.M. y Goodsaid, F. (1986). Reliable serology of *T. solium* cysticercosis with antigens from cyst vesicular fluid: ELISA and hemagglutination test. Am. J. Trop. Med. Hyg. 35: 965-73
- Larralde, C., Montoya, R.M., Sciutto, E., Diaz, M.L., Govezensky, T., y Coltorti, E. (1989). Deciphering Western Blots of tapeworm antigens (*T. solium*, *E. granulosus* y *T. crassiceps*) reacting with sera from neurocysticercosis and hidatidic disease patients. Am. J. Trop. Med. Hyg. 40: 282-290.
- Larralde, C., Padilla, A., Hernandez, M., Govezensky, T., Sciutto, E., Gutierrez, G., Tapia-Conyer, R., Salvatierra, B., y Sepúlveda, J. (1992). Seroepidemiología de la cisticercosis en México. Salud Pública de México 34: 197-210.
- Larralde, C., Morales, J., Terrazas, I., Govezensky, T. y Romano, M.C. (1995). Sex hormone changes induced by the parasite lead to feminization of the male host in murine *Taenia crassiceps* cysticercosis. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 52: 575-580.
- Lechler, R.I., Heaton, T., Barber, L., Bal, V., Batchelor, J.R. y Lombardi, G. (1992). Molecular mimicry by major histocompatibility complex molecules and peptides accounts for some alloresponses. Immunol. Lett. 34:63-69.
- Letonja, T., Rikihisa, Y. y Hämmernerg, C. (1984). Differential cellular response in resistant and susceptible rodents to the early stages of infection on *Taenia taeniaeformis*. Int. J. Parasitol. 14: 551-558.
- Lim, O. C., Kim, Y. H., Kim, G. M., Lee, I. S., Chung, S. W., Park, H.S., Hwang, I. y Cho, J. M. (1996). Expressed sequence Tags of chinese cabbage flower bud cDNA. Plant. Physiol. 111:577-588.
- Lipman, D. J. y Pearson, W. R. (1985). Rapid and sensitive protein similarity searches. Science. 227: 1435-1441.
- Lombardi, V.R., Libonatti, O., Alimyi, M., Ansotegui, Y., Scarlatti, G., Moschese, V., Wigzell, H. y Rossi, P. (1992). Detection of antibodies to human immunodeficiency virus type 1 by using synthetic peptides and time-resolved fluoroimmunoassay. Eur. J. Epidemiol. 8: 298-304.
- Lubiniecki, A.S. y Cypess, R.H. (1974). Immunological sequelae of *Trichinella spiralis* infection in mice: Effect on the antibody response to sheep erythrocytes y Japanese B encephalitis virus. Infect. Immun. 11:1306-1311.

- Mahajan, R. C. Geographical distribution of human cysticercosis. In *Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives*. Flisser, A. Willms, K., Lacleste, J.P., Larralde, C., Ridaura, C. y Beltrán, F. 1982 (eds.) Academic Press, New York, pág. 675.
- Manniatis. T., Sambrook. J. y Fritsch, E. F. *Molecular cloning. A laboratory manual*. 1989. Cold Spring Harbord.
- Manoutcharian, K., Rosas, G., Hernandez, M., Fragoso, G., Aluja, A., Villalobos, N., Rodarte, L.F. y Sciutto E. (1996). Cysticercosis: Identification and cloning of protective recombinant antigens. J. Parasitol. 82: 250-254.
- McNeil, M., Darwill, G. A., Fry, C. S. y Albersheim, P. (1984). Structure and function of the primary cell walls of plants. Ann. Rev. Biochem. 53:625-663.
- Molinari, J. I., Meza, R., Suarez, P., Palacios, S., Tato, P. y Retana, A.(1983). *Taenia solium*: Immunity in hogs to the cysticercus. Exp. Parasitol. 55: 340-357.
- Molinari, J.L., Soto, P., Tato, P., Rodriguez, D., Retana, A., Sepúlveda, J. y Palet, A. (1993). Immunization against porcine cysticercosis in an endemic area in Mexico. A field y laboratory study. Am. J. Trop. Med. Hyg. 49: 502-512.
- Molinari, J.L., Rodríguez, D., Tato, P., Soto, R., Arechavaleta, F. y Solano, S (1997). Field trial for reducing porcine *Taenia solium* cysticercosis in Mexico by systematic vaccination of pigs. Vet. Parasitol. 69: 55-63
- Muller, N., Gottstein, B., Vogel, M., Flury, K. y Seebeck, T. (1989). Application of a recombinant *Echinococcus multilocularis* antigen in an enzyme-linked immunosorbent assay for immunodiagnosis of human alveolar echinococcosis. Mol. Biochem. Parasitol. 36: 151-159.
- Nascimento, E., Costa, J. O., Guimaraes, M.P. y Tavares, C.A. (1995). Effective immune protection of pigs against cysticercosis. Vet. Immunol. Immunopathol. 45: 127-137
- Oldestone, M. B. A. (1989). Molecular mimicry as a mechanism for the cause and as a probe uncovering etiologic agent (s) of autoimmune disease. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 145:128-135.
- Parizade, M., Arnon, R., Lachmann, P.J. y Fishelson, Z. (1994). Functional and antigenic similarities between a 94-kD protein of *Schistosoma mansoni* (SCIP-1) and human CD59. J. Exp. Med. 179: 1625-1636.

- Pathak, K.M. y Gaur, S.N. (1990). Immunization of pigs with culture antigens of *Taenia solium*. Vet. Parasitol. 34: 353-356.
- Pearson, W. R. y Lipman, D. J. (1988). Improved tools for biological sequence comparison. Proc. Natl. Acad. USA. 85:2444- 2448.
- Peralta, J.M., Teixeira, M.G., Shreffler, W.G., Pereira, J.B., Burns, J.M. Jr., Sleath, P.R. y Rees, S.G. (1994). Serodiagnosis of Chagas disease by enzyme-linked immunosorbent assay using two synthetic peptides as antigens. J. Clin. Microbiol. 32: 971-974.
- Petri., W. H., Wyman, A. R. y Kafatos, F. C. (1976). Specific protein synthesis in cellular differentiation III. The eggshell proteins of *Drosophila melanogaster* and their program of development. Dev. Biol. 49: 185-199.
- Ralston, M.J. y Heath, D. D. (1995). A defined antigen for the serodiagnosis of *Taenia ovis* infections in dogs. J. Parasitol. 8: 422-428.
- Ramos-Kuri, M., Montoya, R.M., Padilla, A., Govezensky, T., Díaz, M.L., Sciutto, E., Sotelo, J. y Larralde, C. (1992). Immunodiagnosis of Neurocysticercosis. Arch. Neurol. 48: 633-36.
- Rhoads, M.L., Zarlenga, D.S. y al-Yaman, F.M. (1991). A recombinant immunodiagnostic antigen for bovine cysticercosis. Southeast Asian J. Trop. Med. Public. Health 22 Suppl: 268-270.
- Rickard, M.D. y Katiyar, J.C. (1976). Partial purification of antigens collected during *in vitro* cultivation of the larval stages of *Taenia pisiformis*. Parasitol. 72: 269-279
- Rickard, M. D. y Williams, J. F. (1982). Hydatidosis/ Cysticercosis: immune mechanism and immunization against infection. Adv. Parasitol. 21:229-296.
- Rickard, M. D (1991). Cestodes vaccines. Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health 22 Suppl: 287-290.
- Rico., M. J., Korman, N. J., Stanley, J. R., Tanaka, T. y Hall, R. P. (1990). IgG antibodies from patients with *bullous pemphigoid* bind to localized epitopes on synthetic peptides encoded by *bullous pemphigoid* antigen cDNA. J. Immunol. 145: 3728-3733.
- Rietschel, G. (1981). Contribution to the knowledge of *Taenia crassiceps* (Zeder, 1800) Rudolphi, 1810. Z. Parasitenkd. 65: 309-315.

- Romero, C.E. (1980). Frecuencia de anticuerpos séricos anti-*Cysticercus cellulosae* por inmunoelectroforesis en cerdos sacrificados en el rastro Municipal de Ecatepec. Tesis de Licenciatura. FMVZ, UNAM. México, D.
- Rosas, G., Cruz-Revilla, C., Fragoso, G., Lopez-Casillas, F., Perez, A., Bonilla, M. A., Rosales, R. y Sciutto, E. (1998). *Taenia crassiceps* cysticercosis: humoral immune response and protection elicited by DNA immunization. J. Parasitol. 84: 516-523.
- Salcedo, M., Barreto, L., Rojas, M., Moya, R., Cote, J. y Patarroyo, M.E. (1991). Studies on the humoral immune response to a synthetic vaccine against *Plasmodium falciparum* malaria. Clin. Exp. Immunol. 84: 122-128.
- Sciutto, E., Fragoso, G., Trueba, L., Lemus D., Montoya, R.M., Diaz, M.L., Govezensky, T., Lomeli, C., Tapia, G. y Larralde, C. (1990). Cysticercosis vaccine: cross-protecting immunity with *T. solium* antigens against experimental murine *T. crassiceps* cysticercosis. Paras Immunol. 12: 687-696.
- Sciutto, E., Fragoso, G., Váldez, F., Diaz, M.L., Montoya, R.M., Govezensky, T., Lomeli, C. y Larralde, C. (1991). Murine *Taenia crassiceps* cysticercosis: H-2 complex y sex influence susceptibility. Parasitol. Res. 77:243-246
- Sciutto, E., Aluja, A., Fragoso, G., Rodarte, L.F., Hernández, M., Villalobos, N., Padilla, A., Keilbach, N., Baca, M., Govězensky, T., Díaz, S. y Larralde, C.(1995). Immunization of pigs against *T. solium* cysticercosis. Factors related to effective protection. Vet. Parasitol. 60: 53-67.
- Scott, P., Pearce, E., Cheever, A.W., Coffman, R.L. y Sher, A. (1989) Role of cytokines y CD4+ T-cell subsets in the regulation of parasite immunity and disease. Immunol. Rev. 112: 161-182.
- Shcherban, Y. T., Shi, J., Durachko, M. D., Guiltinan, J. M., Mcqueen-Mason, J. C., Shieh, M. y Cosgrove, J. D. (1995). Molecular cloning and sequenced analysis of expansins- a highly conserved, multigene family of proteins that mediate cell wall extension in plants. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 9245-9249.
- Shimp, R. G., Cryall, R. B. y Cryall, C.A. (1975). *Heligmosomoides polygyrus* (*Nematospiroides dubius*): suppresion of antibody response to orally administered sheep erythrocytes in infected mice. Exp. Parasitol. 38:257-269.
- Showalter, M. A., Zhou, J., Rumeau, D., Worst, S. G. y Varner, J. E. (1991). Tomato extensin and extensin-like cDNAs: structure and expression in response to wounding. Plant Mol. Biol. 16: 547-565.

- Showalter, M. A. (1993). Structure and Function of plant cell wall proteins. Plant Cell. 5:9-23
- Sibille, P., Avrameas, A., Moraillon, A., Richardson, J., Sonigo, P., Pancino, G. y Strosberg, A. D. (1995). Comparison of serological tests for the diagnosis of feline immunodeficiency virus infection of cats. Vet. Microbiol. 35: 259-267.
- Smithers, S. R., Terry, R. J. y Hockley, D. H. (1969). Host antigens in schistosomiasis. Proc. R. Soc. Lond. (Biol.) 171: 483
- Stewart, M. y Howard, C. (1987). Synthetic peptides, a next generation of vaccines?. Immunol Today. 8: 51-58.
- Szein, M.B., Cuna, W.R. y Kierszenbaum, F. (1990). *Trypanosoma cruzi* inhibits the expression of CD3, CD4, CD8 and IL-2-R by mitogen-activated helper and cytotoxic human lymphocytes. J. Immunol. 144: 3558-3562
- Tarleton, R. L. y Kuhn, R. E. (1984). Restoration of *in vitro* immune responses of spleen cells from mice infected with *Trypanosoma cruzi* by supernatants containing interleukin 2. J. Immunol. 133: 1570-1575.
- Tarleton, R.L. (1988). *Trypanosoma cruzi*-induced suppression of IL-2 production. J. Immunol. 140: 2763-2768.
- Terrazas, L.I., Bojalil, R., Govezensky, T. y Larralde, C (1994). A role for 17- β - estradiol in immunoendocrine regulation of murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). J. Parasitol. 80: 563-568.
- Terrazas, L. I., Bojalil, R., Govezensky, T. y Larralde C. (1998). Shift from an early protective Th1-type immune response to a late permissive Th2-type response in murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). J. Parasitol. 84: 74-81.
- Toledo, A. (1995). Avances en el desarrollo de cultivos celulares a partir de cisticercos de *Taenia crassiceps*. Tesis de Licenciatura. FQ. UNAM.
- Tsang, V. C. W. y Wilson. M. (1995). *Taenia solium* cysticercosis: An under-recognized but serious public health problem. Parasitol. Today. 11: 124-126.
- Tsang, V.C.W., Brand, A.J. y Boyer, A.E. (1989). An enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay by glycoprotein antigens for diagnosing human cysticercosis (*T. solium*). J. Infect. Dis. 159: 50-59.

- Valdez, M., Hernandez, M., Govezensky, T., Frago, G. y Sciutto, E. (1994). Immunization against *Taenia crassiceps* cysticercosis. Identification of the most promising antigens in the induction of protective immunity. J. Parasitol. 80: 931-936.
- Van Regenmortel, M.H.V., Briy, J.P., Muller, S. y Plaue, S. Synthetic polipeptides as antigens. Techniques Laboratory in Biochemistry y Molecular Biology. Ed. Elsevier. 1988. pág.41-43.
- Vergara, U., Lorca, M., Veloso, C., Gonzalez, A., Engstrom, A., Aslund, I., Pettersson, U. y Frasc, C. C. (1991). Assay for detection of trypanosoma cruzi antibodies in human sera based on reaction with synthetic peptides. J. Clin. Microbiol. 29: 2034-2037,
- Vergara, U., Veloso, C., Gonzalez, A. y Lorca, M. (1992). Evaluation of an Enzime-Linked Immunosorbent assay for the diagnosis of Chagas disease using synthetic peptides. Am. J. Trop. Med. Hyg. 46: 39-43.
- Villa, O. F. y Kuhn, R. E. (1996). Mice infected with the larvae of *Taenia crassiceps* exhibit a Th2-like immune response with concomitant energy and downregulation of Th1-associated phenomena. Parasitol. 112: 561-570.
- Vogel, M., Gottstein, B., Moller, N. y Seebeck, T. (1988). Production of a recombinant antigen of *Echinococcus multilocularis* with high imunodiagnostic sensitivity and specificity. Mol. Biochem. Parasitol. 31:117-125.
- White, A. C., Robinson, P. Jr. y Kuhn, Raymond. (1997). *Taenia solium* cysticercosis: Host-parasite interactions and the immune response. Chem. Immunol. Basel, Karger. 66: 109-130
- Willms, K. y Arcos, L. (1977). *T. solium*: host serum proteins on the cysticercus surface identified by an ultrastructural immuno-enzyme technique. Exp. Parasitol. 43: 396.
- Willms, K., Merchant, M.T., Díaz, S. y Arcos, L. (1982). Host-parasite interface in the metacestode of *Taenia solium* . En: *Cysticercosis: Present State of Knowledge and Perspectives*. Flisser., A. Willms, K., Lacleste, J. P., Larralde, C., Ridaura, C. y Beltrán, F. (eds.) Academic Press, New York, pág. 397.
- Zarlenga, D.S., Rhoads, M.L. y al-Yaman, F.M. (1994). A *Taenia crassiceps* cDNA sequence encoding a putative immunodiagnostic antigen for bovine cysticercosis. Mol. Biochem. Parasitol. 67:215-223.