



10
24
A
2/1

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS

CARACTERIZACION DE UN ANTIGENO DE
INTERES EN EL DISEÑO DE UNA VACUNA
CONTRA CISTICERCOSIS

T E S I S
PARA OBTENER EL TITULO DE:
LICENCIADO EN INVESTIGACION
BIOMEDICA BASICA
QUE PRESENTA
EILEEN URIBE QUEROL

MEXICO D..F.

1998

264449.



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.

Para Rafa y Lidia

Agradecimientos

Agradezco a todas las personas que de una u otra forma tuvieron una intervención en el desarrollo de mi tesis.

A Rafa por ser mi pareja y ayudarme con todos los problemas que trae consigo la escritura y la edición de la tesis y por todas las horas que le hemos dedicado, que fueron provechosas.

A mi Mamá por apoyarme en todo momento durante el desarrollo de la tesis, por leerla, por escuchar mis ensayos de presentación y sobretodo por ser mi mejor amiga.

A Jesús Manuel por ayudarme a leer y corregir esta tesis.

A mi Mamá y a mi tío Pepe por ayudarme con los dibujos de la tesis.

A mi Papá, mi abuela Hilda, mi tío Toño, mis abuelos Joaquín y Ofelia y a todos mis tíos, primos y amigos que me dieron tanta lata de que para cuando.

A Edda y a Juan Carlos por brindarme su amistad, su tiempo y dedicación y porque sin su ayuda esta tesis no hubiera sido realizada.

A mis sinodales por revisar con detalle esta tesis, por sus valiosos comentarios y por su apoyo.

A mis compañeros y amigos del laboratorio Andrea, Carmen, Gemma, Manuel, Constantino, Maricela, Luis, Gladis, Gabriela, Iván, Marco, Tere, Gonzalo, Sara y Sergio por todos los momentos agradables que hemos compartido, por apoyarme y ayudarme siempre y bajo cualquier circunstancia.

A Julio César, Toño, y Nancy por proporcionarme los antígenos y la técnica de extracción de estos antígenos que me fueron muy útiles en el desarrollo de la tesis.

A Alfonso por explicarme el modelo teórico de las curvas de inhibición.

A mis amigos Elizabeth, Karina, Sinué, Javier, Brisa, Etelvina, Tania, Jo Ana, Cuauhtemoc, Humberto y Luis.

Tabla de Contenido

<i>Agradecimientos</i>	3
<i>Tabla de Contenido</i>	4
<i>Presentación</i>	6
<i>Introducción</i>	7
Antecedentes históricos en el estudio de la cisticercosis	7
Incidencia y relevancia de la cisticercosis en la salud humana	7
Características de las diferentes fases de <u>T. solium</u>	8
<u>Taenia crassiceps</u> : modelo experimental de cisticercosis	10
Avances en el desarrollo de vacunas recombinantes y sintéticas en cisticercosis	11
<i>Objetivos</i>	13
Objetivo General	13
Estrategias	13
<i>Materiales y Métodos</i>	14
Técnica de Lowry para determinación de proteínas (Lowry et al., 1951)	14
Técnica de ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) (Larralde et al, 1989)	15
Obtención de anticuerpos contra cisticercos	16
Obtención de antígenos de diferentes parásitos	16
Técnica de purificación de anticuerpos α -GK-1****	17
Reactividad de péptidos con sus anticuerpos específicos	18
<i>Resultados</i>	19
Reconocimiento de diferentes antígenos por anticuerpos de ratones parasitados con cisticercos de <u>T. crassiceps</u>	19
Reconocimiento de diferentes antígenos por anticuerpos de conejo inmunizado con el péptido sintético GK-1	21
Reconocimiento de diferentes antígenos mediante anticuerpos de conejos inmunizados con los péptidos sintéticos GK-1 o GK-2	22
Reactividad del péptido GK-1 con anticuerpos contra las diferentes etapas de desarrollo de <u>T. crassiceps</u> y <u>T. solium</u>	23
Análisis de la reactividad de los anticuerpos α -GK-1 con antígenos de E. histolytica y de cisticercos de <u>T. crassiceps</u>	25
Reconocimiento del péptido GK-1 por cepas resistentes y susceptibles en infección temprana y tardía	27
Resultados con base en el análisis de secuencia del antígeno KETc7	27
<i>Discusión</i>	32
<i>Conclusiones</i>	35

<i>Perspectivas</i>	36
<i>Bibliografía</i>	37
<i>Apéndice 1</i>	40
Proteínas DRPLA	40
Extensinas	40
<i>Apéndice 2</i>	43

Presentación

El presente proyecto se realizó con el propósito de ahondar en el estudio de la relación huésped - parásito que se lleva a cabo en la cisticercosis y utilizar el conocimiento adquirido para postular los posibles procesos que participan en la protección inducida por la vacunación en contra de esta parasitosis.

En este trabajo se establecen algunas características del péptido sintético GK-1 que constituye un epitopo protector del antígeno recombinante KETc7 y se reportan algunas de sus características inmunogénicas así como el análisis de su secuencia.

Este proyecto se realizó en el Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB) de la Universidad Nacional Autónoma de México y en el Instituto de Química (IQ) de la misma Universidad, bajo la dirección de los Drs Edda Sciutto Conde (IIB) y Juan Carlos Almagro (IQ).

Introducción

Antecedentes históricos en el estudio de la cisticercosis

Desde mediados del siglo XVI varios investigadores habían observado vesículas, en cerebros de pacientes epilépticos, los que ahora se conocen como cisticercos. Los primeros reportes de la cisticercosis, como enfermedad, datan del siglo XVII, cuando los investigadores Malpighi y Leannec descubrieron que la cisticercosis es causada por un parásito (Tabla I).

Tabla I. Antecedentes históricos del estudio de la cisticercosis (Del Brutto *et al.*, 1996; Flisser *et al.*, 1997).

Año	Investigadores	Descubrimiento
1558	Rumler	<ul style="list-style-type: none">Fue el primero en comunicar un caso de cisticercosis humana, descubriéndolo como un tumor en la duramadre de un individuo epiléptico
1652	Panarolus	<ul style="list-style-type: none">Encontró vesículas llenas de fluido en el cuerpo calloso de un sacerdote epiléptico, pero aún no se habían identificado estas vesículas como cisticercos.
1698	Malpighi y Leannec	<ul style="list-style-type: none">Reconocieron que la enfermedad es causada por un parásito y descubrieron el escólex.
1803	Zeder y Rodolphi	<ul style="list-style-type: none">Crearon la clasificación de <i>Cysticercus cellulosae</i>, pero se abolió al demostrarse que los cisticercos son la fase larvaria de la tenia.
1855	Kuchenmeister	<ul style="list-style-type: none">Demostró que las tenias se desarrollan a partir de cisticercos.

Incidencia y relevancia de la cisticercosis en la salud humana

La cisticercosis por *Taenia solium* es una enfermedad que afecta tanto al humano como al cerdo; es una de las principales causas de enfermedades neurológicas en humanos y constituye un serio problema de salud pública en Asia, África y América Latina, debido a que en estas áreas los escasos recursos sanitarios favorecen la transmisión del parásito (Gemmel y Lawson, 1982; Larralde *et al.*, 1992).

La infección en humanos se debe principalmente a: 1) la ingesta de agua o alimentos contaminados; 2) la autocontaminación por falta de higiene de personas que alojan *T. solium* en su intestino; y 3) la autocontaminación interna causada por un peristaltismo inverso que haga retroceder los huevos al duodeno o al estómago, donde eclosionan. De estas causas, la más frecuente es la ingesta de alimentos contaminados.

Los síntomas de la enfermedad son muy variables según la cantidad de cisticercos y del lugar donde se alojen. Se les ha encontrado en diversas partes del cuerpo: tejido muscular, tejido subcutáneo, cerebro, ojo, etc. La respuesta a la presencia de estos parásitos es una secuencia de reacciones celulares locales, que incluyen la infiltración de neutrófilos, eosinófilos, linfocitos y células plasmáticas. Cabe mencionar que los signos y síntomas casi nunca permiten un diagnóstico clínico definitivo y se requieren diferentes pruebas serológicas e imagenológicas para su confirmación. Algunas de estas pruebas son: 1) determinación de proteínas, glucosa y número de células, especialmente eosinófilos en el líquido cefalorraquídeo; 2) técnicas no invasivas de imagen como la tomografía computarizada y la resonancia magnética; 3) técnicas inmunológicas como la determinación de anticuerpos en el líquido cefalorraquídeo y en el suero, el ensayo inmunoenzimático (ELISA) y la inmunotransferencia (Flisser *et al.*, 1997).

Para controlar la enfermedad se han considerado diversas alternativas de prevención, entre ellas figuran campañas de tipo educativo, mejoramiento sanitario, tratamiento de cerdos infectados, así como vacunas dirigidas a reducir la cisticercosis porcina para interrumpir el ciclo de transmisión.

Características de las diferentes fases de *T. solium*

Tenia

Reino	<i>Animalia</i>
Phylum	<i>Platyhelminthes</i>
Clase	<i>Cestoda</i>
Subclase	<i>Eucestoda</i>
Orden	<i>Cyclophyllidea</i>
Familia	<i>Taeniidae</i>
Género	<i>Taenia</i>
Especie	<i>solium</i>

La *Taenia solium* es un helminto hermafrodita, cuyo tamaño varía entre 1 y 5 metros de longitud que se aloja en el intestino delgado del humano. No posee sistema digestivo, por lo que debe nutrirse a partir del alimento ya digerido por el hospedero. Tiene tres regiones fácilmente distinguibles: escólex, cuello y estróbilo.

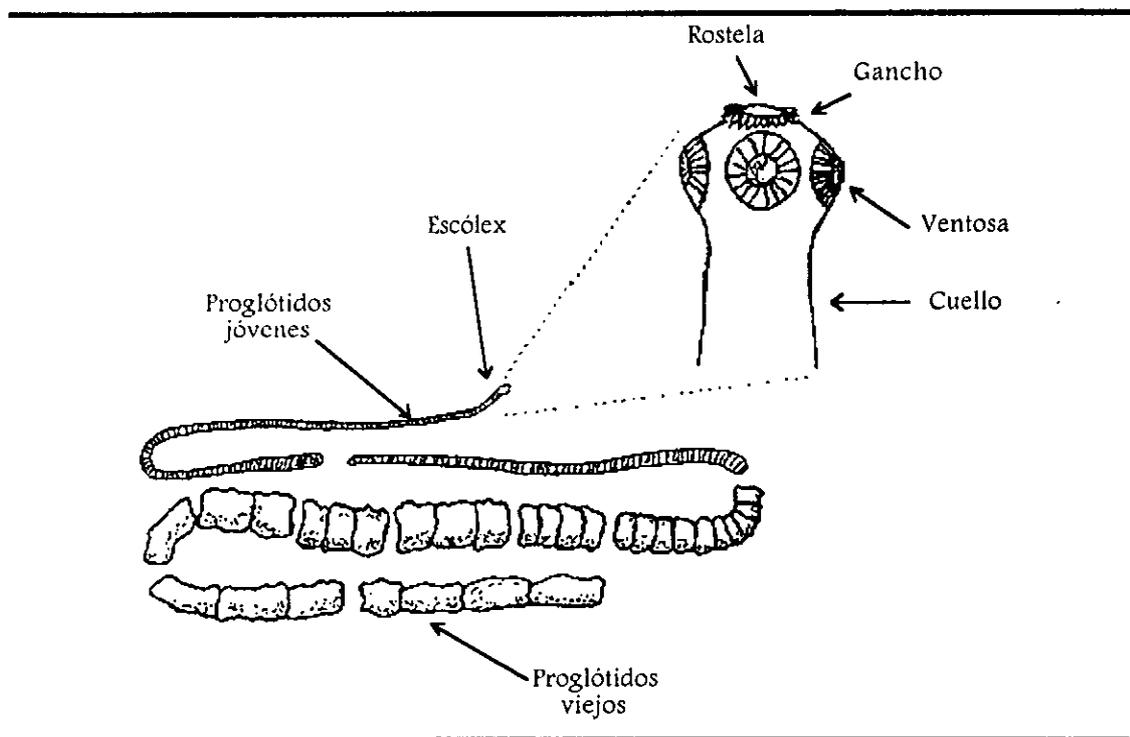


Figura 1. *T. solium*.

El escólex, es una estructura que le sirve para anclarse a la pared del intestino y está provisto con una corona de ganchos (rostela) y cuatro ventosas. Inmediatamente detrás del escólex, se encuentra una pequeña región no segmentada denominada cuello, seguida por un largo tronco segmentado (estróbilo) que está formado por proglótidos individuales (Figura 1). Los proglótidos se producen inmediatamente detrás del cuello, en la llamada área de estrobilación, por lo que los proglótidos más viejos y largos se encuentran en el extremo posterior del la tenia. Cada proglótido posee un sistema reproductor completo que, cuando madura, contiene aproximadamente 80,000 huevos viables. Los proglótidos se desprenden continuamente del estróbilo y son eliminados por el intestino (Hyman, 1940; Flisser *et al*, 1982; Brusca y Brusca, 1990).

La *T. solium* posee una cubierta externa llamada tegumento, formada por extensiones citoplásmicas no ciliadas, denominadas microtrícas, cuyos cuerpos celulares se encuentran en el mesénquima. El tegumento, además de proveer protección, es un sitio importante de intercambio con el medio ambiente. Los desperdicios son removidos por difusión a través de esta superficie y algunos nutrientes, especialmente aminoácidos, son tomados mediante pinocitosis. (Flisser *et al.*, 1997).

Cisticercos

Los cisticercos tienen un tamaño que varía entre 0.5 y 5 cm de diámetro. La superficie externa de la vesícula está rodeada por microvellosidades limitadas por una membrana plasmática, que se encuentra cubierta por un glucocáliz. La siguiente capa es el tegumento, que contiene vesículas elipsoidales de diferentes tamaños. El límite del tegumento es un sincicio, sostenido por una membrana basal de tejido conjuntivo.

El cisticercos también posee un escólex invaginado y un sistema de nutrición por difusión; idénticos al del gusano adulto. (Flisser *et al.*, 1997).

Huevos

Esta fase del parásito es la única que se puede encontrar en el medio ambiente y está protegida por varias capas. Son esféricos y tienen apariencia radial cuando se observan en el microscopio de luz. La envoltura más externa se denomina vitelo o cápsula; la siguiente capa es la membrana embriofórica que tiene apariencia de cráteres y rodea al embrióforo. El embrióforo consiste en una serie de tabiques proteicos (similares a la queratina) llamados bloques embriofóricos, unidos mediante una proteína cementante que se origina de una envoltura de células embrioforales más profunda y que es fácilmente degradable por enzimas digestivas. La capa más interna es la membrana oncosferal, se hace permeable cuando se pone en contacto con la pancreatina y permite que el embrión se active. La membrana oncosferal envuelve directamente al embrión hexacanto, denominado así porque posee tres pares de ganchos, que también recibe el nombre de oncosfera (Flisser *et al.*, 1997) (Figura 2).

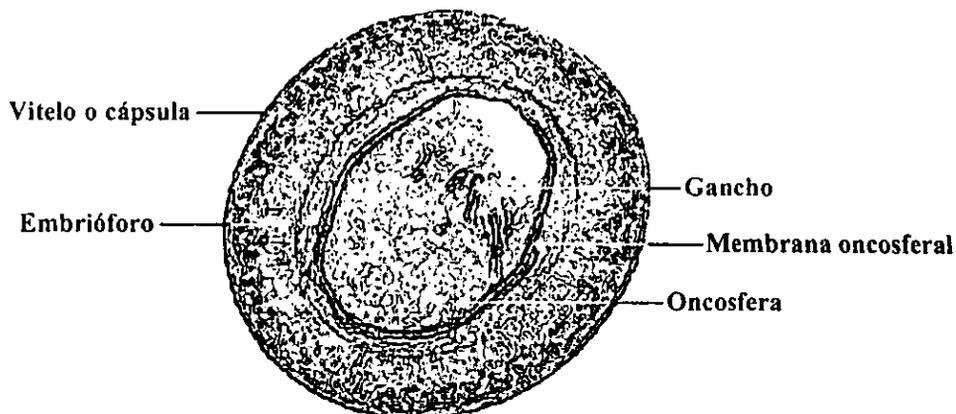


Figura 2. Huevo de *T. solium*

Ciclo de vida de *T. solium*

El ciclo de vida de la *Taenia solium* incluye una fase larvaria (cisticercos), que afecta tanto al humano (hospedero definitivo) como al cerdo (hospedero intermediario) y se adquiere por la ingesta de huevos presentes en alimentos contaminados con heces humanas. El ácido clorhídrico y la pepsina gástrica del tracto digestivo inician la disgregación del embrióforo, que deja libre a la oncosfera (eclosión), la cual atraviesa la mucosa intestinal, alcanza los vasos sanguíneos o linfáticos y es transportada a cualquier órgano o tejido, en donde se desarrolla hasta metacéstodo (larva o cisticercos). Cuando el humano consume carne de cerdo infectada y mal cocida, los cisticercos pueden desarrollar el estado adulto del parásito (la tenia); ésta puede producir proglótidos que son evacuados en las heces fecales del hospedero. Los proglótidos maduros

contienen cientos de miles de huevos capaces de transformarse en cisticercos, cuando son ingeridos por el humano o por el cerdo, así se completa el ciclo de vida del parásito (Flisser *et al.*, 1982; Aluja *et al.*, 1987) (Figura 3).

Relevancia del cerdo en la transmisión de la teniasis

El cerdo desempeña un papel muy importante en la transmisión a los humanos, de la teniasis por *T. solium*. Las condiciones de la porcicultura rústica permiten que con mayor facilidad los cerdos puedan consumir heces humanas, lo que propicia la transmisión de la parasitosis. Esto es mucho menos probable en la porcicultura altamente tecnificada. Para evitar este tipo de problemas se requiere de una inspección sanitaria confiable, lo cual se dificulta dada la extensión y complejidad geográfica y socioeconómica de México y produce un alto índice de decomiso de carne que afecta directamente la economía del país (Aluja *et al.*, 1987).

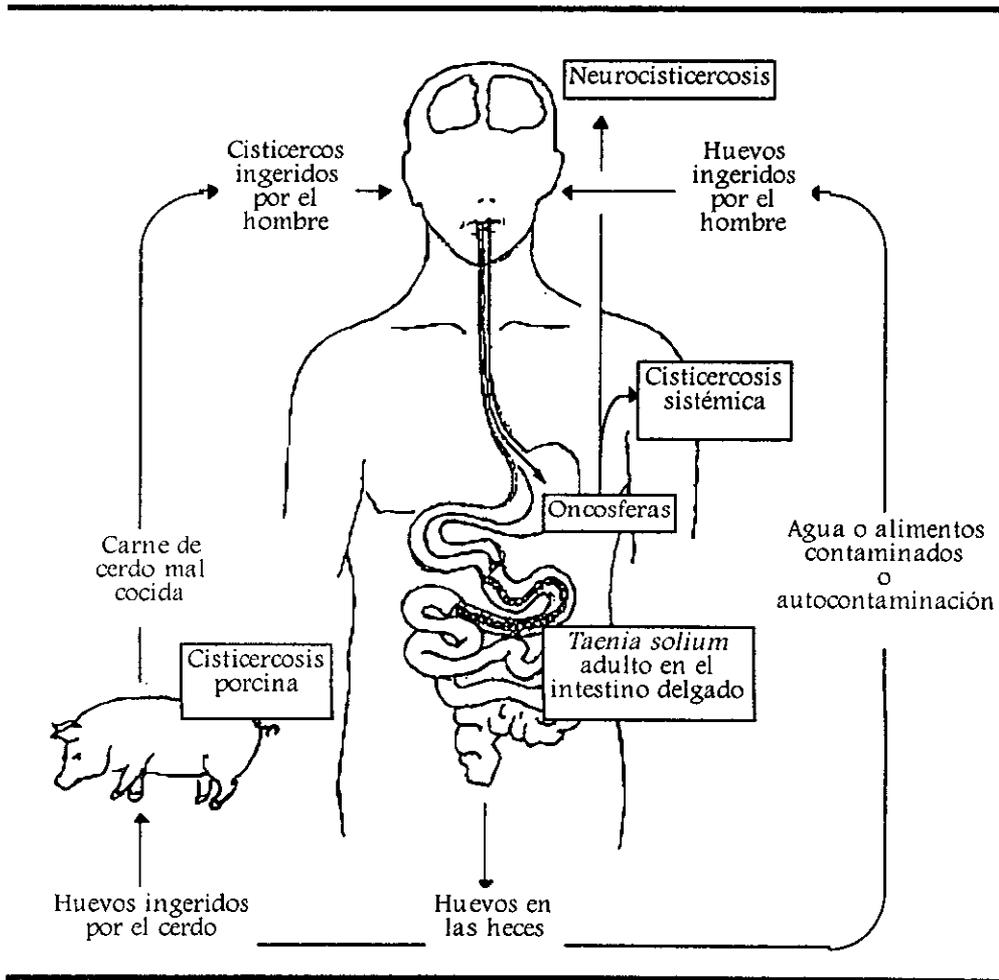


Figura 3. Ciclo de vida de *T. solium*.

Taenia crassiceps: modelo experimental de cisticercosis

El requerimiento indispensable del cerdo, para la manutención del ciclo de vida de este parásito, ofrece la alternativa de controlar la cisticercosis al interrumpir, en esta etapa, el ciclo de vida del parásito. Con el fin de eliminar la cisticercosis porcina, se han comenzado a estudiar diferentes estrategias de control. Un primer obstáculo para el análisis sistemático de los factores biológicos que participan en la susceptibilidad a la cisticercosis por *T. solium*, lo constituyen las dificultades y altos costos que su estudio requiere, debido a los

hospederos en los cuales se aloja. El uso de modelos experimentales ha resultado una estrategia que ha permitido avanzar substancialmente en el estudio de esta enfermedad. En el Departamento de Inmunología, del IIB de la UNAM, se ha utilizado para este propósito el modelo murino de cisticercosis por *T. crassiceps*. En éste el parásito tiene la capacidad de crecer en la cavidad peritoneal del ratón, propiedad que permite mantenerlo fácilmente, por medio de pases intraperitoneales sucesivos (Freeman, 1962). Su interés como modelo aumenta si se considera la homología antigénica de más del 90% entre *T. solium* y *T. crassiceps* y la alta inmunogenicidad cruzada entre ambos céstodos (Larralde *et al.*, 1989). El ciclo de vida de los dos céstodos es muy similar, con la diferencia de que *T. crassiceps* puede dividirse por gemación, lo cual permite reproducirlo en condiciones de laboratorio e inducir su crecimiento en la cavidad peritoneal del ratón. Esta forma de reproducción facilita la obtención de grandes cantidades de antígenos en pocas semanas, después de la infección (Larralde *et al.*, 1990).

Diferencias de susceptibilidad del hospedero

El modelo murino ha permitido evaluar la relevancia de componentes antigénicos del hospedero en la susceptibilidad a la infección. Así, actualmente se han identificado diferencias determinadas genéticamente en la susceptibilidad a la cisticercosis murina. Las cepas con el fondo genético B10 son resistentes a la cisticercosis, mientras que las cepas BALB tienen diferentes grados de susceptibilidad; de éstas, la cepa BALB/cAnN es la más susceptible y la cepa BALB/CJ es la más resistente (Fragoso *et al.*, 1996).

Avances en el desarrollo de vacunas recombinantes y sintéticas en cisticercosis

Los esfuerzos para desarrollar una vacuna contra *T. solium* se basan en algunos resultados previos, obtenidos con un extracto antigénico complejo de *T. solium* en pruebas de campo (Molinari *et al.*, 1993), así como en los experimentos con cisticercosis murina por *T. crassiceps* (Sciutto *et al.*, 1990). Además, el éxito logrado con la vacuna contra *T. ovis* (Johnson *et al.*, 1989) establece un buen precedente en el desarrollo de otras vacunas recombinantes contra helmintos como *T. solium*.

En el laboratorio se han concentrado los esfuerzos en el desarrollo de una vacuna eficiente en contra de la cisticercosis porcina. Para lograr este objetivo, se han evaluado antígenos provenientes del cisticerco de *T. crassiceps*, con respecto a su capacidad de prevenir la cisticercosis murina, por medio de fracciones antigénicas que en conjunto inducen niveles de protección superiores a los obtenidos cuando se utilizan los antígenos totales del cisticerco (Valdéz *et al.*, 1994). Con el fin de poder identificar proteínas pertenecientes a estas fracciones antigénicas, se elaboró una biblioteca de ADN complementario (ADNc) de cisticerco de *T. crassiceps* (Manoutcharian *et al.*, 1996). En esta biblioteca se identificaron varias clonas por medio de inmunodetección, usando anticuerpos específicos contra las fracciones antigénicas protectoras y anticuerpos de cerdos infectados con cisticercos de *T. solium*. Las clonas que fueron reconocidas por ambos anticuerpos, se denominaron KETc1, KETc4, KETc7, KETc11 y KETc12 y han sido consideradas para el desarrollo de la vacuna. Además, fueron evaluadas en su capacidad de protección contra la cisticercosis murina causada por *T. crassiceps* en ratones susceptibles BALB/cAnN de ambos sexos.

Los resultados indicaron que KETc1, KETc4, KETc7 y KETc12, tienen una capacidad de protección que varía del 70% al 80% en machos y del 30% al 60% en hembras. Mientras tanto, la clona KETc11, en ratones machos, indujo un aumento en la susceptibilidad a la parasitosis, lo cual permite suponer que está presente el fenómeno de facilitación, que hace posible la proliferación de los parásitos (Manoutcharian *et al.*, 1995).

Características del antígeno recombinante KETc7

El antígeno recombinante KETc7 está formado por cien aminoácidos y constituye una parte de la proteína nativa de 56 kDa (Figura 4). A partir de la secuencia de KETc7 se predijo el perfil de antigenicidad y se seleccionaron tres regiones (Gevorkian *et al.*, 1996). Las secuencias de estas tres regiones se sintetizaron en el laboratorio y dieron lugar a tres péptidos que fueron denominados GK-1, GK-2 y GK-3 (Figura 5); reconocidos por los anticuerpos de individuos infectados, obtenidos de sueros de humanos, ratones y cerdos. Así se confirmó la antigenicidad de los mismos.

AAT	TCG	GCA	CGA	GCA	TTT	ATG	CAG	CCG	CAT	CCT	TCC	TTC	TCT	CCA
N	S	A	R	A	F	M	Q	P	H	P	S	F	S	P
CCG	CCA	GTT	GAT	TAT	CTG	TAC	CAG	ACA	AAC	TCT	CCA	CCG	CCC	TAT
P	P	V	D	Y	L	Y	Q	T	N	S	P	P	P	Y
GGG	GGC	GCT	GTC	CCT	CCA	CCT	TAC	GCG	CCG	AAT	CCA	GGT	CCA	CCG
G	G	A	V	P	P	P	Y	A	P	N	P	G	P	P
CCG	CCA	TAC	ACG	GGT	GCG	GCA	AGT	TCG	ATG	CCG	CCT	TAT	CCG	ACC
P	P	Y	T	G	A	A	S	S	M	P	P	Y	P	T
GGT	GGT	CCG	CCA	CCC	GTC	AAC	ACC	GGT	TAT	TAC	TAT	CCA	TCT	GAT
G	G	P	P	P	V	N	T	G	Y	Y	Y	P	S	D
CCA	AAT	ACC	TTC	TAC	GCT	CCA	CCC	TAC	AGC	CAG	GCT	TCA	GCA	CCT
P	N	T	F	Y	A	P	P	Y	S	Q	A	S	A	P
CCT	ATG	GAA	CCA	GAA	GAT	AAG	AAG	AAT	CTT	TAG				
P	M	E	P	E	D	K	K	N	L					

Figura 4. Secuencia de nucleótidos y aminoácidos de el antígeno KETc7. Se muestran en negritas los tres péptidos sintéticos, GK-3, GK-2 y GK-1. La secuencia *NSAR* corresponde al vector de clonación.

GK-1

GYYYPSDENTFYAPPYS

GK-2

MPPYPTGGPPP

GK-3

PPPYAPNPGPPPPYTGA

Figura 5. Secuencia de aminoácidos de los tres epítomos denominados, GK-1, GK-2 y GK-3 pertenecientes al antígeno KETc7.

Objetivos

Objetivo General

- Caracterizar al antígeno recombinante KETc7 con base en criterios inmunológicos y en el análisis de su secuencia

Estrategias

- Determinar si el péptido GK-1 es exclusivo de cisticercos y tenias, o es compartido con otros parásitos
- Determinar la reactividad con GK-1 que poseen los anticuerpos de diferentes compartimientos de los cisticercos, tanto de *T. solium* como de *T. crassiceps*, así como de huevos y tenias de *T. solium*
- Realizar un análisis de la reactividad de los anticuerpos α -GK-1 con GK-1, antígenos de *E. histolytica* y antígenos de cisticercos de *T. crassiceps*.
- Estimar la constante de afinidad promedio y la distribución de afinidades de los anticuerpos dirigidos contra GK-1
- Determinar el grado de homología de la proteína KETc7 con otras proteínas
- Especular, con base en la información obtenida, sobre las posibles funciones de la proteína KETc7 en el cisticercos

Materiales y Métodos

Técnica de Lowry para determinación de proteínas (Lowry *et al.*, 1951)

Materiales

- Hidróxido de sodio (NaOH)
- Tartrato de sodio ($\text{Na}_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$)
- Reactivo de Folin-Ciocalteu
- Agua bidestilada
- Carbonato de sodio (Na_2CO_3)
- Sulfato de cobre (CuSO_4)
- Albúmina

Reactivos

- Hidróxido de Sodio 1 N
- Solución A: Carbonato de sodio al 2% en hidróxido de sodio 0.1 N (Preparar al momento)
- Solución B: Tartrato de sodio al 2% en agua
- Solución C: Sulfato de cobre al 1% en agua
- Solución de Folin (Preparar al momento)
- Solución ABC (Ver protocolo)
- Estándar de albúmina, 1 mg/ml en agua

Protocolo

Curva Estándar

	Albúmina	Agua
Blanco	0.0 ml	5.0 ml
1	0.2 ml	4.8 ml
2	0.4 ml	4.6 ml
3	0.6 ml	4.4 ml
4	0.8 ml	4.2 ml
5	1.0 ml	4.0 ml

1. Preparar solución ABC de la siguiente manera: Mezclar 98 ml de la solución A y 1 ml de la solución B, agitar bien y agregar 1 ml de la solución C. La solución debe siempre realizarse en ese orden para evitar precipitaciones
2. Preparar la solución de Folin: mezclar una parte de Folin-Ciocalteu con dos partes de agua
3. Preparar la curva estándar
4. Realizar las diluciones de muestras en agua 1:10 y 1:100 (por duplicado)
5. Añadir 3 ml de solución ABC, agitar e incubar durante 10 minutos
6. Agregar 3 ml de solución de Folin, agitar y dejar reposar 30 minutos
7. Leer en el espectrofotómetro a 625 nm
8. Calcular la concentración de proteínas con la fórmula:

$$\text{Concentración [mg / ml]} = 200 \times \text{D.O.}$$

Técnica de ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) (Larralde et al, 1989)

Materiales

- Bicarbonato de sodio (NaHCO_3)
- Agua bidestilada
- Hidróxido de sodio (NaOH)
- Cloruro de magnesio hexahidratado ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)
- Fosfato de sodio monobásico (NaH_2PO_4)
- Tween 20
- Paranitrofenilfosfato (p-NPP)
- Anticuerpo α -IgG acoplado a fosfatasa
- Antígeno
- Carbonato de sodio (Na_2CO_3)
- Ácido clorhídrico (HCl)
- Dietanolamina
- Azida de sodio (NaN_3)
- Fosfato de sodio dibásico (Na_2HPO_4)
- Albúmina sérica bovina (BSA)
- Cloruro de sodio (NaCl)
- Suero problema
- Placa de polipropileno (Nunc-Immuno™ plate maxisurp™ surface, Nunc™ Brand Products, DEN)

Reactivos

- Solución A: Bicarbonato de sodio 1 M
- Solución B: Carbonato de sodio 1 M
- Amortiguador de carbonatos: 45.3 mM de NaHCO_3 , 18.2 mM de Na_2CO_3 , pH a 9.6
- Amortiguador de dietanolamina: 1 M de dietanolamina, 0.5 mM de cloruro de magnesio, 6 mM de azida de sodio, pH 9.8
- Solución salina de fosfatos (PBS) 10x: 30 mM de NaH_2PO_4 , 72 mM de Na_2HPO_4 y 1.26 M de Na_2Cl
- PBS(1x)-Tween al 0.3%
- PBS(1x)-BSA al 1%
- Hidróxido de sodio 2 N

Protocolo

1. Preparar la solución de PBS 10x : tomar 3.6 g de fosfato monobásico de sodio, 10.22 g de fosfato dibásico de sodio anhidro y 74 g de cloruro de sodio; aforarlo a 1 litro con agua
2. Preparar el amortiguador de carbonatos: tomar 45.3 ml de la solución A, 18.2 ml de la solución B, aforarlo con agua a 1 litro y ajustar el pH a 9.6 con ácido clorhídrico o con hidróxido de sodio, según sea el caso
3. Preparar el amortiguador de dietanolamina: tomar 100 ml de dietanolamina, 102 mg de cloruro de magnesio, 400 mg de azida de sodio y 700 ml de agua, ajustar el pH a 9.8 y aforar a 1 litro con agua. Esta solución debe protegerse de la luz.
4. Sensibilizar la placa de polipropileno con de 1 a 10 μg de antígeno, por pozo, diluido en 100 μl de amortiguador de carbonatos (En caso de sensibilizar con un péptido, se deja incubar toda la noche a temperatura ambiente. En caso de sensibilizar con un antígeno total, se deja incubar una hora a 37 °C o toda la noche a 4 °C)
5. Preparar las diluciones del suero en PBS-BSA al 1%.
6. Lavar 4 veces con PBS-Tween al 0.3% y dejar pasar 3 minutos en reposo entre cada lavado
7. Bloquear la placa con 100 μl de PBS-BSA al 1%, por pozo. Dejar incubar una hora a 37 °C
8. Lavar 4 veces con PBS-Tween al 0.3% y dejar pasar 3 minutos en reposo entre cada lavado
9. Adicionar 100 μl por pozo del suero problema, en la dilución deseada. Dejar incubar una hora a 37 °C
10. Lavar 4 veces con PBS-Tween al 0.3% y dejar pasar 3 minutos en reposo entre cada lavado
11. Adicionar 100 μl por pozo del anticuerpo conjugado (α -IgG) con fosfatasa, en dilución 1:1,000 en PBS-BSA al 1%. Dejar incubar una hora a 37 °C
12. Lavar 4 veces con PBS-Tween al 0.3% y dejar pasar 3 minutos en reposo entre cada lavado

13. Preparar el lector de ELISA a 405 nm con un diferencial de 630 nm
14. Adicionar 100 µl por pozo del sustrato p-NPP, en dilución de 1 mg/ml. Cada pastilla contiene 5 mg, para una placa se necesitan dos pastillas disueltas en 10 ml de amortiguador de dietanolamina
15. Incubar a 37 °C por aproximadamente 20 minutos. Controlar en la reacción que el control negativo no cambie de color
16. Detener la reacción con 50 µl por pozo de NaOH 2 N
17. Obtener las lecturas

Obtención de anticuerpos contra cisticercos

Materiales

- Antígenos de *T. solium* (membrana, escólex y fluido vesicular)
- Ratonas hembras de la cepa C57Bl/6J
- Cloruro de sodio (NaCl)
- Jeringas de insulina
- Antígenos de *T. crassiceps* (membrana y fluido vesicular)
- Saponina (Sigma)
- Agua bidestilada

Reactivos

- Solución de saponina de 1 mg/ml
- Solución salina isotónica

Protocolo

1. Para cada inmunización usar, por ratón: 10 µg de antígeno, 100 µg de saponina y suficiente solución salina para completar un volumen de 200 µl (McColm *et al.*, 1982)
2. Realizar 3 inmunizaciones con intervalos de 10 días
3. Diez días después de la última inmunización, sangrar los ratones a blanco
4. Incubar la sangre una hora a 37 °C y posteriormente, una hora a 4 °C. Centrifugar a 6,000 rpm durante 10 minutos, recuperar el suero y guardarlo a -20 °C
5. Los anticuerpos producidos en cada uno de los sueros se cuantifican según la técnica de ELISA

Obtención de antígenos de diferentes parásitos

Obtención de los antígenos de cisticercos de *T. solium* (Larralde *et al.* 1989)

Los cisticercos se extraen de carne de cerdo infectada; se aíslan y se rompen mecánicamente con pinzas. Se separan el fluido vesicular, la membrana y el escólex. El fluido vesicular se centrifuga a 14,000 rpm durante 5 minutos, recuperándose el sobrenadante. Tanto la membrana como el escólex se homogeneizan con un Politrón, después se centrifugan a 14,000 rpm durante 5 minutos se recupera el sobrenadante. Los antígenos se guardan a -20 °C hasta que se utilizan. La concentración de proteínas se determina por el método de Lowry.

Obtención de los antígenos de cisticercos de *T. crassiceps* (Larralde *et al.* 1989)

Los cisticercos se extraen de la cavidad peritoneal de ratones parasitados y se centrifugan, el sobrenadante es el fluido vesicular y el pastilla que se forma son las membranas. Las membranas se homogeneizan con un Politrón y se recupera el sobrenadante. Los antígenos se guardan a -20 °C hasta que se utilizan. La concentración de proteínas se determina por el método de Lowry.

Obtención de antígeno total de *E. histolytica* (Portnoy *et al*, 1990)*

1. Cultivar los trofozoitos durante 72 h
2. Cosechar los parásitos de su medio, incubar en el hielo durante 10 minutos, centrifugar a 150 g.
3. Resuspender la pastilla de trofozoitos en amortiguador de glicina 0.1 M, pH de 2.0 ajustado con HCl.
4. Someter a 5 ciclos de congelación-descongelación (37 °C y nitrógeno líquido) de 30 segundos por ciclo.
5. Conservar a -20 °C hasta su uso (se pueden conservar durante varios meses)
6. La concentración de proteínas se determina por el método de Lowry.

Obtención de antígeno de membrana de *E. coli* **

1. Crecer *E. coli* en XL-1 Blue en 50 ml de LB-maltosa MgSO₄ toda la noche a 37 °C
2. Centrifugar a 3,000 rpm por 10 minutos
3. Resuspender la pastilla en PBS en dilución 1/10 del volumen original
4. Sonicar 5 veces durante 30 segundos, con intervalos de 1 minuto, en hielo
5. Centrifugar a 3,000 rpm por 10 minutos a 4 °C
6. Resuspender la pastilla en PBS 1x al mismo volumen.
7. La concentración de proteínas se determinó por el método de Lowry.

Obtención de antígeno total de *T. cruzi****

1. Cultivar los epimastigotes en medio LIT (base de peptona y extracto de hígado)
2. Cosechar los parásitos de su medio de cultivo mediante lavados con PBS, pH 7.2 a 1,500 rpm durante 15 minutos. En la última lavada la pastilla se coloca en una solución de glicina-HCl 0.1 M, a pH de 2.0
3. Someter a 5 ciclos de congelación-descongelación (37 °C y nitrógeno líquido) de 30 segundos por ciclo.
4. Conservar a -20 °C hasta su uso (se pueden conservar durante varios meses)
5. La concentración de proteínas se determina por el método de Lowry.

Obtención de antígeno total de *G. lamblia****

1. Cultivar los trofozoitos en medio TYI-S-33 (base de tripticasa y bilis bovina)
2. Cosechar los parásitos de su medio de cultivo mediante 3 lavados en PBS pH 7.2 a 1,000 rpm durante 10 min. En la última lavada la pastilla se coloca en una solución de glicina-HCl 0.1 M, a pH de 2.0
3. Someter a 5 ciclos de congelación - descongelación (37 °C y nitrógeno líquido) de 30 segundos por ciclo.
4. Conservar a -20 °C hasta su uso (se pueden conservar durante varios meses)
5. La concentración de proteínas se determina por el método de Lowry.

Técnica de purificación de anticuerpos α -GK-1****

1. Agregar a un volumen de líquido de ascitis 4 volúmenes de solución salina 0.15 M
2. Agregar 5 volúmenes de solución saturada de sulfato de amonio gota a gota bajo agitación constante a 4 °C, durante 1 o 2 horas
3. Centrifugar a 1,500 rpm durante 20 o 30 minutos a 4 °C

* Amablemente donado por Julio César Carrero

** Amablemente donado por Maricela Hernández

*** Amablemente donado por José Antonio Ramírez

**** Amablemente donado por José Antonio Ramírez

***** Amablemente donados por Gemma García

4. Conservar el sobrenadante en un tubo graduado a 4 °C como medida de seguridad hasta que la precipitación del anticuerpo haya sido confirmada
5. Resuspender el precipitado con la menor cantidad posible de solución salina (por lo menos la mitad del volumen original)
6. Dializar en un volumen considerable de solución salina 0.15 M con 2 cambios por día durante una semana.
7. Revisar diariamente la presencia de sulfato de amonio de la solución salina del dializado tomando una alicuota y añadiendo unas gotas de HCl 1 M seguidas de unas gotas de BaCl₂ al 2%; si el sulfato de amonio se encuentra aún presente se formará un precipitado turbio.
8. Remover el anticuerpo del tubo de diálisis y centrifugar a 1,500 g durante 30 minutos a 4 °C.
9. Revisar el contenido de proteínas con por lo menos dos diferentes diluciones y dos replicas para cada muestra. Las diluciones sugeridas son 1:10 y 1:50.
10. Leer en el espectrofotómetro a 280 nm.
11. La fórmula a seguir es 1 mg/ml de proteína es igual a 1.460/1 cm en *light path*.
12. Si la concentración de proteína obtenida es de más de 5 mg/ml, diluir la solución a esta concentración con solución salina.
13. Filtrar y esterilizar el anticuerpo con un filtro millipore de 0.22 micras y guardar a -70 °C en viales graduados.

Reactividad de péptidos con sus anticuerpos específicos

Materiales

- Suero α -péptido sintético o anticuerpos purificados del mismo
- Bicarbonato de sodio (NaHCO₃)
- Agua bidestilada
- Hidróxido de sodio (NaOH)
- Péptido sintético
- Fosfato de sodio monobásico (NaH₂PO₄)
- Tween 20
- Paranitrofenilfosfato (p-NPP)
- Anticuerpo α -IgG acoplado a fosfatasa
- Cloruro de magnesio hexahidratado (MgCl₂·6H₂O)
- Carbonato de sodio (Na₂CO₃)
- Ácido clorhídrico (HCl)
- Dietanolamina
- Azida de sodio (NaN₃)
- Fosfato de sodio dibásico (Na₂HPO₄)
- Albúmina sérica bovina (BSA)
- Cloruro de sodio (NaCl)

Reactivos

- Preparar reactivos según la técnica de ELISA

Protocolo

1. Sensibilizar la placa de ELISA con 10 μ g/pozo del péptido sintético en amortiguador de carbonatos. Incubar a temperatura ambiente toda la noche.
2. Preparar varios tubos con distintas concentraciones molares del péptido sintético en PBS-BSA al 1%, cada una con la misma cantidad de suero o de anticuerpo purificado. En cada tubo debe haber líquido suficiente para llenar al menos dos pozos de la placa de ELISA. Estos tubos se preparan el mismo día que se sensibiliza la placa y se dejan incubar a 4 °C, toda la noche.
3. Se sigue el protocolo de la técnica de ELISA

Resultados

Con el propósito de conocer algunas de las características del antígeno recombinante KETc7 se utilizaron dos estrategias: una experimental y una teórica

Debido a que no se dispone del antígeno recombinante KETc7, para comenzar a estudiar algunas de sus características, se utilizaron dos péptidos sintéticos, el péptido GK-1 y el péptido GK-2, que corresponden a regiones altamente inmunogénicas de KETc7. Si bien, las secuencias de ambos péptidos corresponden a epítomos reconocidos por anticuerpos específicos contra los cisticercos, el péptido GK-1 ha sido identificado como un epítomo capaz de proteger del 40 al 70% de los ratones infectados. Mientras tanto, al péptido GK-2 no se le ha detectado capacidad protectora (Toledo *et al.*, artículo remitido para su publicación).

Reconocimiento de diferentes antígenos por anticuerpos de ratones parasitados con cisticercos de *T. crassiceps*

Un aspecto muy interesante es el conocer si éstos péptidos son exclusivos de cisticercos y de tenias.

Se realizó un experimento control para determinar si los anticuerpos (IgG o IgM) presentes en sueros de ratones no infectados o infectados con *T. crassiceps* son capaces de reconocer los antígenos de *Trypanosoma cruzi*, *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica*, *Escherichia coli*, cisticercos de *T. crassiceps* y cisticercos de *T. solium*. Se utilizaron sueros de ratones sanos (controles) y parasitados con cisticercos de *T. crassiceps* y se determinó la presencia de anticuerpos por medio de la técnica de ELISA. Los ratones utilizados pertenecen a la cepa BALB/cAnN. La dilución del suero fue de 1:50.

En la Tabla II y en la Figura 6 se puede observar que los anticuerpos IgG de ratones parasitados, reconocen antígenos de cisticercos de *T. crassiceps* y cisticercos de *T. solium* y en menos extensión a los antígenos de *E. coli*.

Se encontró una reactividad diferente cuando se determinaron los niveles de anticuerpos de clase IgM. Los datos de la Tabla III y la Figura 7, muestran que los anticuerpos IgM reconocen antígenos de *G. lamblia*, *E. histolytica* y *E. coli*, mas no a los demás antígenos, incluso a los del cisticercos.

Tabla II. Reactividad de anticuerpos IgG de ratones parasitados con cisticercos de *T. crassiceps* con antígenos obtenidos de diferentes parásitos. Se muestran en negritas los valores que mostraron una diferencia significativa en una prueba t de Student con 95% de confianza (*).

Parásito	Suero de ratón normal	Suero de ratón parasitado
<i>T. cruzi</i>	0.112 ± 0.0099	0.088 ± 0.0240
<i>G. lamblia</i>	0.204 ± 0.0028	0.106 ± 0.0021
<i>E. histolytica</i>	0.093 ± 0.0007	0.135 ± 0.0099
<i>E. coli</i>	0.221 ± 0.0198	0.304* ± 0.0283
<i>T. crassiceps</i>	0.106 ± 0.0035	0.940* ± 0.0728
<i>T. solium</i>	0.138 ± 0.0014	0.896* ± 0.0403

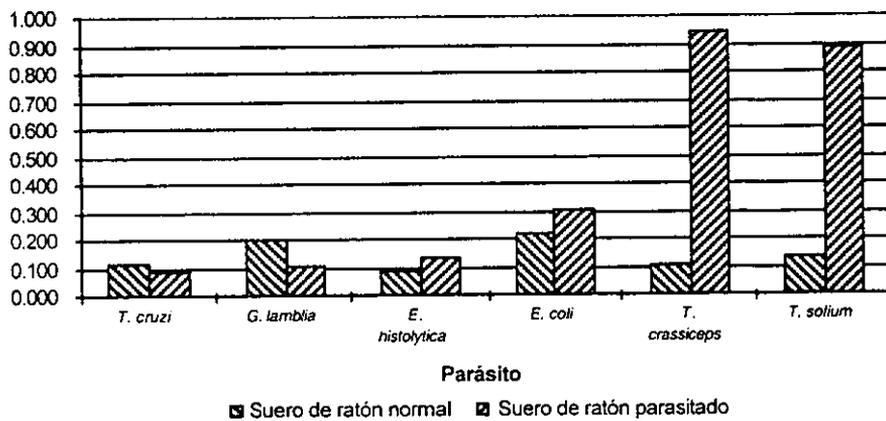


Figura 6. Se muestran los valores correspondientes al promedio de dos densidades ópticas obtenidas en un ensayo de ELISA que representan anticuerpos IgG de ratones parasitados con cisticercos de *T. crassiceps*, reconocidos por diferentes parásitos. Los anticuerpos IgG de ratones parasitados reconocen antígenos de *E. coli*, *T. crassiceps* y *T. solium*, mas no a los demás antígenos.

Tabla III. Anticuerpos IgM de ratones parasitados con cisticercos de *T. crassiceps* reconocidos por diferentes parásitos. Se muestran en negritas los valores que mostraron una diferencia significativa en una prueba t de Student con 95% (*) y 99% (**) de confianza.

Parásito	Suero de ratón normal	Suero de ratón parasitado
<i>T. cruzi</i>	0.039 ± 0.0078	0.056 ± 0.0014
<i>G. lamblia</i>	0.110 ± 0.0057	0.245* ± 0.0078
<i>E. histolytica</i>	0.135 ± 0.0028	0.300* ± 0.0226
<i>E. coli</i>	0.042 ± 0.0021	0.118** ± 0.0035
<i>T. crassiceps</i>	0.042 ± 0.0156	0.050 ± 0.0000
<i>T. solium</i>	0.040 ± 0.0007	0.045 ± 0.0021

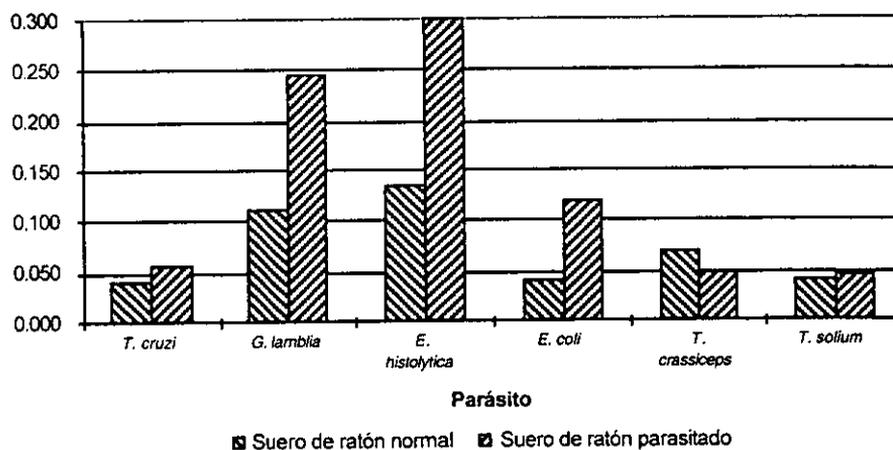


Figura 7. Se muestran los valores correspondientes al promedio de dos densidades ópticas obtenidas en un ensayo de ELISA que representan anticuerpos IgM de ratón parasitado con cisticercos de *T. crassiceps* reconocidos por diferentes parásitos. Los anticuerpos IgM son reconocidos por *G. lamblia*, *E. histolytica* y *E. coli*, mas no por los demás antígenos.

Los datos obtenidos nos indican que los ratones infectados con cisticercos de *Taenia crassiceps* reconocen los antígenos de cisticercos con anticuerpos de clase IgG.

Reconocimiento de diferentes antígenos por anticuerpos de conejo inmunizado con el péptido sintético GK-1

Con el propósito de saber si el péptido GK-1 es exclusivo de los cisticercos o si se presenta en otros parásitos, se determinó su presencia en antígenos provenientes de diferentes parásitos mediante el uso de un anticuerpo policlonal α -GK-1, obtenido en un conejo inmunizado con el péptido GK-1. El suero preinmune pertenece al mismo conejo.

Las densidades ópticas, para una dilución de suero de 1:50, que se presentan en la Tabla IV son proporcionales a la cantidad de IgG reconocidas por los diferentes antígenos. Los anticuerpos del conejo inmunizado reconocen a todos los antígenos, lo cual indica que el péptido GK-1 es compartido por todos los parásitos probados (Figura 8).

Tabla IV. Anticuerpos IgG de conejo inmunizado con el péptido GK-1 reconocidos por diferentes antígenos. Se muestran en negritas los valores que mostraron una diferencia significativa en una prueba t de Student con 95% (*) y 99% () de confianza.**

Parásito	Suero preinmune GK-1	Suero inmune α -GK-1
<i>T. cruzi</i>	0.113 \pm 0.0099	2.696** \pm 0.0495
<i>G. lamblia</i>	0.104 \pm 0.0028	0.877* \pm 0.0750
<i>E. histolytica</i>	0.353 \pm 0.0014	1.843** \pm 0.0587
<i>E. coli</i>	0.130 \pm 0.0198	2.639** \pm 0.1252
<i>T. crassiceps</i>	0.314 \pm 0.0028	1.469** \pm 0.0255
<i>T. solium</i>	0.193 \pm 0.0014	1.262** \pm 0.0184

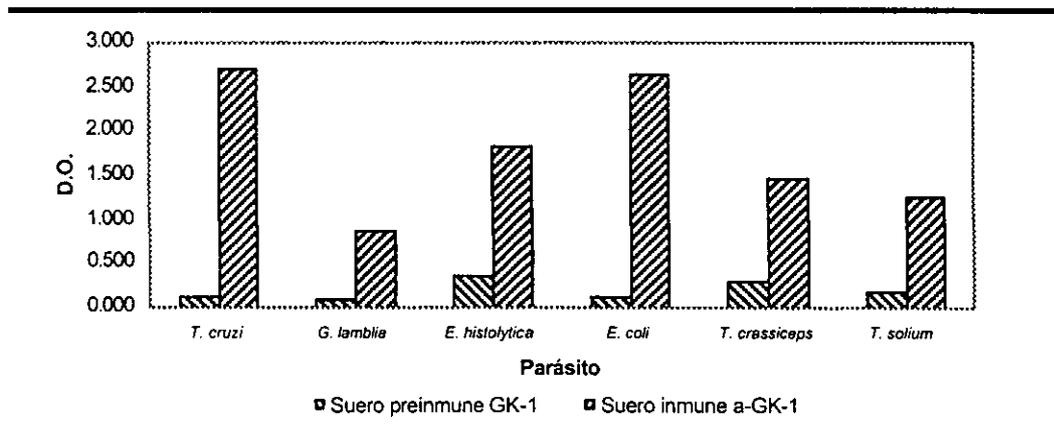


Figura 8. Anticuerpos IgG de conejo inmunizado con el péptido GK-1 reconocidos por diferentes antígenos. Se muestran los valores correspondientes al promedio de dos densidades ópticas obtenidas en un ensayo de ELISA, realizado entre los diferentes antígenos y el suero de conejo preinmune e inmune. Los anticuerpos del conejo inmunizado reconocen a todos los antígenos, esto señala que el péptido GK-1 es compartido por todos los parásitos cuyos antígenos se probaron.

Reconocimiento de diferentes antígenos mediante anticuerpos de conejos inmunizados con los péptidos sintéticos GK-1 o GK-2

Se realizó un experimento adicional para evaluar el reconocimiento de anticuerpos α -GK-1 y α -GK-2 de un conjunto de antígenos de diferentes parásitos. Se decidió incluir además de los antígenos de diferentes parásitos, un extracto de células de ganglio de ratones normales para determinar si el péptido GK-1 se expresaba en tejidos del ratón (Tabla V). Los sueros problema fueron obtenidos de dos conejos inmunizados con los péptidos GK-1 y GK-2, respectivamente. El suero preinmune pertenece a los mismos conejos.

Las densidades ópticas que representan la cantidad de IgG reconocidas por los diferentes antígenos, para una dilución de suero de 1:200, se muestran en la Tabla V y en la Figura 9 y Figura 10

Los anticuerpos del conejo inmunizado con el péptido GK-1 reconocen claramente antígenos de *G. Lamblia*, *E. histolytica*, *E. coli*, cisticercos de *T. crassiceps* y cisticercos de *T. solium*. Los anticuerpos del conejo inmunizado con el péptido GK-2 reconocieron a los mismos antígenos reconocidos por los anticuerpos α -GK-1, y al péptido GK-2.

Esto señala que los péptidos GK-1 y GK-2 son epitopos compartidos por los diferentes parásitos y que no se encuentran en el ganglio del ratón.

Tabla V. Reactividad de sueros policlonales inmunes (α -GK-1 y α -GK-2) clase IgG de conejo en contra de diferentes antígenos. Se muestran en negritas los valores que mostraron una diferencia significativa en una prueba t de Student con 95% (*) y 99% (**) de confianza.

Antígeno	Sin suero	Suero GK-1 preinmune	Suero α -GK-1 inmune	Suero GK-2 preinmune	Suero α -GK-2 inmune
Sin antígeno		0.105 ± 0.0049	0.203 ± 0.0240	0.089 ± 0.0240	0.087 ± 0.0240
<i>T. cruzi</i>	0.042 ± 0.0000	0.103 ± 0.0042	0.249 ± 0.0580	0.095 ± 0.0580	0.090 ± 0.0580
<i>G. lamblia</i>	0.044 ± 0.0007	0.104 ± 0.0014	0.240** ± 0.0064	0.077 ± 0.0064	0.101* ± 0.0064
<i>E. histolytica</i>	0.049 ± 0.0049	0.353 ± 0.0396	0.730** ± 0.0163	0.152 ± 0.0163	0.252** ± 0.0163
<i>E. coli</i>	0.044 ± 0.0007	0.130 ± 0.0148	2.106** ± 0.0629	0.328 ± 0.0629	0.435* ± 0.0629
Ganglio de ratón	0.043 ± 0.0014	0.082 ± 0.0042	0.120 ± 0.0042	0.067 ± 0.0042	0.078 ± 0.0042
<i>T. crassiceps</i>	0.042 ± 0.0014	0.314 ± 0.0057	0.740** ± 0.0028	0.138 ± 0.0028	0.288** ± 0.0028
<i>T. solium</i>	0.042 ± 0.0028	0.193 ± 0.0064	0.463** ± 0.0233	0.105 ± 0.0233	0.264** ± 0.0233
GK-2	0.047 ± 0.0014	0.091 ± 0.0021	0.171 ± 0.0085	0.091 ± 0.0085	0.218** ± 0.0085

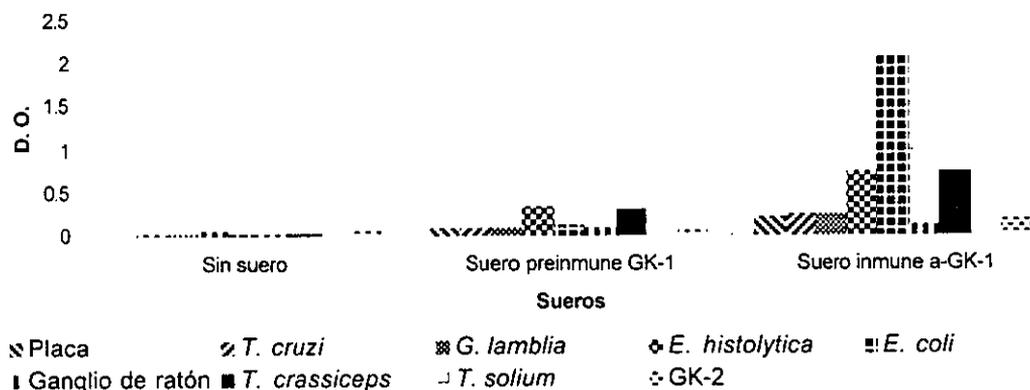


Figura 9. La reactividad del suero inmune policlonal α -GK-1 clase IgG de conejo reconocieron a todos los antígenos, a excepción de *T. cruzi*, ganglio de ratón y GK-2.

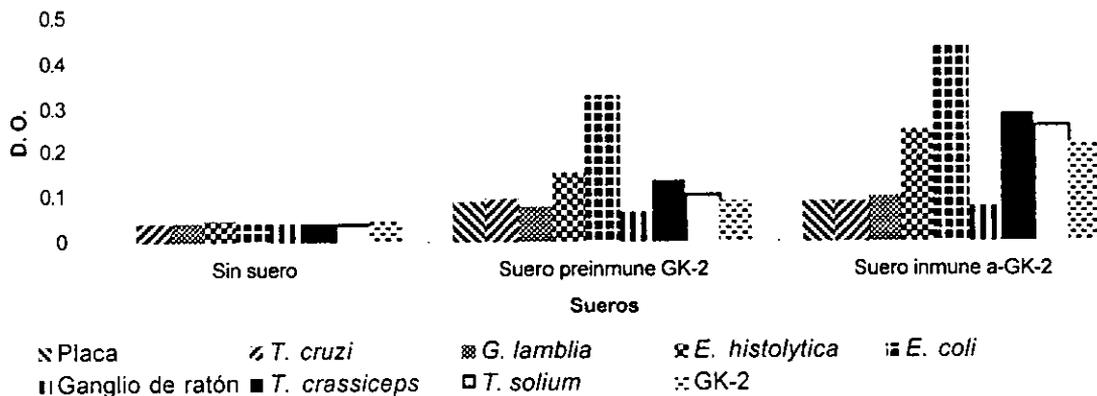


Figura 10. Los anticuerpos del conejo inmunizado con GK-2 reconocieron a todos los antígenos a excepción de *T. cruzi* y *G. lamblia*

Reactividad del péptido GK-1 con anticuerpos contra las diferentes etapas de desarrollo de *T. crassiceps* y *T. solium*

Como parte de la caracterización del antígeno KETc7 en el parásito, se evaluó la reactividad de los anticuerpos que se generaron inmunizando con antígenos obtenidos de los diferentes compartimientos de cisticercos de *T. crassiceps* y *T. solium*, con el péptido GK-1. Se realizó un ensayo de ELISA con placas sensibilizadas con GK-1. La dilución de los sueros fue de 1:200. Los resultados se muestran en la Tabla VI y en la Figura 11.

Se realizaron distintos análisis de varianza (ANOVA) con estos datos y se obtuvieron los siguientes resultados, cuyas tablas se encuentran en el apéndice 2:

- Existe diferencia en la cantidad del péptido GK-1 hallada, entre los grupos; fue mayor en el suero de ratones parasitados.
- Existe diferencia en la cantidad del péptido GK-1 hallada, entre las membranas; la mayor se encontró en *T. solium*.
- No existe diferencia en la cantidad del péptido GK-1 hallada entre los fluidos vesiculares.
- No existe diferencia en la cantidad del péptido GK-1 hallada entre los compartimientos de *T. solium*.

- Existe diferencia en la cantidad del péptido GK-1 hallada entre los compartimientos de *T. crassiceps*; fue mayor en el fluido vesicular.

Tabla VI. Reactividad de anticuerpos generados en contra de los diferentes compartimientos de *Taenia crassiceps* y *Taenia solium*, con el péptido GK-1. Se muestran en negritas los valores significativos para $p=0.95$ (*).

Grupos	n	Promedio	Varianza
Ratones parasitados	6	0.9975*	0.0283
Ratones normales	6	0.0773	7×10^{-05}
α -Escólex de <i>T. solium</i>	12	0.2641*	0.0039
α -Fluido vesicular de <i>T. solium</i>	26	0.2585*	0.0086
α -Membrana de <i>T. solium</i>	14	0.3147*	0.0057
α -Fluido vesicular de <i>T. crassiceps</i>	28	0.2861*	0.0040
α -Membrana de <i>T. crassiceps</i>	18	0.2097*	0.0035

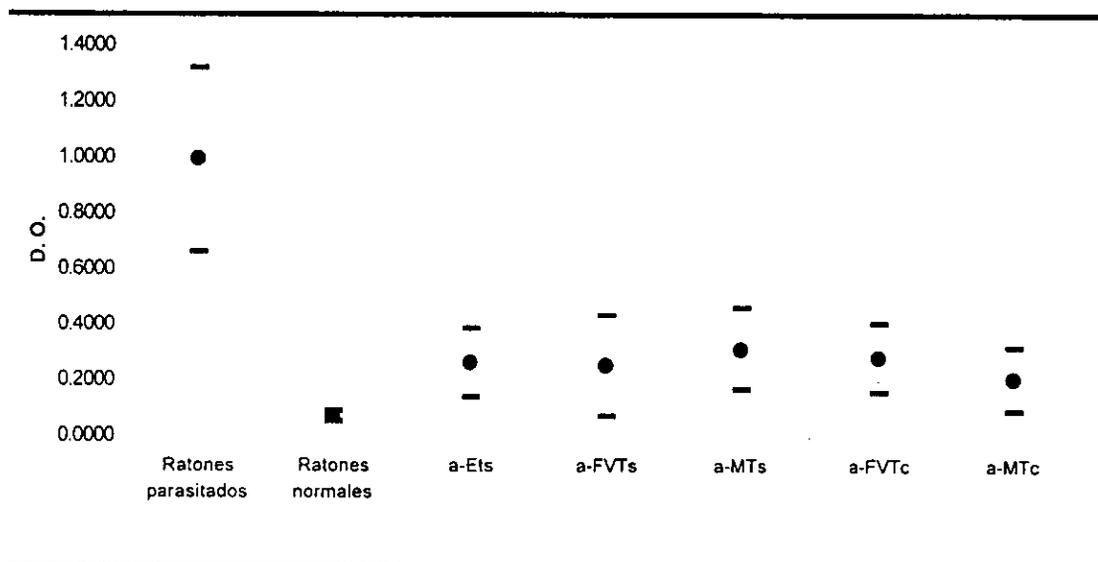


Figura 11. El péptido GK-1 se encuentra en todos los compartimientos de los cisticercos estudiados y es también reconocido por el suero de ratones parasitados.

Para determinar si el péptido GK-1 se encuentra en los diferentes estados del desarrollo de *T. solium* se utilizaron homogeneizados de cuatro diferentes tenias (T1, T2, T3, y T4) y homogeneizados de huevos de dos diferentes tenias (T3 y T4). Las mismas condiciones del experimento anterior se utilizaron en este experimento. Los resultados de la Figura 12 muestran que el epitopo GK-1 se encuentra tanto en huevos como en tenias. Se observaron diferencias en la cantidad de péptido GK-1 presente en huevos de diferentes tenias.

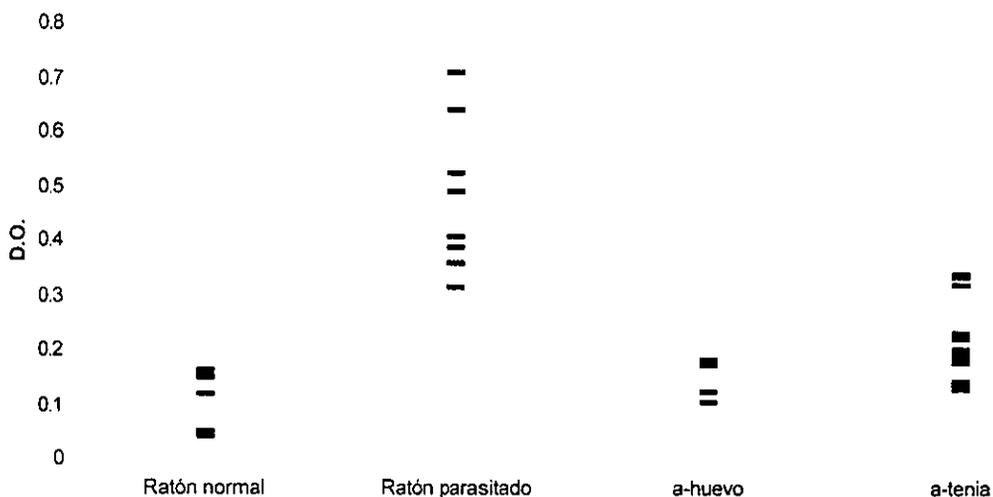


Figura 12. Reactividad de anticuerpos de *T. solium* (huevo y adulto) con GK-1.

Análisis de la reactividad de los anticuerpos α -GK-1 con antígenos de *E. histolytica* y de cisticercos de *T. crassiceps*

Con el propósito de determinar la especificidad del reconocimiento de los anticuerpos α -GK-1 de antígenos de cisticercos y de *E. histolytica* se decidió utilizar un ensayo de competencia, basado en curvas de inhibición usando la técnica de ELISA (Reyna, 1995). Este método permite obtener la constante de afinidad directamente de la curva de inhibición, sin necesidad de cálculos matemáticos posteriores (Arroyo, 1998).

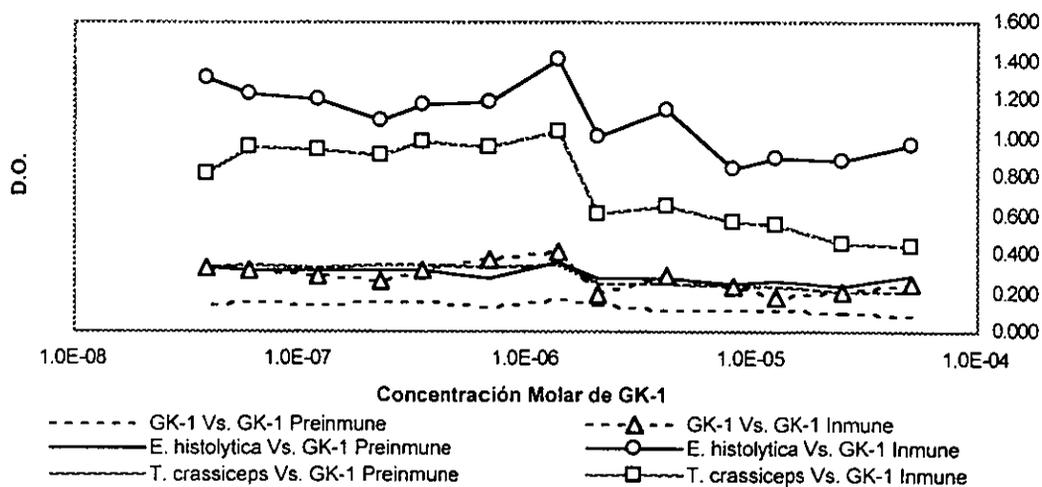


Figura 13. Fijación de anticuerpos α -GK-1 contra el péptido GK-1, *E. histolytica* y *T. crassiceps*. En esta figura se observa que los anticuerpos α -GK-1 reconocen los diferentes antígenos utilizados. Además, se aprecian dos posibles poblaciones de anticuerpos con diferente afinidad.

Se analizó la capacidad de diferentes concentraciones solubles de GK-1 (10^{-04} a 10^{-12} M) de inhibir la asociación de los respectivos antígenos unidos a la placa con el anticuerpo α -GK-1.

El suero α -GK-1 es el mismo que se utilizó en los experimentos anteriores en dilución 1/50.

Los resultados obtenidos en este primer experimento (Figura 13) muestran que la presencia de GK-1 soluble es capaz de inhibir la fijación de los anticuerpos α -GK-1 a GK1, a los antígenos de cisticercos y a los antígenos de *E. histolytica*, lo cual indica la especificidad de la reacción. Con el propósito de poder caracterizar las poblaciones de anticuerpos en cuanto a su afinidad se hicieron las siguientes curvas de inhibición.

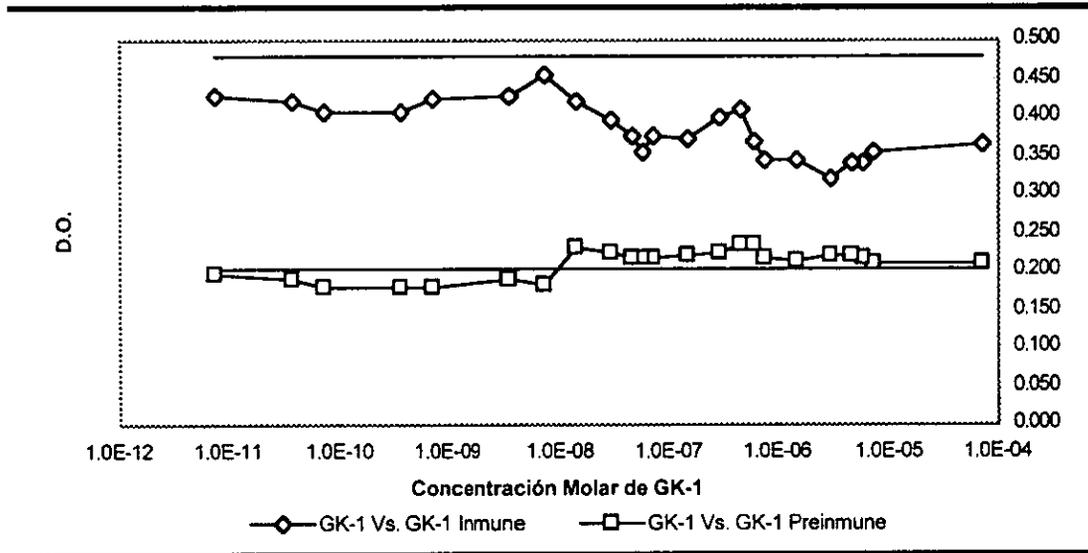


Figura 14. Curva de inhibición del péptido GK-1 contra si mismo utilizando suero α -GK-1. Las líneas horizontales indican el punto en el que no se puso GK-1 en el suero, es decir es el pegado máximo.

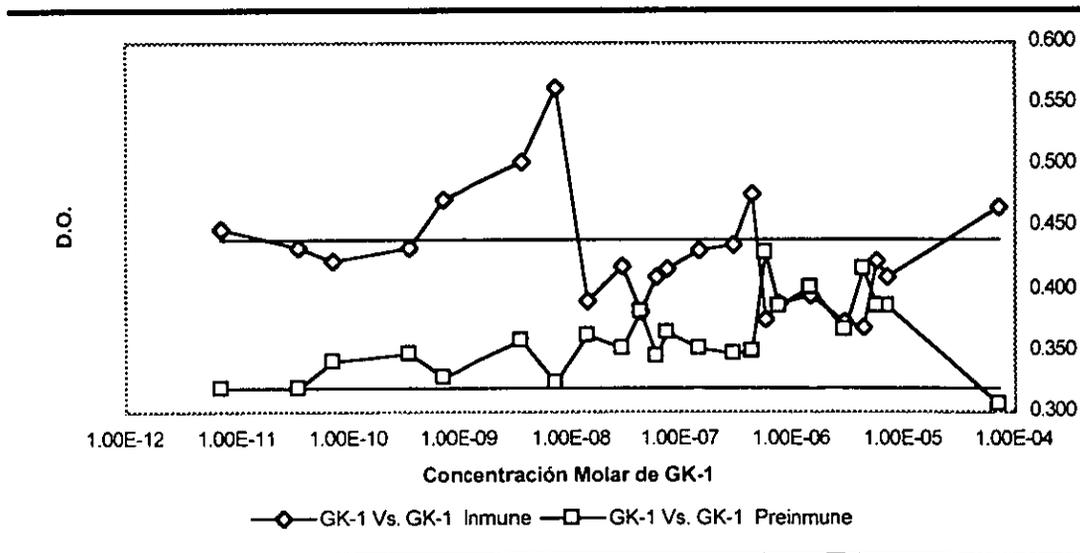


Figura 15. Curva de Inhibición del péptido GK-1 contra si mismo utilizando anticuerpos α -GK-1 purificados. Las líneas horizontales indican el punto en el que no se puso GK-1 en el suero, es decir es el pegado máximo.

La curva de inhibición de la Figura 14 se realizó según el protocolo. Los sueros problema fueron los que se utilizaron en el experimento anterior. Se pueden observar dos picos: uno, que se encuentran entre las concentraciones de 1×10^{-9} M y 1×10^{-8} M y otro entre 1×10^{-7} M y 1×10^{-6} M. Este resultado fue confirmado con 3 experimentos independientes.

Se repitió el experimento anterior, bajo las mismas condiciones, sólo que se utilizaron anticuerpos purificados del suero α -GK-1 (Figura 15). En esta figura se observa un perfil de inhibición similar al obtenido con los anticuerpos en el suero sin purificar. Como puede observarse, en esta curva de inhibición aparecen dos pendientes que podrían ser compatibles con dos poblaciones de anticuerpos de diferentes afinidades.

Reconocimiento del péptido GK-1 por cepas resistentes y susceptibles en infección temprana y tardía

Con el objeto de saber si el péptido GK-1 es reconocido diferencialmente por ratones resistentes o susceptibles a la cisticercosis, de las cepas C57Bl/6J y BALB/cAnN respectivamente, en distintas etapas de la infección. Se determinó el reconocimiento del péptido GK-1, después de 10 y 90 días de la infección y los resultados se muestran en la Figura 16.

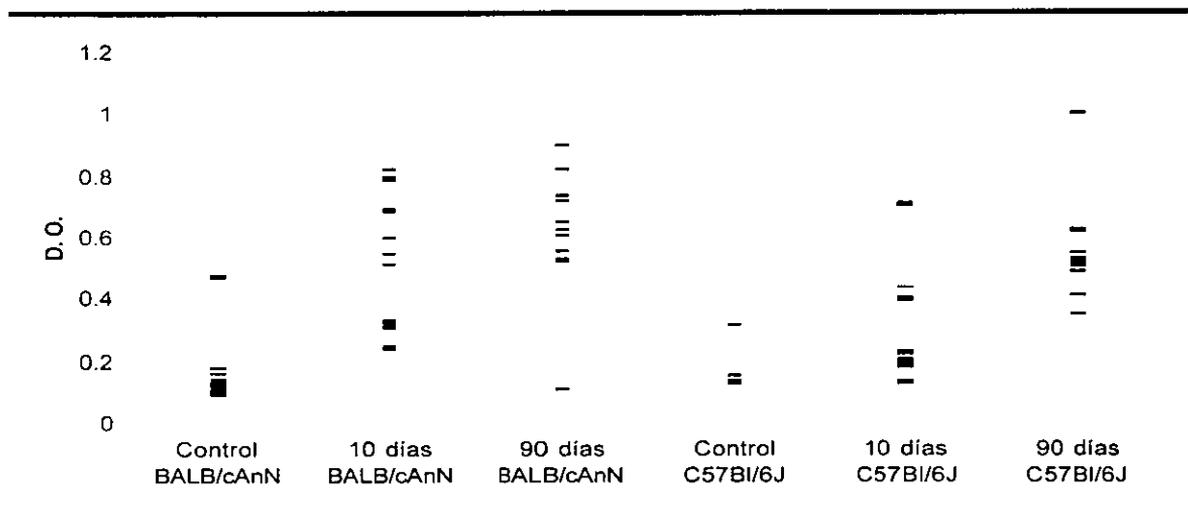


Figura 16. Niveles de anticuerpos α -GK-1 en ratones 10 y 90 días después de ser infectados.

Para determinar estadísticamente si existe una diferencia entre cepas y entre días de infección se realizó un análisis de varianza de dos factores cuyos resultados se muestran en el apéndice.

Los resultados indican que la cepa BALB/cAnN (susceptible) presenta mayores niveles de anticuerpos que la cepa C57Bl/6J (resistente). La mayor producción de anticuerpos α -GK-1 en la cepa C57Bl/6J se obtiene en etapas tardías de la infección, mientras que en la cepa BALB/cAnN la cantidad de anticuerpos es alta desde los 10 días y ya no se incrementa conforme avanza la infección.

Resultados con base en el análisis de secuencia del antígeno KETc7

Con el propósito de ahondar en el conocimiento de las características del antígeno recombinante KETc7 se realizó un análisis de secuencia que permitió identificar las proteínas más relacionadas con éste. Para considerar a KETc7 como miembro de una familia de proteínas, en términos generales, debe ser similar en más de la mitad de sus posiciones de aminoácidos y ser homóloga en varias especies o bien producto de una duplicación de un gen (Dayhoff, 1969). El programa que se utilizó con esta finalidad es el denominado

“BLAST” (*Basic Local Alignment Search Tool*), cuya función es precisamente comparar una secuencia problema (en este caso los 100 aminoácidos de KETc7), con las secuencias de distintas bases de datos para encontrar homologías (Doolittle, 1990).

Se realizó un BLAST utilizando todas las bases de datos que permite el programa y el resultado se muestra en la Tabla VII, donde se muestran, en orden de homología (de mayor a menor), las proteínas más parecidas a KETc7. Para poder considerar que las proteínas pertenecen a una misma familia, el valor de probabilidad debe ser muy cercano a cero.

Tabla VII BLAST de KETc7

Secuencias que produjeron las puntuaciones (PO) más altas al aparear los segmentos:		PO	Menor Suma de Probabilidad P(N)	N
gp:TCU30899_1	Antígeno recombinante protector de [<i>Taenia cra.</i> ..	581	4.5e-75	1
gp:TCU31524_1	Antígeno recombinante protector de [<i>Taenia cra.</i> ..	574	4.1e-74	1
sp:EXTN_TOBAC	Precursor de Extensina (HPRP de pared celular..	110	8.2e-15	2
gp:HUMTRFAA_1	Factor de transcripción ZFM1 [<i>Homo sapiens</i>]	89	2.3e-13	3
prf:2202162A	Gen DRPLA - <i>Homo sapiens</i> (hombre) gp:HUMDRPL..	62	3.6e-13	5
pir:S50832	Proteína DRPLA - humana	62	3.6e-13	5
gp:HSU23851_1	Atropina-1 [<i>Homo sapiens</i>]	62	3.6e-13	5
gp:HUMDRPLA1_1	Producto genético DRPLA [<i>Homo sapiens</i>]	62	3.6e-13	5
gp:HSU47924_13	DRPLA [<i>Homo sapiens</i>]>gpu:HSU47924_13 DRPLA...	62	3.7e-13	5
gp:HSSF1H1_1	Isoforma SF1-H11 [<i>Homo sapiens</i>]>gpu:HSSF1H1...	87	4.3e-13	3
gp:HUMZFM1A_1	Proteína ZFM1 [<i>Homo sapiens</i>]	80	1.2e-12	4
prf:2007304A	Gen ZFM1 - <i>Homo sapiens</i> (hombre)	80	1.2e-12	4
gp:D87744_1	Proteína DRPLA [<i>Mus musculus</i>]	58	4.1e-11	5
prf:2119277A	Gen rdrpla - <i>Rattus norvegicus</i> (Noruega ra...	73	5.8e-11	4
gp:RNU31777_1	Atropina-1 [<i>Rattus norvegicus</i>]	70	1.4e-10	4
gp:GMU44838_1	Extensina [<i>Glycine max</i>]	131	2.2e-10	1
sp:EXTN_DAUCA	Precursor de extensina.>pir:A24354 extensin..	127	8.6e-10	1
gp:D86854_1	Extensina [<i>Catharanthus roseus</i>]	114	2.4e-09	2
sp:ICP4_HSV11	Proteína transcripcional trans-activadora ICP4	53	2.4e-09	5
prf:2008314A	Extensina - <i>Glycine max</i> (soya)>gp:SOYHRG...	123	2.9e-09	1
sp:TEGU_EBV	Proteína grande de tegumento.>pir:QQBE8 BPLF1.	72	3.3e-09	4
gp:HSSF1BO_1	Isoforma SF1-Bo [<i>Homo sapiens</i>]	80	1.2e-08	4
pir:C29356	Glicoproteína rica en hidroxiprolina(clona Hy.	119	1.6e-08	1
prf:1314246A	Glicoproteína rica en Hyp Hyp2.13- <i>Phaseolus</i> ...	119	1.6e-08	1
gp:CELR144_4	Producto genético R144.4[<i>Caenorhabditis elegans</i>]	75	3.4e-08	4
pir:S20790	Extensina - almendra>prf:1909363* extens...	79	6.0e-08	2
pir:PQ0479	Proteína tipo extensina de pistilo(clone pMG14)	115	6.6e-08	1
gp:NTPMG14_1	Proteína tipo extensina de pistilo [<i>Nicotiana</i> ..	115	6.6e-08	1
pir:S22697	Extensina - <i>Volvox carteri</i> (fragmento)	115	6.8e-08	1
prf:1812216A	Glicoproteína específica de inversión(extensina).	115	6.8e-08	1
pir:S54156	Proteína tipo extensina - frijol (fragmento)	114	7.9e-08	1
gp:VURNAEXT3_1	Proteína tipo extensina[<i>Vigna unguiculata</i>]>...	114	7.9e-08	1

Al conocer las características de las proteínas que se encuentran en la Tabla VII, se pudo observar que varias secuencias reportadas en las bases de BLAST son muy parecidas o idénticas entre sí, de modo que se agruparon para evitar repeticiones (Tabla VIII y Tabla IX).

En ambas tablas se muestran algunas de las características más importantes de las secuencias y se pueden distinguir dos grupos las extensinas y las proteínas DRPLA, cuyas descripciones más extensas se incluyen en el apéndice I.

Tabla VIII Características de las proteínas del BLAST

Proteína	Organismo	Tipo	Referencia
KETc7	<i>Taenia crassiceps</i>	desconocido	Manoutcharian <i>et al.</i> , 1995
EXTN_TOBAC	<i>Nicotiana tabacum</i> (Tabaco común)	extensina	Keller <i>et al.</i> , 1989
GMU44838_1 2008314 A	<i>Glycine max</i> (Soya)	extensina	Hong <i>et al.</i> , 1994
EXTN DAUCA	<i>Daucus carota</i> (zanahoria)	extensina	Chen y Varner, 1985
D86854_1	<i>Catharanthus roseus</i>	extensina	no publicado
C29356 1314246 A	<i>Phaseolus vulgaris</i> (Frijol común)	extensina	Corbin <i>et al.</i> , 1987
S20790	<i>Prunus amygdalus</i> (Almendra)	extensina	no publicado
PQ0479 NTPMG14_1	<i>Nicotiana tabacum</i> (Tabaco común)	extensina	Goldman <i>et al.</i> , 1992
S22697 1812216A	<i>Volvox carteri</i>	extensina	Ertl <i>et al.</i> , 1992
S54156 VURNAEXT3_1	<i>Vigna unguolata</i> (Frijol)	extensina	Arsenijevic-Maksimovic <i>et al.</i> , 1997
2202162A gen S50832. proteína HSU23851_1. ARNm HUMDRPLA1_1. proteína	<i>Homo sapiens</i>	DRPLA	Onodera <i>et al.</i> , 1995 Nagafuchi <i>et al.</i> , 1994 Margolis <i>et al.</i> , 1996 Li <i>et al.</i> , 1993
HSU47924_13	<i>Homo sapiens</i>	receptor	Ansari-Lari <i>et al.</i> , 1996; y. Ansari-Lari <i>et al.</i> , 1997
D87744_1. ARNm 2119277A gen RNU31777_1. proteína	<i>Mus musculus</i> <i>Ratus norvegicus</i>	DRPLA	Oyake <i>et al.</i> , 1997
HUMTRFAA_1 HSSF1H1_1 HUMZFM1A_1 2007304A HSSF1B0_1	<i>Homo sapiens</i>	factor	no publicado Arning <i>et al.</i> , 1996 Toda <i>et al.</i> , 1994 Toda <i>et al.</i> , 1994 Arning <i>et al.</i> , 1996
ICP4_HSV11	Virus del herpes (tipo 1, cepa 17)	proteína multifuncional ICP4/IE140/IE180	McGeoch <i>et al.</i> , 1988; McGeoch <i>et al.</i> , 1986; Wu <i>et al.</i> , 1990; y, Papavassiliou <i>et al.</i> , 1991
TEGU_EBV	Virus del herpes (tipo 4, cepa B95-8)	proteína de tegumento HSV-1 UL36, EHV-1 24, EBV BPLF1, HVS-1 64, VZV 22, y HCMV UL48	Baer <i>et al.</i> , 1984
CELRI44_4	<i>Caenorhabditis. elegans</i>	cósmido R144	Wilson <i>et al.</i> , 1994

Tabla IX Características de las proteínas del BLAST

Proteína	Valor SSP ¹	Resumen
KETc7	4.5×10^{-75}	Antígeno recombinante protector de <i>Taenia crassiceps</i> , (KETc7) ARNm de un ADNc parcial
EXTN_TOBAC	8.2×10^{-13}	Precursor de extensina (proteína rica en hidroxiprolina de pared celular). Tiene una función estructural especializada, posiblemente en la penetración mecánica de la corteza y la epidermis de la raíz principal en el suelo. Se localiza en la Pared Celular (raíz lateral) contiene el pentapéptido repetido característico. SER-PRO(4). Los residuos de prolina están hidroxilados y posteriormente glicosilados
GMU44838_1	2.2×10^{-10}	Proteína rica en hidroxiprolina. Contiene motivos repetitivos: SP4KHSP4Y3H SP4VYKYKSP4YKYPSP5YKYPSP4VYKY. Su expresión se induce durante la maduración de la semilla, a causa de heridas o sacarosa.
2008314 A	2.9×10^{-9}	ADNc de extensina
EXTN_DAUCA	8.6×10^{-10}	Precursor de extensina. Componente estructural en la pared celular primaria. (matriz extracelular). Contiene el pentapéptido repetido característico. SER-PRO(4). Los residuos de prolina están hidroxilados y posteriormente glicosilados.
D86854_1	2.4×10^{-9}	ARNm para extensina. ADNc completario.
C29356	1.6×10^{-8}	Glicoproteína rica en hidroxiprolina. Se encuentra asociada al sistema de señales intracelulares causadas por estrés por infecciones o heridas.
1314246 A	1.6×10^{-8}	
S20790	6.0×10^{-8}	?
PQ0479	6.6×10^{-8}	Fragmentos de una clona de una proteína parecida a las extensinas, se encuentra en el pistilo y su función es desconocida.
NTPMG14_1	6.6×10^{-8}	
S22697	6.8×10^{-8}	Glicoproteína de la familia de las extensinas cuya función parece ser organizar la biogénesis de la matriz extracelular, <i>in vitro</i> . Contiene el pentapéptido repetido característico SER-PRO(4).
1812216A	6.8×10^{-8}	
S54156	7.9×10^{-8}	ARNm de una proteína parecida a las extensinas localizada en los pelos radiculares .
VURNAEXT3_1	7.9×10^{-8}	Su expresión específica está modulada por rhizobia.
2202162A gen	3.6×10^{-13}	Gen y proteína responsables del desorden DRPLA (dentatorubral and pallidolusian atrophy) enfermedad del sistema nervioso central o de Smith, causada por tripletes repetidos. Este desorden se caracteriza por la pérdida de neuronas en el núcleo dentado, rombo y globo pálido.
S50832. proteína	3.6×10^{-13}	Las características clínicas son epilepsia, demencia y ataxia cerebral, su aparición ocurre generalmente entre los 10 y los 20 años de edad y la muerte entre los 30 y 40 años.
HSU23851_1. ARNm	3.6×10^{-13}	La región de poli-GLN es altamente polimórfica. Los individuos normales presentan de 7 a 23 repeticiones, los pacientes de DRPLA presentan de 49 a 75. Las expansiones mayores resultan en una manifestación más temprana o más severa de la enfermedad.
HUMDRPLA1_1 . proteína	3.6×10^{-13}	Se localiza en cerebelo, corteza cerebral y cerebro. Es tejido específica, los niveles son relativamente altos en el cerebro, ovarios, testículos y próstata. Se detectan niveles más bajos en el hígado, timo y leucocitos.
D87744_1. ARNm	4.1×10^{-11}	Proteína DRPLA. Se encuentra en cerebelo, estriado, cerebro, hipocampo y sustancia negra. Es tejido específica.
2119277A gen	5.8×10^{-11}	
RNU31777_1. proteína	1.4×10^{-10}	

¹ Suma de probabilidades, reportada por BLAST

Tabla X (continuación) Características de las proteínas del BLAST

Proteína	Valor SSP	Resumen
HSU47924_13	3.7×10^{-13}	Secuencia completa del cromosoma 12p13. Función: correceptor de células T que participan en el reconocimiento de antígenos; así como en la ruta de transducción de señales. Receptor importante del HIV-1, miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas, produce el antígeno de superficie CD4.
HUMTRFAA_1	2.3×10^{-13}	Clona B4 de <i>Homo sapiens</i> factor de transcripción ZFM1. ZFM1 es una familia de proteínas de transducción de señal y activación de ARN.
HSSF1H1 1	4.3×10^{-13}	ARNm para factor de edición
HUMZFM1A 1	1.2×10^{-12}	ARNm para ZFM1
2007304A	1.2×10^{-12}	Gen ZFM1. Posee la señal de transporte nuclear PSKKRKRSR, un motivo de unión de metales CTKCGGAGHIASDC y una región rica en Glu/Pro.
HSSF1B0 1	1.2×10^{-8}	ARNm para factor de edición
ICP4_HSV11	2.4×10^{-9}	Secuencia completa de ADN del virus del herpes. Es una proteína multifuncional capaz de migrar al núcleo, unirse al ADN, <i>trans</i> -activar otros genes virales y autorregular su propia síntesis. Es un homodímero localizado en el núcleo de células infectadas. Su función es dependiente de la fosforilación.
TEGU EBV	3.3×10^{-9}	Proteína del tegumento
CELRI44 4	3.4×10^{-8}	Cósmido

Algunas de las secuencias repetidas que se encuentran en las extensinas, se presentan en el antígeno recombinante KETc7; como son SPPP y PPXYX (Tabla X).

Tabla X. Se muestran en negritas las secuencias repetidas que se encuentran en las extensinas.

A F M Q P H P S F S P P P V D Y L Y Q T N S P P P Y G G A V P P P Y A P N
P G P P P P Y T G A A S S M P 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

Este resultado nos indica que el antígeno recombinante KETc7 pertenece a esta familia.

Discusión

En este trabajo se realizaron un conjunto de experimentos y análisis de secuencia que permitieron comenzar a caracterizar y conocer las propiedades de un antígeno recombinante de cisticerco de *Taenia crassiceps*, denominado KETc7.

La detección de anticuerpos IgM producidos durante la infección con cisticercos de *Taenia crassiceps*, capaces de reconocer *E. histolytica*, *E. coli* y *G. lamblia*, que no reconocen antígenos del propio parásito, permite proponer que durante la cisticercosis murina por *Taenia crassiceps* se podría estar induciendo una activación policlonal. Aunque en el caso de la cisticercosis este fenómeno no ha sido reportado previamente, parece probable en especial considerando que el fenómeno de activación policlonal se ha observado en diferentes infecciones parasitarias (Ordoñez *et al.*, 1995; Umezawa *et al.*, 1996).

Dentro de las características del antígeno KETc7, destaca el alto contenido de prolina en su secuencia. En la literatura se reporta que las proteínas ricas en prolina tienen diversas funciones; entre ellas, se encuentra la capacidad de activar proteínas cinasas por medio de los dominios SH3 (Yu *et al.*, 1994). Algunos péptidos ricos en prolina, de sólo 10 aminoácidos, pueden servir como blancos para la unión de dominios SH3. Este tipo de interacciones promueven la activación de la cinasa de fosfatidilinositol-3, en respuesta al entrecruzamiento en la superficie linfocitaria de las IgMs (Alexandropoulos *et al.*, 1995). Con base en estas observaciones resulta probable que el parásito tenga componentes capaces de ser liberados e interactuar con las cinasas y activar policlionalmente a los linfocitos. Para evaluar esta posibilidad se requerirá realizar experimentos adicionales.

Como una estrategia para caracterizar al antígeno KETc7, se utilizaron dos regiones del mismo que corresponden a dos epítomos que son reconocidos por individuos infectados; uno capaz de inducir protección en contra de la cisticercosis murina (el péptido GK-1) y otro que no induce protección (el péptido GK-2). Resulta interesante la presencia del péptido GK-1, en distintos parásitos, en especial si se considera que este epítomo indujo niveles altos de protección contra cisticercosis murina (datos no publicados). Este resultado señala la importancia de estudiar este péptido en la protección contra otros parásitos. El péptido GK-2, a pesar de no ser un epítomo protector, presentó una reactividad muy parecida a la del péptido GK-1. Cabe señalar que los péptidos GK-1 y GK-2 no se encuentran en el ganglio del hospedero, lo cual indica que la respuesta inducida con su inmunización, no causa daño al mismo.

Con objeto de confirmar la presencia del péptido GK-1, previamente detectada en otros parásitos, se realizaron experimentos de inhibición de la fijación del anticuerpo al antígeno pegado a la placa, con concentraciones crecientes de péptido soluble. Al utilizar antígenos de cisticerco y antígenos de *E. histolytica* se obtuvieron las curvas de inhibición (Figura 13); que demuestran la especificidad de la fijación y confirman la presencia de este epítomo en *E. histolytica*. Con el propósito de estimar la afinidad de los anticuerpos se decidió hacer una curva de inhibición entre el anticuerpo α -GK-1 con el péptido GK-1 pegado a la placa y el soluble. En las curvas de inhibición (Figura 14 y Figura 15) pueden observarse dos picos: uno, que se encuentran entre las concentraciones de 1×10^{-9} M y 1×10^{-8} M y otro entre 1×10^{-7} M y 1×10^{-6} M, mismos que podrían ser compatibles con dos poblaciones de anticuerpos de diferentes afinidades. En este sentido, si bien en la literatura se han utilizado extensamente péptidos para estudiar distintos aspectos de la respuesta inmune que inducen (Salcedo *et al.*, 1991; Van Regenmortel, 1989), poco se ha explorado al respecto de la afinidad. Aunque parece razonable suponer que esta variable esté relacionada con la efectividad de los fenómenos inmunológicos esta área del conocimiento queda aún por explorar más profundamente.

Los experimentos realizados para determinar la localización del péptido GK-1 en el parásito, aportan evidencias de que este antígeno está presente en las diferentes etapas del desarrollo de *T. solium*. A nivel del cisticerco los resultados sugieren que se encuentra en las diferentes partes que lo constituyen. Sin embargo, se requiere confirmar este resultado con experimentos adicionales de inmunolocalización.

Con base en los resultados teóricos y en las características de las proteínas con las que KETc7 comparte homología, se puede afirmar que todas las proteínas pertenecientes a la familia de las extensinas están directamente relacionadas con: la estructura de la pared celular; los cambios en el desarrollo de la planta y los fenómenos que incluyen mecanismos de defensa. Existen varias proteínas tipo extensina que se han reportado en animales (erizo de mar) y algas; que también intervienen en situaciones tanto de crecimiento y diferenciación como en estados de estrés debidos a varios patógenos. Corbin *et al.* en 1987, caracterizaron

tres HPGP de pared celular (Tabla IX, C29356) inducidos por un inductor fúngico, por heridas o por infecciones. Estos autores encontraron que los transcritos se codifican en genes separados y en una o pocas copias en el genoma haploide. Las proteínas muestran diferentes patrones de acumulación según el tipo de estrés al que es sometida la planta. Estos resultados indican que las plantas poseen varias proteínas que se expresan ante distintos tipos de estrés y que varias de ellas son extensinas.

La forma en la que las extensinas permiten que la invasión de un parásito se detenga, posiblemente se debe a una producción de radicales activos de oxígeno que provocan el entrecruzamiento de las extensinas y forman una pared muy rígida. Estos procesos parecen ser dependientes tanto del pH como de la explosión oxidativa.

En los estudios con *Volvox* se observa la participación de una proteína parecida a las extensinas, cuya función está directamente relacionada con la inversión del embrión. El cisticerco posee una etapa de desarrollo en la cual tiene que evaginarse para liberar el escólex, ambos fenómenos del desarrollo necesitan un proceso de inversión, podría especularse que una proteína del tipo de la extensina esté relacionada con el proceso de evaginación del escólex. Con base en estas especulaciones podría tratarse de inhibir la organización del cisticerco con la presencia de anticuerpos α -extensinas como estrategia para la evaluar su posible papel en este proceso y de hecho utilizar los anticuerpos para interferir el ciclo de vida del parásito.

Al parecer, algunas bacterias pertenecientes al grupo de las rhizobia modulan la expresión de las extensinas en las plantas. Arsenijevic-Maksimovic *et al.* en 1997, aislaron tres proteínas tipo extensina de una biblioteca de ADNc de *Vigna unguilata*, (Tabla IX, VURNAEXT3_1) estos transcritos sólo se encontraron en los pelos radiculares. Cuando se incuban las raíces con rhizobia, los niveles de estos transcritos disminuyen. Además, los pelos radiculares se deforman, hecho que coincide con el primer cambio morfológico de una interacción entre las leguminosas y los rhizobia.

A pesar de que las extensinas se encuentren en la pared celular de las plantas, los mecanismos en los cuales participan, están relacionadas con la interfás planta - patógeno, huésped - parásito (Corbin *et al.*, 1987) y en el desarrollo de la planta.

Se han encontrado evidencias de un tipo de nemátodo que interactúa con una planta de tomate, en la que regula la producción de ciertas proteínas tipo extensinas que necesita para parasitar a la planta. Esto es una evidencia de que, en las interacciones huésped - parásito, éstos son capaces de regular la producción de proteínas del huésped en su beneficio.

Algunas de las secuencias repetidas que se encuentran en las extensinas, se presentan en el antígeno recombinante KETc7; como son SPPP y PPXYX (Tabla X).

Con base en las características reportadas para las extensinas, KETc7 podría participar en el desarrollo y en los mecanismos de defensa del propio parásito. Así, cuando se induce una respuesta α -KETc7, por vacunación, si el hospedero entra en contacto con el parásito, se produce una inhibición tanto del crecimiento como de la capacidad de defenderse del hospedero, lo cual aumentaría las probabilidades de este último para eliminarlo.

En este sentido, esta tesis muestra evidencias de que KETc7 se encuentra en diferentes estadios del desarrollo del parásito. Debe considerarse que la fase de tenia ocurre en un medio crítico. La localización de la proteína en esta fase del parásito podría permitirle tanto su crecimiento como su defensa de las condiciones ambientales características del medio en que se desarrolla. Los resultados obtenidos con la comparación de secuencias señalan la necesidad de realizar más experimentos para confirmar si KETc7 es una proteína parecida a las extensinas y profundizar en el conocimiento de la relación huésped - parásito.

Con base en estas consideraciones resulta de interés realizar la experimentación necesaria para confirmar que KETc7 es una extensina. Así, sería de necesario realizar diferentes experimentos *in vitro*, en que se pongan en contacto, tanto células de cisticercos como cisticercos completos, con anticuerpos α -KETc7 así como α -extensinas para observar su efecto en el desarrollo de los mismos. También sería interesante averiguar si la expresión de esta proteína se ve regulada por su interacción con el hospedero.

Existen muchos factores que intervienen en que un parásito pueda establecerse en el hospedero. Si se considera a la parasitosis como una interacción constante, entre dos organismos que compiten por un mismo ambiente, situación que se puede comparar con el efecto de las heridas que le causa un insecto a una planta, en que participan las extensinas como elementos de la respuesta al daño; en ambas interacciones, los participantes tienen que poner en juego un sistema de comunicación que haga posible establecer y mantener la condición de parasitismo. ¿Cuánto se sabe sobre el proceso de la coevolución de estas interacciones? ¿Se trata de interacciones genéticamente compatibles o incompatibles? ¿Se podría suponer que la proteína nativa

de la que se tiene un fragmento que se ha denominado KETc7, participe en algunos de los fenómenos que tienen lugar durante el desarrollo del cisticerco, pero que además, intervenga activamente en el proceso de defensa de este parásito? Como ocurre por lo general en la investigación científica, la realización de este trabajo originó más interrogantes de las que se tenían en un principio, por lo que será necesario realizar varios experimentos para tratar de contestar las nuevas preguntas y resolver las hipótesis correspondientes.

Conclusiones

Los péptidos GK-1 y GK-2 son epitopos compartidos por varios parásitos.

El péptido GK-1 se localiza en todas las fases de desarrollo de *T. solium* y en cisticercos de *T. crassiceps*.

Las curvas de competencia con el péptido GK-1 soluble y unido a la placa, al parecer, son compatibles con la presencia de dos poblaciones de anticuerpos con diferentes afinidades en los sueros policlonales α -GK-1 de conejo.

El péptido GK-1 se reconoce desde los primeros días de infección en ratones parasitados con cisticercos de *T. crassiceps*.

El antígeno KETc7 es similar a las proteínas DRPLA y a las extensinas, principalmente por su alto contenido en prolina.

Se puede proponer que el antígeno KETc7 pertenece a la familia de las extensinas, si se considera que contiene secuencias repetidas características de las mismas.

Es posible que el antígeno KETc7 participe en fenómenos de reconocimiento en la interacción huésped - parásito y probablemente también en el desarrollo del parásito.

Perspectivas

- Encontrar el gen completo del antígeno KETc7 que codifica para la proteína de 56 kDa.
- Hacer un análisis de secuencia de la proteína completa.
- Conocer la capacidad protectora de la proteína completa.
- Localizar la proteína nativa en tenias, cisticercos y huevos.
- Utilizar al péptido GK1 para probar su protección en contra de otros parásitos.
- Utilizar anticuerpos α -extensinas para verificar su reacción cruzada con el antígeno KETc7.
- Realizar experimentos de colocalización con anticuerpos α -extensinas y α -KETc7 para conocer si se trata del mismo tipo de proteínas.
- Medir la producción de radicales de oxígeno durante la parasitosis
- Conocer el papel que puedan tener las proteínas tipo KETc7 en otros parásitos.
- Conocer si existe alguna diferencia en la cantidad de KETc7 en cisticercos extraídos del SNC y del músculo.

Bibliografía

- Alexandropoulos K, Cheng G y Baltimore D (1995) *Proline-rich sequences that bind to Src homology 3 domains with individual specificities*. Proc Natl Acad Sci USA 92:3110-3114
- Aluja A, Escobar A, Escobedo F, Flisser A, Lacleste JP, Larralde C, Madrazo F, Velázquez V y Willms K (1987) *Cysticercosis*. Fondo de Cultura Económica México D.F.
- Ansari-Lari MA, Muzny DM, Lu J, Lu F, Lilley CE, Spanos S, Malley T y Gibbs RA (1996) *A gene-rich cluster between the CD4 and triosephosphate isomerase genes at human chromosome 12p13*. Genome Res 6(4):314-326
- Ansari-Lari MA, Shen Y, Muzny DM, Lee W y Gibbs RA (1997) *Large-scale sequencing in human chromosome 12p13: experimental and computational gene structure determination*. Genome Res 7(3):268-280
- Arning S, Gruter P, Bilbe G y Kramer A (1996) *Mammalian splicing factor SF1 is encoded by variant cDNAs and binds to RNA*. RNA 2(8):794-810
- Arroyo A (1997) *Análisis computacional de la constante de afinidad en la relación antígeno-anticuerpo y su comprobación experimental*. Facultad de Medicina. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Arsenijevic-Maksimovic I, Broughton WJ y Krause A (1997) *Rhizobia modulate root-hair specific expression of extensin genes*. Mol Plant Microbe Interact 10(1):95-101
- Baer R, Bankier AT, Biggin MD, Deininger PL, Gibson TJ, Hatfull G, Hudson GS y Satchwell SC (1984) *DNA sequence and expression of the B95-8 Epstein Barr virus genome*. Nature 310(5974):207-211
- Bowles DJ (1990) *Defense-related proteins in higher plants*. Ann Rev Biochem 59:873-907
- Bradley DJ, Kjellbom y Lamb CJ (1992) *Elicitor- and wound-induced oxidative cross-linking of a proline-rich plant cell wall protein: a novel, rapid defense response*. Cell 70:21-30
- Brady JD, Sadler IH, y Fry SC (1996) *Di-isodityrosine a novel tetrameric derivative of tyrosine in plant cell wall proteins: a new potential cross-link*. Biochem J 315:323-327
- Brusca RC, y Brusca GJ (1990) *Invertebrates*. Sinauer Associates Sunderland Massachusetts 279-313
- Chen J y Varner JE (1985) *Isolation and characterization of cDNA clones for carrot extensin and proline rich 33-kDa protein*. Proc Natl Acad Sci USA 82:4399-4403
- Corbin DR, Sauer N y Lamb CJ (1987) *Differential regulation of a hydroxyproline-rich glycoprotein gene family in wounded and infected plants*. Mol Cell Biol 7:43337-4344
- Dayhoff MO (1969) *Atlas of protein sequence and structure*. National Biomedical Research Foundation
- Del Brutto OH Sotelo J y Roman GC (1996) *Cysticercosis*. Current Clinical Topics in Infections Diseases 240-259
- Dixon RA, Harrison MJ y Lamb CJ (1994) *Early events in the activation of plant defense responses*. Annu Rev Phytopathol 32:479-501
- Doolittle RF (1990) *Molecular Evolution: Computer Analysis of Protein Structure and Nucleic Acid Sequences*. Methods in Enzymology Vol 183 Academic Press
- Ertl H, Hallmann A, Wenzl S y Sumper M (1992) *A novel extensin that may organize extracellular matrix biogenesis in Volvox carteri*. EMBO J 11:2055-2062
- Flisser A, Willms K, Lacleste JP, Larralde C, Ridaura C, y Beltrán F (1982) *Cysticercosis: Present State of Knowledge and Perspectives*. Academic Press New York
- Flisser A, Madrazo I y Delgado H (1997) *Cysticercosis humana* El Manual Moderno México, D.F.
- Fragoso G, Lamoyi E, Mellor A, Lomeli C, Govezensky T y Scitutto E (1996) *Genetic control of susceptibility to Taenia crassiceps cysticercosis*. Parasitology 112:119-124
- Freeman RS (1962) *Studies of the biology of Taenia crassiceps*. Canadian Journal of Zoology 40:969-990
- Gemmel SF y Lawson RJ (1982) *Ovine cysticercosis: an epidemiological model for the cysticercosis I. The free-living egg phase. 87-98* En *Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives*. Academic Press New York
- Gevorkian G, Manoutcharian K, Larralde C, Hernández M, Almagro JC, Viveros M, Sotelo J, García E y Scitutto E (1996) *Immunodominant synthetic peptides of Taenia crassiceps in murine and human cysticercosis*. Immunology Letters 49:185-189
- Goldman S, 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
- Hong JC, Cheong YH, Nagao RT, Bahk JD, Cho MJ y Key JL (1994) *Isolation and characterization of three soybean cDNAs*. Plant Physiol 104(2):793-796
- Hyman L (1940) *The Invertebrates* New York McGraw-Hill Vol 1-5.

- Johnson KS, Harrison GB, Lightowlers MW, O'hoy KL, Cogle WG, Dempster RP, Lawrence SB, Vinton JG Heath DD y Rickard MD (1989) *Vaccination against ovine cysticercosis using a defined recombinant antigen*. Nature 338:585-587
- Keller B y Lamb CJ (1989) *Specific expression of a novel cell wall hydroxyproline-rich glycoprotein gene in lateral root initiation*. Genes Dev 3(10):1639-1646
- Kieliszewski MJ y Lampion DTA (1994) *Extensin: repetitive motifs, functional sites, post-translational codes, and phylogeny*. The Plant Journal 5(2):157-172
- Lamb CJ, Lawton MA, Dron M y Dixon RA (1989) *Signals and transduction mechanisms for activators of plant defenses against microbial attack*. Cell 56:215-224
- Larralde C, Montoya M, Sciuotto E, Díaz M, Govezensky T, y Coltorti E (1989) *Desiphering western blots of tapeworm antigens (Taenia solium, Echinococcus granulosus and Taenia crassiceps) reacting with sera from neurocysticercosis and hydatid disease patients*. Am J Trop Med Hyg 40(3):282-290
- Larralde C, Sotelo J, Montoya RM, Palencia G, Padilla A, Govesensky T, Díaz ML y Siutto E (1990) *Immunodiagnosis of human cysticercosis in cerebrospinal fluid*. Arch Pathol Lab Med 114:926-928
- Larralde C, Padilla A, Hernández M, Govezensky T, Sciuotto E, Gutiérrez G, Tapia-Conyer R, Salvatierra B y Sepúlveda J (1992) *Seroepidemiología de la cisticercosis en México*. Salud Pública de México 34:197-210
- Li SH, McInnis MG, Margolis RL, Antonarakis SE y Ross CA (1993) *Novel triplet repeat containing genes in human brain: cloning expression and length polymorphisms*. Genomics 16(3):572-579
- Lowry OH, Roserbrough NJ, Far AL y Randed R (1951) *Protein measurement with the folin reagent*. J Biol Chem 193:265-275
- Manoutcharian KG, Larralde C, Aluja A, Fragoso G, Rosas G, Hernández M, Villalobos N, Rodarte LF, Govezensky T, Baca M y Sciuotto E (1995) *Advances in the development of a recombinant vaccine against Taenia solium pig cysticercosis*. En *Vaccine 95* Cold Spring Harbor
- Manoutcharian K, Rosas G, Hernández M, Fragoso G, Aluja A, Villalobos MN, Rodarte LF y Sciuotto E (1996) *Cysticercosis: identification and cloning of protective recombinant antigens*. J Parasito 82:250-254
- Margolis RL, Li SH, Young WS, Wagster MV, Stine OK, Kidwai AS, Ashworth RG y Ross CA (1996) *DRPLA gene (atrophin-1) sequence and mRNA expression in human brain*. Mol Brain Res 36(2):219-226
- McColm AA, Bomford MR y Dalton L (1982). *A comparison of saponin with other adjuvants for the potentiation of protective immunity by a killed Plasmodium yoelii vaccine in the mouse*. Par Immunol 4(5):337-347
- McGeoch DJ, Dolan A, Dolan S y Brauer DH (1986) *Complete DNA sequence of the short region in the genome of herpes simplex virus type 1*. Nucleic Acids Res 14(4):1727- 1745
- McGeoch DJ, Dalrymple MA, Davison AJ, Dolan A, Frame MC, McNab D, Perry LJ, Scott JE y Taylor P (1988) *The complete DNA sequence of the long unique region in the genome of herpes simplex virus type 1*. J Gen Virol 69(7):1531-1574
- McNeil M, Darvill AG, Fry SC y Albersheim P (1984) *Structure and function of the primary cell walls of plants*. Ann Res Biochem 53:625-663
- Molinari JL, Soto R, Tato P, Rodríguez D, Retana A, Sepúlveda J y Palet A (1993) *Immunization against porcine cysticercosis in an endemic area in Mexico: a field and laboratory study*. Am J Trop Med Hyg 49:502-512
- Nagafuchi S, Yanagisawa H, Ohsaki E, Shirayama T, Tadokoro K, Inoue T y Yamada M (1994) *Structure and expression of the gene responsible for the triplet repeat disorder dentatorubral and pallidolusian atrophy (DRPLA)*. Nat Genet 8:177-181
- Onodera O, Oyake M, Takano H, Ikeuchi T, Igarashi S y Tsuji S (1995) *Molecular cloning of a full-length cDNA for dentatorubral-pallidolusian atrophy and regional expressions of the expanded alleles in the CNS*. Am J Hum Genet 57(5):1050-1060
- Ordoñez P, Gea S, Iosa D y Vottero-Cima E (1995) *Chagas' disease: polyspecificity of antibodies against Trypanosoma cruzi acidic antigens*. Acta Trop 59(2):93-103
- Oyake M, Onodera O, Shiroishi T, Takano H, Takahashi Y, Komonami R, Moriwaki K, Ikeuchi T, Igarashi S, Tanaka H y Tsuji S (1997) *Molecular cloning of murine homologue for dentatorubral-pallidolusian atrophy (DRPLA) cDNA: strong conservation of a polymorphic CAG repeat in the murine gene*. Genomics 40(1):205-207
- Papavassiliou AG, Wilcox KW y Silverstein SJ (1991) *The ineration of ICP4 with cell/infected-cell factors and its state of phosphorylation modulate differential recognition of lader sequences in herpes simplex virus DNA*. EMBO J 10(2):397-406
- Portnoy GL, Oliva A, Ramirez JA, Castellanos C, Del Muro R. y Ortiz-Ortiz L (1990) *An Entamoeba*

histolytica devoid of enzymatic activity, but endowed with immunogenic and protective properties. Arch Invest Med (Mix.) (Supl. 1):27-34

- Reina B (1995) *Afinidad de los anticuerpos anti VIH: método de medición y primeras descripciones teóricas y experimentales*. Tesis Profesional, Colegio de Ciencias y Humanidades, Universidad Nacional Autónoma de México
- Salcedo M, Barreto L, Rojas M, Moya R, Cote J y Patarroyo ME (1991) *Studies on the humoral response to a synthetic vaccine against Plasmodium falciparum malaria*. Clin Exp Immunol 84:122-128
- Sciutto E, Fragoso G, Trueba L, Lemus D, Montoya RM, Díaz ML, 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*. Parasite Immunology 12:687-696
- Showalter AM (1993) *Structure and function of plant cell wall proteins*. Plant Cell 5:9-23
- Toda T, Iida A, Miwa T, Nakamura e Imai T (1994) *Isolation and characterization of a novel gene encoding nuclear protein at a locus (D11S636) tightly linked to multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1)*. Hum Mol Genet 3:465-470
- Toledo A, Larralde C, Gevorkian G, Fragoso G, Manoutcharian K, Hernández M, Acero G, Rosas G, Casillas F, Kubli Garfias C, Vazquez R, Terazas I y Sciutto E *Towards a Taenia solium cysticercosis vaccine: a T and B-cell epitope shared by Taenia crassiceps and Taenia solium protects mice against experimental cysticercosis*. En prensa.
- Umezawa ES, Shikanai-Yasuda MA, Gruber A, Pereira-Chioccola VL y Zingales B (1996) *Trypanosoma cruzi defined antigens in the serological evaluation of an outbreak of acute Chagas*. Mem Inst Oswaldo Cruz 91(1):87-93
- Valdéz F, Hernández M, Govezensky T, Fragoso G y Sciutto E (1994) *Immunization against Taenia crassiceps cysticercosis identification of the most promising antigens in the induction of protective immunity*. Journal of Parasitology 80:931-936.
- Van Regenmortel MHV (1989) *Structural and functional approaches to the study of protein antigenicity*. Immunology Today 10(8):266-272
- Wilson R, Ainscouch R, Anderson K, Baynes C, Berks M, Bonfield J, Burton Connell M y Cposey J (1994) *2.2 Mb of contiguous nucleotide sequence from chromosome III of C elegans*. Nature 368(6466):32-38
- Wojtaszek P, Trethowan J, y Bolwell GP (1997) *Reconstitution in vitro of the components required for the oxidative cross-linking of extracellular proteins in French bean (Phaseolus vulgaris L.)*. FEBS Letters 405:95-98.
- Wu CL y Wilcox KW (1990) *Codons 262 to 490 from the herpes simplex virus ICP4 gene are sufficient to encode a sequence-specific DNA binding protein*. Nucleic Acids Res 18(3):531-538
- Wycoff KL, Powell PA, Gonzales RA, Corbin DR, Lamb C y Dixon RA (1995) *Stress activation of bean hydroxyproline-rich glycoprotein promoter is superimposed on a pattern of tissue-specific developmental expression*. 109:41-52
- Yu H, Chen JK, Feng S, Dalgarno DC, Brauer AW y Schreiber SL (1994) *Structural basis for the binding of proline-rich peptides to SH3 Domains*. Cell 76:933-945

Apéndice 1

Proteínas DRPLA

Los genes DRPLA (Dentatorubral Pallidoluysian Atrophy) pertenecen a una familia que contiene una serie de tripletes repetidos en forma continua, que al parecer se expanden y causan enfermedades neuropsiquiátricas. La expansión de estos genes tiene como característica el fenómeno de anticipación, que significa que en cada generación se incrementa la severidad y se presenta en edades más tempranas. Al menos tres desórdenes neuropsiquiátricos son causados por repeticiones de tripletes inestables de varios genes. Distrofia miotónica que consiste en una afección muscular progresiva. Las personas normales poseen de 5 a 30 repeticiones, mientras que los pacientes con este desorden poseen cientos de ellas. La severidad de la enfermedad se incrementa a través de las generaciones (anticipación). El síndrome de X Frágil, encontrado comúnmente en personas que padecen retraso mental, es también causado por repeticiones de tripletes inestables, en este caso una repetición en el triplete CGG que se encuentra en un gen conocido como FMR-1; este desorden es también conocido como "Paradoja de Sherman". Finalmente, la enfermedad de Kennedy (X-linked spinal and bulbar muscular atrophy) es causada por la expansión de la repetición en el triplete CAG, dentro del primer exón del gen de un receptor para andrógenos.

Además, cabe señalar que muchas enfermedades neuropsiquiátricas muestran características de anticipación, lo que sugiere la presencia de repeticiones de tripletes inestables en genes desconocidos.

Para identificar y localizar a los genes con tripletes repetidos se utilizan sondas. Una de ellas se hizo con base en secuencias repetidas del triplete CTG lo que resultó en que de 50 a 100 genes que contienen esta repetición se encuentran en el cerebro. Otros estudios se han realizado con los tripletes repetidos de CTG y CCG y todas las proteínas encontradas se codifican en el cerebro humano. Estos tripletes codifican el aminoácido prolina, lo que los hace tener homología con KETc7. El nivel de homología entre KETc7 y este tipo de proteínas se ve reflejado en su composición, ambas son ricas en prolinas lo que no es suficiente para considerarlas de la misma familia.

Algunos de estos tripletes se expresan tanto en cerebro como en músculo esquelético. Es muy interesante, que a pesar de que al parecer estas proteínas no tienen una clara relación con KETc7, se expresen en lugares donde preferentemente se alojan los cisticercos.

Extensinas

El área que limita a la planta con el medio es vulnerable a patógenos y se ve muy afectada ante condiciones adversas del ambiente. Para sobrevivir en un medio ambiente variable, se necesita responder rápidamente a los estímulos externos que pueden provenir tanto de otros organismos o de cambios en las condiciones ambientales.

Las plantas utilizan éstas señales ambientales como señales que regulan su desarrollo. Una de las características sobresalientes de este fenómeno, es su plasticidad, es decir, su regulación no está restringida a los estados embrionario y juvenil del ciclo de vida de la planta, sino que es un proceso continuo asociado con el crecimiento o bien con las situaciones de emergencia o estrés.

Para cada interacción que la planta experimenta, existe un mecanismo de acción a seguir (Lamb *et al.*, 1989). En algunas interacciones específicas, después de que se intenta infectar a la planta, una serie de señales moleculares determinan si la interacción es compatible o incompatible. En una interacción incompatible (huésped resistente, patógeno avirulento), se presenta un reconocimiento molecular temprano, seguido de una expresión rápida de la respuesta de defensa. En una interacción compatible (huésped susceptible, patógeno virulento), el patógeno escapa del sistema de defensa y se presenta la enfermedad (Lamb *et al.*, 1989; Dixon *et al.*, 1994).

Para poder entender mejor el mecanismo de defensa de las plantas, las proteínas se han separado en tres grupos (Bowles, 1990), según la función que realizan:

1. Productos que cambian directamente las propiedades de la matriz extracelular ya sea
 - a) Fortaleciendo.

- b) Reparando.
 - c) Alterando el ambiente de la pared.
2. Proteínas estructurales
- a) Proteínas ricas en hidroxiprolina HPRP.
 - b) Glicoproteínas ricas en hidroxiprolina HRGP.

HRGP {

- * Extensinas
- * Proteínas repetitivas ricas en prolina (RPRP)
- * Nodulinas
- * Glicoproteínas de goma arábica (GAGP)
- * Proteínas arabinogalactánicas (AGP)
- * Lectinas (módulos de lectinas unidos a extensinas)

- c) Proteínas ricas en prolina PRP o nodulinas tempranas (Showalter, 1993).
 - d) Proteínas ricas en glicina GRP. (Se acumulan en respuesta a la invasión de patógenos y a las heridas).
 - e) Enzimas que participan en la construcción o modificación de otros polímeros de la pared, lignina, suberina, etc.
3. Proteínas relacionadas con la defensa
- a) Tienen actividades antimicrobianas, catalizan la síntesis de productos antimicrobianos.

Proteínas estructurales.

Son proteínas que alteran las propiedades de la matriz extracelular, ya sea por cambiar su composición o el número de asociaciones interpoliméricas covalentes y no covalentes.

HPGP

El papel fundamental de estas proteínas en el autoensamblaje y extensión de la pared celular recae en sus propiedades químicas, que dependen de:

- Modificaciones postraduccionales: hidroxilación, glicosilación y entrecruzamiento
- Rigidez intrínseca
- Contacto multipuntual entre superficies complementarias
- Sitios funcionales pequeños

La unión de hidroxiprolinas a la pared celular de las plantas fue investigada desde 1960. Debido a la insolubilidad del peptidil de hidroxiprolina, llamado extensina por Lamport, acoplado a una composición de aminoácidos poco usual, su aislamiento y caracterización ha resultado muy difícil.

Características de las extensinas

- Son proteínas estructurales íntimamente ligadas a la organización de componentes arquitectónicos de la pared celular (McNeil *et al.*, 1984; Chen y Varner, 1985)
- Tienen un papel importante en la organización de la pared celular primaria; en el desarrollo de la planta y en la resistencia a enfermedades.
- Se acumulan en respuesta a la invasión de patógenos y a las heridas. (Lamb *et al.*, 1989; Bowles, 1990; Brady *et al.*, 1996; Wojtaszek *et al.*, 1997; Wycoff *et al.*, 1995).
- Son proteínas básicas, altamente glicosiladas (Bowles, 1990).
- Se sintetizan dentro de la célula y son secretadas como monómeros solubles hacia la pared de la matriz, donde progresivamente se insolubilizan hasta formar una red muy entrecruzada, de manera similar a como ocurre con las proteínas de la matriz extracelular de las células de los animales, como por ejemplo con las colágenas.

- Una causa probable de la insolubilización de las extensinas es la formación de isoditrosina (Idt), un dímero de tirosina. Se sugiere que la Idt sirve para entrecruzar intramolecularmente diferentes polipéptidos de extensinas, gracias al dominio YKYK y YYYY. YVYK (Chen y Varner, 1985; Kieliszewski y Lamport, 1994).
- Poseen la secuencia X-Hyp_n (Ser - Hyp_n). Su origen se remonta a los Protoctistas, lo que oscurece su afinidad filogenética a una sola familia de extensina-HRGP, debido a lo divergente de sus secuencias. Se proponen algunas series filogenéticas que van desde los RPRP básicos muy poco glicosilados, hasta los AGP ácidos altamente glicosilados. Existen una serie de secuencias consenso o motivos que se repiten a lo largo de estas proteínas, así como sitios funcionales y códigos postraduccionales (Kieliszewski y Lamport, 1994).
- Tienen un punto isoeléctrico (pI) elevado y una estructura de vara o varilla y se reconocen por la secuencia Ser-Hyp_n. Cada Hyp posee un bloque de tetraarabinosa que le da rigidez a la proteína (Brady, 1996).
- Poseen secuencias repetidas que actúan como sitios de reconocimiento para entrecruzamientos, para enzimas glicosilantes o para interacciones iónicas con otras proteínas y polisacáridos (Brady, 1996).
- La hidroxilación es un fenómeno postraducciona que se lleva a cabo en el retículo endoplásmico rugoso gracias a las prolil hidroxilasas (Bowles, 1990).
- Están codificadas por una superfamilia de genes, y se ha sugerido que también se presenta la edición alternativa de los ARNm codificados por un solo gen (Bowles, 1990).
- La expresión de los genes de estas proteínas está regulada tanto por el desarrollo como por estímulos ambientales (Wycoff *et al.*, 1995).
- En ciertas especies de plantas la inducción depende del tejido (tejido específico) y la regulación de la transcripción de los genes de las extensinas es tejido específica y la cantidad que se produce, depende del estímulo y del tejido (Brady, 1996).
- Parece existir una regulación temporal de los genes para dichas proteínas que depende de la señal que se presente (Bowles, 1990).
- Participan en diversas interacciones incompatibles que producen un entrecruzamiento oxidativo de las HPRP, en el frijol se han aislado tres de ellas (Bradley *et al.*, 1992; Wojtaszek *et al.*, 1997). Se ha encontrado que la ovoperoxidasa (enzima responsable del entrecruzamiento de la cubierta proteica de los huevos del erizo de mar), es activada de manera similar por un incremento en el pH del compartimiento extracitoplásmico (Wojtaszek *et al.*, 1997).

Apéndice 2

Reactividad de anticuerpos α -GK-1 en contra de las diferentes etapas de desarrollo de *T. crassiceps* y *T. solium*

Tabla XI Comparación entre todos los grupos.

Origen de las variaciones	SC	gl	CM	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	3.4299	6	0.5717	91.707	4.8561E-39	2.1879
Dentro de los grupos	0.6420	103	0.0062			
Total	4.0720	109				

Tabla XII Comparación entre membranas de *T. solium*. y *T. crassiceps*.

Origen de las variaciones	SC	gl	CM	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0.0868	1	0.0868	19.4237	1.2341E-04	4.1709
Dentro de los grupos	0.1341	30	0.0045			
Total	0.2209	31				

Tabla XIII Comparación entre fluidos vesiculares de *T. solium*. y *T. crassiceps*.

Origen de las variaciones	SC	gl	CM	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0.0103	1	0.0103	1.6520	2.0438E-01	4.0266
Dentro de los grupos	0.3234	52	0.0062			
Total	0.3337	53				

Tabla XIV Comparación entre distintos compartimientos de *T. solium*.

Origen de las variaciones	SC	gl	CM	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0.0306	2	0.0153	2.2633	0.1148	3.1866
Dentro de los grupos	0.3311	49	0.0068			
Total	0.3617	51				

Tabla XV Comparación entre distintos compartimientos de *T. crassiceps*.

Origen de las variaciones	SC	gl	CM	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0.0639	1	0.0639	16.6228	0.0002	4.0617
Dentro de los grupos	0.1692	44	0.0038			
Total	0.2331	45				