

Hacia el desarrollo de una vacuna en contra de la cisticercosis porcina basada en la paramiosina de *Taenia solium*

Carlos F. Solís,* José Vázquez-Talavera,* Juan Pedro Lacleste*

Recepción versión modificada: 6 de mayo de 2003 aceptación: 11 de noviembre de 2003

Resumen

La paramiosina de Taenia solium (TPmy) es un antígeno inmunodominante de la cisticercosis humana y porcina. Se trata de una proteína de 100 kDa con una estructura alfa-hélice superenrollada asociada al músculo y a estructuras tegumentarias del cisticerco. La TPmy tiene la propiedad de unirse al C1q e inhibir la cascada del complemento. La TPmy probablemente se une al C1q a través sus dominios tipo colágena y podría estar relacionada con una estrategia parasitaria para modular la respuesta inmune del huésped. En el hombre y en el ratón, la respuesta inmune humoral en contra de la TPmy está preferentemente dirigida hacia el extremo carboxilo terminal mientras que el extremo amino terminal de la TPmy induce una respuesta protectora celular de tipo Th1. Ensayos de protección en el modelo murino de cisticercosis en ratones inmunizados con fragmentos recombinantes de TPmy revelaron que el extremo amino terminal induce alrededor de 60% de protección en contra de un reto intraperitoneal con cisticercos de Taenia crassiceps. Ensayos preliminares de protección por inmunización génica revelaron que el extremo amino terminal de la TPmy clonado en un vector plasmídico con un promotor de citomegalovirus induce alrededor de 79% de protección, junto con plásmidos para la expresión de IL-12, sugiriendo que este tipo de inmunización con TPmy puede resultar en el desarrollo de una vacuna eficaz y económica en contra de la cisticercosis.

Palabras clave: Paramiosina, *Taenia solium*, *Taenia crassiceps*, complemento, protección, inmunización génica

Summary

*Taenia solium paramyosin (TPmy) is a prominent 100 kDa antigen in human and porcine cysticercosis. TPmy is an α -helical coiled coil protein present in muscle and tegumentary structures of *T. solium* cysticerci. TPmy has the property of binding C1q resulting in inhibition of the complement cascade. TPmy probably binds C1q through its collagen-like domains and could be involved in a parasite strategy to modulate host immune response. Humoral immune response against TPmy is preferentially directed against carboxyl terminal end in humans and mice, whereas amino terminal end of TPmy preferentially induces a Th1-related cellular immune response. Protection studies in murine model of cysticercosis showed that the amino terminal end fragment of TPmy induces approximately 60% protection against an i.p. challenge with *Taenia crassiceps* cysts when mice are immunized with recombinant fragments of TPmy. Initial protection studies using genetic immunization showed that amino terminal end fragment of TPmy cloned into a plasmid expression vector with a cytomegalovirus promoter, together with IL-12-expressing plasmids induced 79% protection, suggesting that this kind of TPmy-immunization might result in development of a cost-effective vaccine against cysticercosis.*

Key words: Paramyosin, *Taenia solium*, *Taenia crassiceps*, complement, protection, genetic immunization

* Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F.

Correspondencia y solicitud de sobretiros: Dr. Juan Pedro Lacleste, Dirección, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, A.P. 70228, Ciudad Universitaria, C.P. 04510, México D.F., México. Teléfono: (5255) 5622-3862. Fax. (5255) 5550-6447. E-mail: lacleste@servidor.unam.mx

Introducción

La proteína mejor caracterizada del cisticerco de la *T. solium* es sin duda el antígeno B (AgB) que fue posteriormente identificado molecularmente como una paramiosina. A continuación se resume la información al respecto de su reconocimiento por el sistema inmune del huésped cisticercoso, humano, porcino y murino; de su localización en los tejidos del cisticerco; de su caracterización bioquímica y genética; y de su papel en la relación huésped-cisticerco. Cabe advertir que se trata de una proteína con la propiedad de unirse al C1q, lo que resulta en una inhibición de la cascada del complemento. Puesto que el complemento juega un papel modulador de la respuesta inflamatoria, hemos propuesto que el AgB o paramiosina es responsable del reducido infiltrado inflamatorio que se observa alrededor de los cisticercos que mantienen una relación en equilibrio con su huésped. Además, este hallazgo lo convirtió en un antígeno candidato para desarrollar una vacuna en contra de la cisticercosis. Actualmente se prueba su potencial protector en el modelo de cisticercosis murina por ensayos de inmunización génica. En la sección final se describen los resultados originales más recientes de estos ensayos de protección.

La Paramiosina de la *Taenia solium*

Este antígeno fue inicialmente identificado como un arco de precipitación, al que se denominó *antígeno B*, sin carga neta aparente, caracterizado por inmunoelectroforesis al confrontar un extracto crudo de cisticercos contra sueros de pacientes con neurocisticercosis. En esta prueba, fue el antígeno reconocido con mayor frecuencia por anticuerpos en sueros de pacientes con neurocisticercosis, por lo que se definió como un antígeno inmunodominante.^{1,2}

En 1982, se publicó el primer método de purificación del AgB. Este método era un procedimiento bioquímico complejo y laborioso y permitía la purificación de pequeñas cantidades de proteína. El AgB purificado por el método original mostraba dos bandas de 85 y 95 kDa en SDS-PAGE.³ Accidentalmente, se encontró que el AgB se une a la colágena,⁴ lo que marcó la pauta para desarrollar un procedimiento de purificación por afinidad. El uso de este nuevo método de purificación permitió mostrar que el péptido de 85 kDa era en realidad un producto proteolítico del mayor.⁵

La localización del AgB en los tejidos del cisticerco se llevó a cabo por métodos de inmunofluorescencia e inmunoperoxidasa indirecta, así como por métodos de yodación radioactiva de la superficie. El antígeno se encontró ampliamente distribuido en el tejido del cisticerco, con una fluorescencia más intensa en los citones tegumentales.⁶ Dado que estas células participan activamente en la producción de proteínas y glicoproteínas que se envían al citoplasma

distal del cisticerco.^{7,8} se propuso que el AgB podría ser sintetizado en los citones tegumentales y enviado al tegumento para su liberación hacia los tejidos del huésped.^{6,9} Los resultados de experimentos con inmunoperoxidasa indirecta y yodación radioactiva de superficie, indicaron que el AgB no era una proteína de superficie por lo que se propuso que se trataba de un producto de excreción-secreción parasitario.⁹ Además, es posible colectar AgB en el sobrenadante de los cultivos in vitro de cisticercos⁹ y se puede detectar en el líquido céfalorraquídeo de pacientes con neurocisticercosis.² La posibilidad de que se tratara de un producto de excreción-secreción parecía estar de acuerdo con su inmunodominancia y correlacionaba bien con la intensa producción de anticuerpos en las células plasmáticas que rodean al cisticerco en el músculo de cerdo. Cabe señalar que recientemente se ha cuestionado el significado de la localización del AgB en el tegumento de helmintos.¹⁰

La relación entre el AgB y la reacción inflamatoria surgió a partir de su propiedad de unión a colágena.⁵ Esto llevó a cuestionar si otras moléculas con estructura colagénica podrían unirse al AgB. Entre las proteínas con estructura colagénica cuya función se relaciona al sistema inmune, se encuentra el C1q. Esta proteína es un subcomponente del C1, el primer componente de la cascada del complemento. Ensayos iniciales indicaron que una preincubación de suero humano con AgB purificado, disminuye los niveles de complemento funcional en el suero.⁹

Una secuencia parcial del AgB mostró homología con la secuencia también parcial de la paramiosina de *Schistosoma mansoni*.¹¹ A partir de este hallazgo fue posible obtener clones de cDNA que contienen la secuencia codificadora completa del AgB de *T. Solium*.¹² La secuencia de aminoácidos deducida a partir de la secuencia nucleotídica codifica una proteína de 863 residuos de aminoácidos con un peso molecular de 98, 859. El análisis de la secuencia de aminoácidos mostró 72% de identidad con la del *S. mansoni* y alrededor de 34% con la paramiosina de *Caenorhabditis elegans* y *Dirophilaria immitis*.¹² También, se demostró similitud inmunológica de la proteína recombinante, expresada en *Escherichia coli*, con el antígeno B, además de similitud inmunológica entre la paramiosina de *S. mansoni* y el AgB.¹² Estos resultados demuestran que el AgB es la paramiosina de la *T. solium* (TPmy), por lo que a partir de aquí se utilizará exclusivamente este último término. Nuestro grupo también ha descrito la estructura del gen de la TPmy que incluye 13 intrones delimitados por sitios de splicing convencionales lo que elimina la posibilidad de que *T. solium* exprese mini-paramiosinas como es el caso de *Drosophila melanogaster*.¹³ Las paramiosinas son proteínas filamentosas presentes en el músculo de los invertebrados, con una estructura secundaria de α -hélice superenrollada que forma homodímeros.¹⁴

A partir de la clonación de la secuencia codificadora de la TPmy fue posible realizar experimentos utilizando la

proteína recombinante expresada en bacterias. Para llevar a cabo una purificación expedita, se le fusionó un segmento con secuencia de polihistidina que permite la purificación por afinidad a metales divalentes. Utilizando la proteína recombinante purificada prácticamente a homogeneidad, confirmamos que la inhibición de la cascada del complemento se debe a un bloqueo a nivel de C1. Además, experimentos de unión con C1q demuestran que la TPmy tiene una alta afinidad por este componente de la cascada del complemento. Por lo tanto, la inhibición del C1 es posiblemente debida a la unión de la TPmy con el C1q.¹⁵ Se ha informado de un receptor para Fc asociado a la superficie tegumental de la *T. crassiceps*, que muestra similitud de 87.5% con la TPmy.¹⁶ Este hallazgo que nuevamente apoya la extraña asociación de la TPmy con la superficie tegumental, puede ser explicado por la unión de la TPmy con el C1q. Es decir, que la función receptora de Fc podría estar mediada por un complejo TPmy-C1q.

Hemos propuesto que las paramiosinas inhiben la producción de mediadores complementarios de inflamación en la interfase huésped-cisticercos, es decir, que desempeñan un papel inmunomodulador de la respuesta del huésped.^{12,15} El cisticercos puede evitar el reclutamiento de células hacia la interfase para disminuir la confrontación con su huésped humano o porcino. Por lo anterior, la TPmy se ha convertido en un candidato para el desarrollo de una vacuna en contra de la cisticercosis. Cabe mencionar que la paramiosina es también candidato para el desarrollo de una vacuna en otras infecciones helmínticas tales como la esquistosomiasis¹⁷⁻²² y varias filariasis.^{23,24} Además, se puede inducir protección contra *Schistosoma japonicum* con un anticuerpo monoclonal IgE anti-paramiosina²⁵ y se ha sugerido que la respuesta inmune a la paramiosina se relaciona con la resistencia natural a la esquistosomiasis en humanos.²⁶ Incluso se ha logrado producir anticuerpos anti-paramiosina en ratones vacunados con vectores de expresión que contienen fragmentos de DNA que codifican la paramiosina de *Schistosoma japonicum*.²¹ Finalmente, se ha encontrado que un anticuerpo monoclonal dirigido contra un antígeno de superficie de 14 kDa de *Onchocerca microfilariae* reconoce una molécula que parece ser la paramiosina en un extracto de gusano adulto.²⁷ Resultados recientes de nuestro grupo muestran que la inmunización con TPmy recombinante induce protección en contra de la cisticercosis murina.²⁸

Materiales y métodos

Ratones: se utilizaron hembras de ratones BALB/c, susceptibles a la infección intraperitoneal por *Taenia crassiceps*,²⁹ mantenidos desde hace más de veinte generaciones en el Bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas.

Cisticercos: se usaron cisticercos de *Taenia crassiceps* de la cepa ORF conservados a través de pases sucesivos de ratón a ratón. Se extrajeron los cisticercos de la cavidad peritoneal de ratones con dos a cuatro meses de infección y se lavaron en solución salina amortiguadora de fosfatos, pH 7.2 (PBS).

Purificación de la TPmy: la paramiosina nativa se purificó a través de un método de afinidad por colágena como se describió anteriormente.⁵ En breve, se incubó un extracto crudo de cisticercos de *Taenia crassiceps* con una malla de colágena en una solución amortiguadora de fosfatos 15 mM, pH 7.2 (PBS) durante una hora; se lavó la colágena tres veces con el mismo amortiguador, y después se eluyó la TPmy unida a la colágena sumergiendo la malla en PBS más NaCl 0.65 M. La muestra obtenida se concentró por Amicon (Amicon Corp., Danvers MA), se dializó y se determinó la concentración de proteína por el método de Bradford.

Proteínas recombinantes: se diseñaron vectores de expresión plasmídicos a partir de la secuencia codificadora de la TPmy para expresar en cultivos bacterianos tanto la proteína completa como fragmentos que corresponden aproximadamente a tercios de la TPmy: la paramiosina completa (VW7-3) que es una proteína de 863 aminoácidos; el fragmento amino terminal que contiene los aminoácidos que van del 1 al 268 (VW2-1); el fragmento central, del 269 al 551 (VW3-3) y el fragmento carboxilo terminal del 552 al 863 (VW4-1). Todos las proteínas fueron expresadas recombinantemente y purificadas por cromatografía de afinidad tal y como se describió anteriormente.³⁰ Los productos recombinantes fueron dializados en contra de una solución amortiguadora de NaCl 0.5 M, pH 7.3 y se determinó la cantidad de proteína por el método de Bradford (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).

Electroforesis en gel: la electroforesis en geles de poli(acrilamida) con SDS (SDS-PAGE) se realizó de acuerdo al método descrito por Laemmli.³¹

Preparación de antígenos: los fragmentos recombinantes (VW2-1, VW3-3 y VW4-1) o la paramiosina completa (VW7-3), fueron mezclados con alúmina al 1.6% ($Al_2(OH)_3$) en una proporción de 1:50 (w/w) e incubados a temperatura ambiente por 20 minutos. La alúmina se sedimentó por centrifugación a 8000 g/10 min y se resuspendió en una solución salina estéril. La cantidad de proteína unida a la alúmina fue determinada indirectamente por cuantificación de proteína en el sobrenadante después de centrifugar. En todos los ensayos, la unión de la proteína fue superior a 95%. Para las inmunizaciones con las proteínas recombinantes se utilizaron dosis de 20 µg adsorbida a 1 mg de alúmina.

Construcciones plasmídicas para inmunización génica: se utilizó el vector plasmídico de expresión eucarionte pTC-Ova desarrollado y donado por S. Levy de la Universidad de Stanford. Este vector contiene un promotor

de citomegalovirus que induce la expresión del gen de la ovoalbúmina en marco de lectura con la secuencia líder κ de la inmunoglobulina humana que permite la secreción del producto traducido. A partir de la secuencia codificadora de la TPmy se diseñaron oligonucleótidos con los sitios de restricción adecuados para amplificar por técnicas de PCR las secuencias codificadoras de la paramiosina (VW7-3) así como del fragmento amino terminal (VW2-1), para clonarlas y remplazarlas en lugar de la secuencia codificadora de la ovoalbúmina. Para inducir la expresión de interleucina (IL)-12 en el ratón se utilizaron los plásmidos pEDP35 y pEDP40 donados por S. Wolf de Genetics Institute, Cambridge, que expresan las subunidades P35 y P40 de la IL-12 respectivamente. Se transformaron bacterias *Escherichia coli* de la cepa XL1-blue con los plásmidos arriba descritos y se purificaron a gran escala por lisis alcalina utilizando un kit especial para la obtención de DNA plasmídico libre de endotoxinas (Qiagen).

Ensayos de protección: los ratones se inmunizaron dos veces por vía intraperitoneal a intervalos de una semana con cada uno de los productos recombinantes de paramiosina (VW2-1, VW3-3, VW4-1 o VW7-3), preparados como se describe arriba. Los ratones control fueron inyectados con 1 mg de alúmina en PBS, siguiendo el mismo procedimiento descrito para los antígenos. Una semana después de la última inmunización los ratones fueron retados por vía intraperitoneal con 10 cisticercos de *Taenia crassiceps* en PBS. Se tomaron muestras de sangre de los ratones cada semana después de la última inmunización y se sacrificaron por inhalación de CO₂, a los 45 días infección. Se extrajeron los cisticercos de la cavidad peritoneal y se contaron. Para los ensayos de inmunización génica los ratones fueron inyectados tres veces por vía intramuscular a intervalos de 15 días con 100 µg de DNA plasmídico resuspendido en un volumen de 100-150 µl de PBS. Un día después de la última inmunización se retaron los ratones de la misma forma que se describe arriba y se sacrificaron a los 25 días de infección. En todos los ensayos, el porcentaje de protección se calculó de la siguiente manera: protección = número promedio de cisticercos en el grupo control/número promedio de cisticercos en el grupo inmunizado x 100.

Detección de anticuerpos: las placas de ELISA de 96 pozos se sensibilizaron con 100 ng/pozo del antígeno en una solución amortiguadora de carbonatos (0.29 g de NaHCO₃ y 0.59 g de Na₂CO₃ en 100 ml, pH 9.6) 1 h a 37° C. Posteriormente, se lavaron los pozos cinco veces con 0.3% de Tween 20 en PBS (PBS-Tween) y se bloquearon con albúmina sérica bovina (BSA) al 1% en PBS-Tween por 1 h a 37° C. Después de lavarse nuevamente con PBS-Tween, se incubaron con sueros de ratones normales o inmunizados (100 µl/pozo), diluidos 1:500 en PBS-Tween con BSA (ver arriba), por 30 min a 37° C. Posteriormente,

se lavaron nuevamente con PBS-Tween (ver arriba) y se incubaron 30 min a 37° C con anticuerpo de cabra anti-IgG1 o IgG2a de ratón unidos covalentemente a peroxidasa (α -ratón-HPRT, Zymed laboratories), diluidos 1:1000 en PBS-Tween y BSA al 1 %. Las placas fueron nuevamente lavadas con PBS-Tween y se les agregaron 100 µl/pozo de dihidrocloruro de o-fenilendiamina (OPD, 0.4 mg/ml) y H₂O₂ al 0.04% en amortiguador de citratos (ácido cítrico 24.3 mM, Na₂HPO₄ 51.4 mM, pH 5) por 10 min. La reacción de revelado se detuvo adicionando 50 µl/pozo de 2.5 N de H₂SO₄ y se evaluó la absorción de luz a una 490 nm en un lector de ELISA.

Ensayos de proliferación celular: se realizaron ensayos de proliferación celular de células mononucleares de bazo. En estos ensayos las células se obtuvieron del bazo de ratones controles e inmunizados por disgregación del tejido con una malla metálica en RPMI-1640 suplementado al 10% con suero fetal bovino (RPMI suplementado). Se suspendió el disgregado en un tubo cónico y se incubó 20 min a 4° C para permitir que sedimenten los restos del tejido. El sedimento se descartó y la suspensión celular fue centrifugada a 200 g/10 min a 4° C. El sedimento se resuspendió y se incubó 10 min a 4° C en 3 ml de una solución hemolisante (KHCO₃ 0.01 M, NH₄Cl 0.15 M, EDTA tetrasódico 0.01 mM) para eliminar a los eritrocitos. Se le agregaron 15 ml de RPMI-1640 suplementado y se centrifugó a 200 g por 10 min a 4° C. El sobrenadante fue descartado y las células mononucleares resuspendidas en 5 ml de RPMI suplementado tomando una alícuota para contar las células viables en una cámara de Neubauer por exclusión del azul tripano. Posteriormente, las células mononucleares fueron sembradas en una placa de 96 pozos depositando, en 100 µl, 500 células/pozo. Se agregaron 100 µl de VW2-1, VW4-1 o de un mitógeno. La caja se dejó incubando a 37° C, con humedad a saturación y 5% de CO₂. Entre 18 y 24 h antes de cosechar los cultivos, se agregó 1 µCi/pozo de ³H-timidina. Las células fueron cosechadas sobre papel de fibra de vidrio mediante un cosechador automático.

Producción de citocinas y determinación del fenotipo celular: los esplenocitos de ratones normales y de ratones inmunizados con el fragmento amino terminal (VW 2-1) se mantuvieron en cultivo en RPMI suplementado en cajas de 16 pozos (Costar) a una concentración de 5x10⁶ células/pozo. Los cultivos se estimularon con 10 µg/ml/ml del fragmento amino terminal (VW 2-1) durante 48 h y se colectaron los sobrenadantes; se hicieron alícuotas y almacenaron a -70°C hasta su uso. La producción de interleucina 2 (IL-2), interferón- γ (IFN- γ) e interleucina-4 (IL-4) fue evaluada en los sobrenadantes por ELISA de sandwich con kits específicos de citocinas (Pharmingen, San Diego, CA), siguiendo las instrucciones de fabricante. Para analizar el fenotipo de los esplenocitos se mantuvieron los cultivos por 120 h.

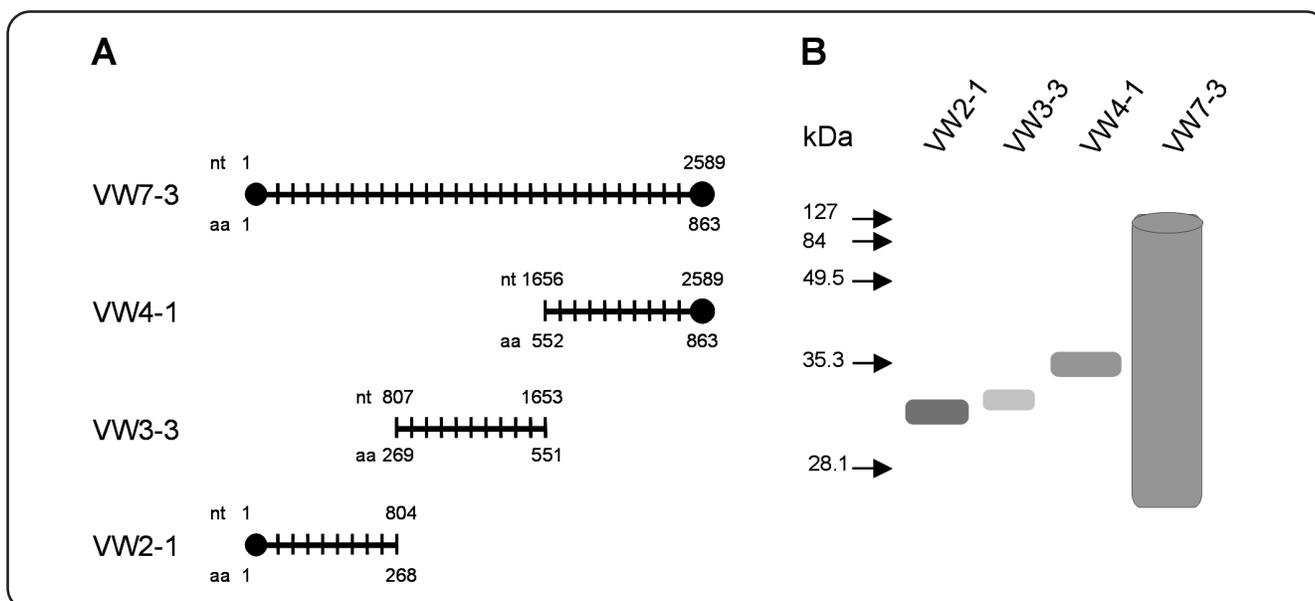


Figura 1. Productos Recombinantes de la Paramiosina de *Taenia solium* usados en este Estudio. A. representación esquemática; las posiciones de los nucleótidos (nt) y aminoácidos (aa) se indican con números basados en la secuencia de la proteína completa. B. Análisis de electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS mostrando la pureza de los productos recombinantes de TPmy purificados: 1. VW2-1, 2. VW3-3, 3. VW4-1, 4. VW7-3. Reproducida con permiso.³⁰

El análisis de fenotipo celular de los esplenocitos de ratones controles e inmunizados sin infectar e infectados; se realizó en un citofluorómetro de flujo (Becton Dickinson, San José, CA) de acuerdo a lo descrito anteriormente.²⁸

Análisis estadístico: el análisis estadístico de todos los ensayos se realizó aplicando la prueba *t de Student*.

Resultados

Propiedades inmunoprotectoras de la paramiosina

La expresión de TPmy recombinante permite estudiar hacia qué regiones de la proteína se dirige la respuesta inmune humoral y celular del huésped. Estudios realizados en el humano y en el ratón revelaron que la respuesta inmune humoral y celular resultante de una inmunización con la TPmy, es variable en contra de cada una de las regiones, a pesar de que la molécula es conformacionalmente muy similar.³⁰ Para llevar a cabo estos estudios se diseñaron cuatro construcciones plasmídicas (Figura 1), que expresan portécnicas del DNA recombinante, la TPmy completa (VW 7-3), el tercio amino terminal (VW 2-1), el tercio central (VW3-3) y el tercio carboxilo terminal (VW4-1).

Inicialmente se analizó la respuesta inmune de pacientes con neurocisticercosis, encontrándose que sus anticuerpos

Cuadro I. Estimulación de células periféricas de pacientes y de individuos sanos con los fragmentos recombinantes de paramiosina de la *Taenia solium*

Muestras humanas	Estimulación con los productos recombinantes de TPmy*			Número de casos
	VW2-1	VW3-3	VW4-1	
Pacientes				
neurocisticercosis	+	+	-	3
con anticuerpos a TPmy: 9/24†	-	-	+	2
% positivo	55	55	66	Total 9
Individuos sanos				
con anticuerpos a TPmy: 9/24†	+	+	-	6
% positivo	88	77	22	Total 9

*Muestras de células de 24 pacientes neurocisticercosis o individuos sanos de la misma área endémica para cisticercosis fueron estimuladas *in vitro*, como se describe en los Materiales y Métodos, con TPmy purificada de cisticercos de *T. solium*.

†Índice de estimulación ≥ 2 , fue considerado positivo (+), los demás como negativos (-).

Reproducida con permiso.³⁰

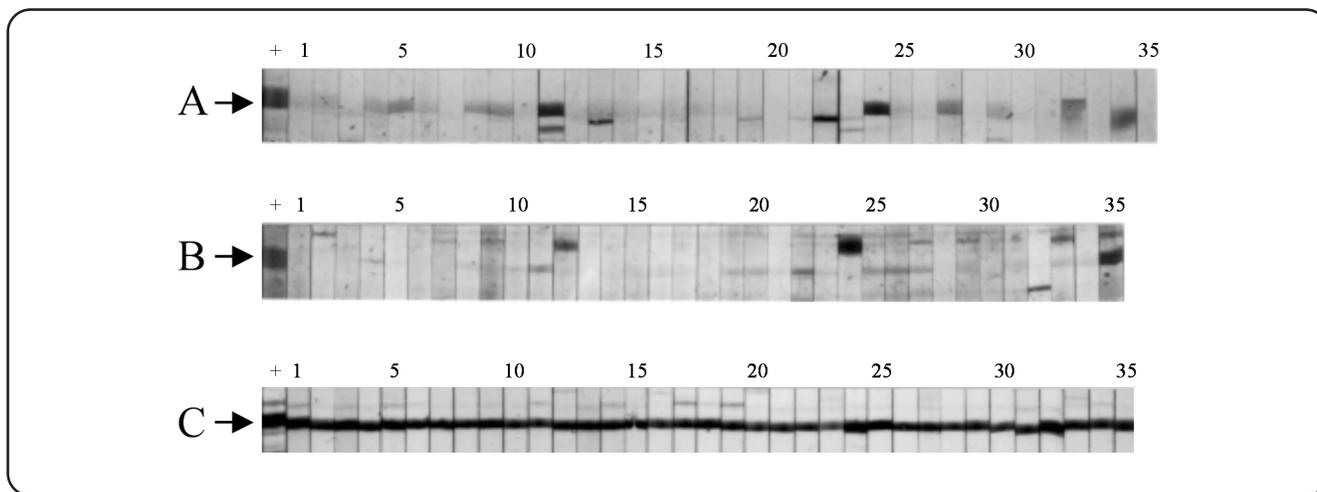


Figura 2. Reconocimiento por anticuerpos humanos de los fragmentos recombinantes de la Paramiosina de *Taenia solium*. Los sueros de paciente neurocisticercosos (1-35) fueron probados por Western blot contra: A. VW2-1, B. VW3-3, C. VW4-1. Los carriles en los extremos izquierdos (+) muestran el reconocimiento de cada región por un suero hiperinmune de conejo anti-TPmy. Reproducida con permiso.³⁰

Cuadro II. Ensayos de protección en el modelo murino de cisticercosis por *T. crassiceps*^a

Vacunación	Número de ratones	Carga parasitaria	$x \pm D.E^b$ (%)	Protección ^c
Exp.1				
Alúmina	4	48,38,22,36	36 ± 11	-
VW7-3	4	4,24,24,12	16 ± 10	55 [§]
Exp.2				
Alúmina	6	7,36,54,76,141,76	65 ± 45	-
VW7-3	6	19,24,52,37,43,9	31 ± 16	52 [§]
Exp.3				
Alúmina	5	20,31,73,92,134	70 ± 46	-
VW2-1	5	0,0,1,2,41	9 ± 18	87 [§]
VW4-1	6	40,73,78,82,110,147	88 ± 36	-25
Exp.4				
Alúmina	5	38,44,54,76,110	64 ± 29	-
VW 2-1	6	7,9,18,38,43,86	34 ± 30	47 [§]
VW 4-1	6	0,0,10,20,66,150	41 ± 59	36
Exp.5				
Alúmina	5	81, 82, 86, 31, 158	88 ± 45	-
VW3-3	5	79, 8, 70, 79, 54	58 ± 30	34
Exp.6				
Alúmina	6	107, 300, 134, 55, 170, 64	138 ± 90	
VW3-3	6	99, 39, 29, 90, 120, 22	67 ± 42	52 [§]

^aLos ratones fueron retados por inoculación intraperitoneal con 10 cisticercos, una semana después de la última inmunización.

^bLos valores son promedios \pm desviación estándar (D.E) de la carga parasitaria 45 días después de la infección.

^cLa protección fue calculada como una reducción de la carga parasitaria expresada en porcentajes, en donde la carga parasitaria del grupo control de ratones inyectados con alúmina representa el 100%.

[§]Diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control de ratones inyectados con alúmina y el grupo de ratones inmunizados ($p \leq 0.05$).

Reproducida con permiso.²⁸

Cuadro III. Proliferación y perfil de citocinas de células esplénicas de ratones inmunizados con VW2-1.

Tratamiento ^a	S.I. ^b	IL-2	IFN- γ (pg/ml \pm S.D)	IL-4
No-inmunizado	1	713 \pm 62	2683 \pm 1765	\geq 30
No-inmunizado + VW2-1	3.25 [§]	954 \pm 45 [§]	4635 \pm 1260	107 \pm 118
Inmunizado	1	813 \pm 76	2032 \pm 436	\geq 30
Inmunizado + VW2-1	7.33 [§]	1841 \pm 274 [§]	7619 \pm 1019 [§]	33 \pm 39

^aLas células esplénicas de ratones inmunizados y no inmunizados con VW2-1, se cultivaron *in vitro* con y sin VW2-1 como se describe en los Métodos, y se evaluó la proliferación y se cuantificaron las citocinas en los sobrenadantes de cultivo.

^bLos valores corresponden a los índices de estimulación calculados a partir de las medias de radioactividad incorporada por células de 3 ratones individuales por grupo, después de un pulso de 18 hr con [³H] timidina.

[§]Diferencias estadísticamente significativas entre las células de ratones estimulados (inmunizados) y control (no inmunizados) ($p < 0.01$). Reproducida con permiso.²⁸

reconocen preferentemente el extremo carboxilo terminal de la TPmy, mientras que el extremo central y el amino terminal son pobremente reconocidos (Figura 2). En contraste, la respuesta inmune-celular muestra una ligera preferencia por el extremo amino terminal (Cuadro I).

Ensayos de ELISA revelaron que los anticuerpos de los ratones inmunizados con TPmy recombinante completa, también reconocen preferentemente al extremo carboxilo terminal de la TPmy, mientras que el extremo amino terminal es pobremente reconocido (no mostrado), en concordancia a lo encontrado en humanos. En contraste, ensayos de proliferación *in vitro* revelaron que los linfocitos T extraídos de ratones inmunizados con TPmy recombinante, proliferan principalmente contra el extremo amino terminal (no mostrado). Estos resultados sugieren un ocultamiento de la región que une C1q al reconocimiento por anticuerpos.

También se usaron las anteriores proteínas recombinantes (la TPmy completa, y los fragmentos correspondientes a las regiones amino, central y carboxilo terminal) para inducir una inmunidad protectora en ratones altamente susceptibles a la infección intraperitoneal con cisticercos de *T. crassiceps*. Los resultados de protección indicaron que la mayoría de los componentes protectores de la TPmy radican en el fragmento correspondiente al tercio amino terminal (Cuadro II) y que este fragmento genera en el ratón una respuesta inmune tipo Th1 (Cuadro III).

Ensayos de protección por inmunización génica

La inmunización génica tiene varias ventajas sobre la inmunización con proteínas naturales o recombinantes.³² Se trata de una inmunización totalmente específica hacia el antígeno codificado, además de que la introducción de una

secuencia secretora, garantiza la liberación del antígeno hacia los tejidos del huésped, facilitando su reconocimiento inmunológico en un contexto de las moléculas clase II del complejo mayor de histocompatibilidad, favoreciendo respuestas dirigidas por linfocitos T de ayuda.³³ También, el DNA es más estable y fácil de producir en gran escala que las proteínas. Finalmente, la inmunización génica permite el uso de secuencias codificadoras de interleucinas para dirigir la respuesta hacia el perfil Th deseado.³⁴

Para explorar el uso de la inmunización génica, se desarrollaron construcciones plasmídicas de expresión eucarionte que contienen la secuencia codificadora de la paramiosina completa (pTC-7-3) así como la secuencia codificadora del fragmento amino terminal (pTC-2-1), que había resultado ser el fragmento más protector en contra de la cisticercosis murina por *T. crassiceps* (Cuadro II). La funcionalidad de ambas construcciones se verificó por inmunoprecipitación de la paramiosina en el sobrenadante de cultivo de células COS-7 transfectadas con pTC-7-3 y pTC-2-1 (no mostrado). Posteriormente se realizaron pruebas de Western blot poniendo a reaccionar los sueros de ratones inmunizados con la construcción pTC-2-1, encontrándose que reconocen a la paramiosina en forma similar a los sueros de los ratones inmunizados con la propia proteína recombinante (no mostrado). Para dirigir la respuesta hacia el perfil protector Th1 se co-inmunizaron los ratones con plásmidos de expresión de las subunidades P35 y P40 de la IL-12 (pEDP35 y pEDP40). Se detectaron altos niveles de anticuerpos IgG2a en los sueros de los ratones inmunizados genicamente, incluso superiores a los encontrados en ratones inmunizados con la proteína recombinante (Cuadro IV). Sin embargo, la co-inyección de los ratones con los plásmidos de expresión para IL-12 no indujo un incremento significativo en los niveles de IgG2a, por el contrario, el grupo de

Cuadro IV. Perfil de la respuesta humoral en ratones inmunizados con vectores plasmídicos^a

Inmunización	Isotipos de anticuerpos		Proporción IgG1: IgG2a
	IgG1	IgG2a	
Solución salina	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1	1:1
VW2-1	0.2 ± 0.02 [§]	0.4 ± 0.05 [§]	1:2
Vectores plasmídicos			
pTC-2-1	0.8 ± 0.4 [§]	1.7 ± 0.4 [§]	1:2
pTC-2-1 + IL-12	1.0 ± 0.4 [§]	1.4 ± 0.3 [§]	1:1

^aLos sueros de ratones inmunizados con VW2-1 (diluidos 1:200) fueron analizados por ELISA (ver Materiales y Métodos). Los valores son promedios ± desviación (D.E.) de cuadruplicados expresados en densidades ópticas a 490 nm.

[§]Valores estadísticamente significativos con relación al suero de ratones no-inmunes ($p < 0.01$).

ratones que presentó niveles más elevados de este isotipo de anticuerpo tipo Th1 fue el inyectado con el vector pTC-2-1 que únicamente expresa el fragmento amino terminal de la TPmy.

Ensayos de proliferación con células de bazo de los ratones inyectados con pTC2-1 mostraron altos índices de estimulación cuando las células fueron estimuladas *in vitro* con paramiosina recombinante (Cuadro V), similares a los reportados en la cuadro III con células de ratones inmunizados con el fragmento recombinante VW2-1. Las células de bazo obtenidas del grupo de ratones coinyectados con pTC-2-1 y pEDP35 + pEDP40 fueron menos sensibles a la estimulación *in vitro* con paramiosina recombinante.

Ensayos iniciales de protección por inmunización génica con los plásmidos pTC-2-1, pEDP35 y pEDP40 han mostrado niveles altos de protección. Los resultados en la figura 3 muestran que los ratones inmunizados con el pTC-2-1 presentan una reducción en la carga parasitaria de 66%, con relación al grupo control de ratones inyectados con PBS. Este resultado es similar al obtenido con la proteína recombinante. Sin embargo, el grupo de ratones coinyectados con pTC-2-1 más los plásmidos que inducen la expresión de IL-12, resultaron en una reducción de la carga parasitaria de 79%, lo cual sugiere que la IL-12 mejora la protección aunque no modifica el perfil de isotipos de anticuerpos tipo Th1 (Cuadro IV).

Discusión

Se ha sugerido que la paramiosina induce protección contra helmintiasis del ser humano, la respuesta inmune humana contra la paramiosina ha sido relacionada con la

resistencia a la esquistosomiasis¹⁷⁻²² o a filariasis.^{23,24} La resistencia hacia la cisticercosis pudiera también estar relacionada con la respuesta celular en contra del extremo amino terminal de la TPmy, porque un mayor porcentaje de individuos sanos, que viven en zonas endémicas, reaccionaron contra ese tercio, en comparación con los infectados. Por su relevancia, el hallazgo merece un seguimiento especial para confirmar o descartar esta posibilidad.

La respuesta humoral del paciente cisticercoso se dirige preferentemente contra el tercio carboxilo terminal, siendo

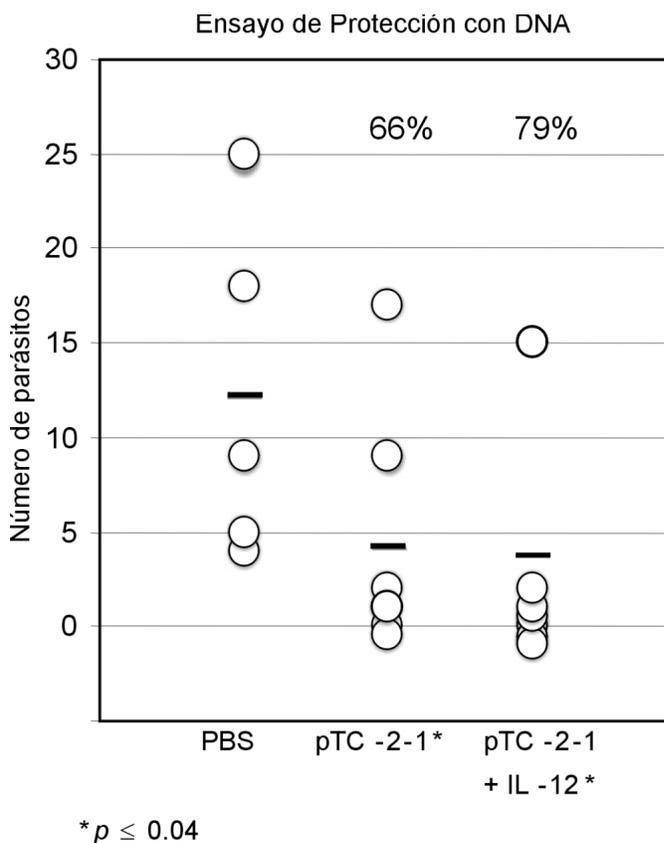


Figura 3. Ensayo de protección por inmunización génica de ratones. Grupos de siete ratones Balb/c hembras de ocho a 10 semanas de edad fueron inmunizados por vía intramuscular, tres veces a intervalos de 15 días con 100 µg de los plásmidos pTC2-1, pEDP35 y pEDP40 (ver Materiales y Métodos). El grupo control fue inyectado bajo el mismo régimen con solución amortiguadora de fosfatos (PBS). Los ratones fueron retados un día después de la última inmunización y sacrificados a los 25 días de infección. Los círculos indican la carga parasitaria de cada ratón y las barras horizontales indican el promedio del grupo. En la parte superior de la gráfica se muestran los porcentajes de protección correspondientes.

Cuadro V. Proliferación de células de bazo de ratones inmunizados génicamente

Inmunización	Índices de Estimulación [¶]			
	Paramiosina recombinante 0.1mg/ml	1.0mg/ml	10mg/ml	ConA 5.0mg/ml
Solución salina	1.2	1.2	1.4	27.1
VW2-1	-	-	7.3 [§]	-
Vectores plasmídicos				
pTC-2-1	7.0 [§]	10.6 [§]	9.3 [§]	23.4
pTC-2-1 + IL-12	4.2 [§]	13.1 [§]	9.2 [§]	29.2

[¶]Los valores reportados son índices de estimulación calculados a partir de los promedios de incorporación de radioactividad (cuadruplicados) para cada grupo experimental después de un pulso de 18 hrs. con ¹³H]timidina.

[§]Los valores absolutos para cada grupo experimental fueron estadísticamente significativos con relación a los valores absolutos del grupo control de células no-estimuladas ($p < 0.02$).

el tercio aminoterminal pobremente reconocido. En los ratones inmunizados ocurrió el mismo fenómeno que en la infección humana. Cabe hacer notar que los anticuerpos de individuos infectados con *Schistosoma japonicum*, también reconocen preferentemente el tercio carboxilo terminal.³⁵

Es posible que el reconocimiento débil del tercio amino terminal se deba a un bloqueo causado por la unión del C1q en la vecindad del cisticercos. Resultados no mostrados indican que en el extremo amino terminal se localiza la capacidad de unión con el C1q del complemento. Es posible que en el individuo infectado, el C1q se encuentre unido al tercio amino terminal de la TPmy, resultando en una incapacidad del sistema inmune para reconocer a este tercio. Esto podría explicar por qué en dos sistemas (humano y ratón) y por dos métodos (Western blot y ELISA) el tercio amino terminal es el menos reconocido.

Llama la atención la diferencia entre el reconocimiento humoral del tercio amino terminal y del tercio carboxilo terminal, tanto en el humano como en el ratón. Ambos extremos poseen pequeñas regiones con estructura al azar (random-coil) y una gran porción de α -hélice super-enrollada.¹⁴ No hay diferencias conformacionales obvias que expliquen el contraste tan marcado en el reconocimiento de los anticuerpos. Es posible que la respuesta inmune celular en contra del extremo aminoterminal sea consecuencia de que éste puede unirse a la colágena. Existe un receptor con una región de estructura colagénica que se encuentra en macrófagos, el llamado receptor *scavenger*. De hecho, evidencia reciente de nuestro grupo indica que la TPmy interacciona con el receptor *scavenger*, siendo capaz de inducir la internalización de partículas de lipoproteínas de baja densidad (no mostrado). Se ha

sugerido que los antígenos al unirse a este receptor son mejor presentados a los linfocitos T.³⁶ Por lo tanto, el tercio amino terminal puede tener una mayor capacidad de unirse a una célula presentadora como el macrófago que el tercio carboxilo terminal, explicando la mayor proliferación linfocitaria en unos y otros sistemas (humano y ratón). Esta posibilidad también explica la relación entre la respuesta inmune celular y la protección.

Los resultados obtenidos en los ensayos de protección en ratones son altamente prometedores, no solo porque se obtiene un nivel considerable de protección, cercano a 60% por inmunización con el fragmento amino terminal, y de casi 79% en el grupo de ratones coinyectados con pTC-2-1 más los plásmidos que inducen la expresión de IL-12. La protección parece relacionada con la respuesta Th1. Esto es consistente con estudios previos en el mismo modelo murino de cisticercosis por *T. Crassiceps*.³⁷⁻³⁹ Sin embargo, los resultados de los ratones coinyectados con pTC-2-1 más los plásmidos que inducen la expresión de IL-12, que resultaron en la mayor reducción de la carga parasitaria (79%), sugiere que la IL-12 mejora la protección aunque no modifica el perfil de isotipos de anticuerpos tipo Th1. En otras palabras, es posible que un perfil Th2 también contribuya a incrementar la protección.

La evidencia respecto al mecanismo protector que induce la inmunización con paramiosina es interesante, especialmente por la polarización que fue descubierta en ratón entre la respuesta Th1 y Th2. Se sabe que la paramiosina induce protección contra *S. mansoni* o *B. malayi* asociada con hipersensibilidad de tipo tardío o DTH,^{23,40} y que provoca la liberación de linfocinas activadoras de macrófagos contra *S. mansoni*;^{17,40} esto sugiere un mecanismo tipo Th1. En otro sentido, algunos reportes muestran la inducción de protección contra *S. japonicum* con un anticuerpo monoclonal IgE y la inducción de citotoxicidad contra esquistosomas cuando se incubaba el monoclonal con eosinófilos;⁴¹ esto sugiere un mecanismo tipo Th2. Aunque parecen opuestas los dos tipos de evidencia, ambas indican que la resistencia contra este tipo de parásitos tiene un componente celular.

Finalmente, vale la pena notar que también se ha logrado inducir protección en cerdos contra la infección por *S. japonicum*.⁴² La paramiosina puede incluso conferir protección heteróloga. Por ejemplo, la paramiosina de *Caenorhabditis elegans* induce protección contra *Brugia malayi*⁴³ y lo mismo se ha sugerido de *Lumbricus terrestris* contra *Schistosoma japonicum*.⁴⁴ Algo similar encontramos nosotros, porque la paramiosina de *T. solium* induce protección parcial contra *T. crassiceps*. Esta protección heteróloga hace posible continuar utilizando el modelo murino de cisticercosis por *T. crassiceps* para el desarrollo de una vacuna en contra de la cisticercosis porcina basada en TPmy.

Referencias

- Flisser A, Woodhouse E, Larralde C. Human cysticercosis: antigens, antibodies and non-responders. *Clin Exp Immunol* 1980;39:27-37.
- Espinoza B, Ruiz-Palacios G, Tovar A, et al. Characterization by enzyme-linked immunosorbent assay of the humoral immune response in patients with neurocysticercosis and its application in immunodiagnosis. *J Clin Microbiol* 1986;24:536-541.
- Guerra G, Flisser A, Cañedo L, Laclette JP. Biochemical and immunological characterization of antigen B purified from cysticerci of *Taenia solium*. Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives (edited by Flisser et al.). New York: Academic Press; 1982. p. 437-452.
- Plancarte A, Flisser A, Larralde C. Fibronectin-like properties of antigen B from cysticerci of *Taenia solium*. 1982. In: Flisser A, et al. editors Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives. New York: Academic Press; 1982. p. 453-464.
- Laclette JP, Alagón A, Willms K, Torre-Blanco A. Purification of antigen B from *Taenia solium* cysticerci by affinity to mammalian collagen. *J Parasitol* 1990;76:273-275.
- Laclette JP, Merchant MT, Willms K. Histological and ultrastructural localization of antigen B in the metacystode of *Taenia solium*. *J Parasitology* 1987;73:121-129.
- Lumsden RD. Histological studies on the absorptive surface of cestode. II. The synthesis and intracellular transport of protein in the strobilar integument. *Zeitschr Parasitenk* 1966;28:1-13.
- Trimble J, Lumsden RD. Cytochemical characterization of tegument membrane associated carbohydrates in *Taenia crassiceps* larvae. *J Parasitol* 1975;61:665-667.
- Laclette JP, Rodríguez M, Landa A, Arcos L, de Alba P, Mancilla R, Willms K. The coexistence of *Taenia solium* cysticerci and the pig: role of antigen B. *Acta Leidensia* 1989;57:115-122.
- Laclette JP, Skelly P, Merchant M, Shoemaker CB. Aldehyde fixation dramatically alters the immunolocalization pattern of paramyosin in helminth parasites. *Exp Parasitol* 1995;81:140-144.
- Laclette JP, Landa A, Arcos L, Willms K, Davis, AE, Shoemaker CB. Paramyosin is the *Schistosoma mansoni* (Trematoda) homologue of antigen B from *Taenia solium* (Cestoda). *Mol Biochem Parasitol* 1991;44:287-295.
- Landa A, Laclette JP, Nicholson-Weller A, Shoemaker CB. *Taenia solium* paramyosin (AgB): cDNA cloning and recombinant expression of collagen binding and complement inhibitor activity. *Mol Biochem Parasitol* 1993;60:343-347.
- Vargas-Parada L, Laclette JP. Gene structure of *Taenia solium* paramyosin. *Parasitol Res* 2003;89:375-378.
- Cohen C, Parry DA. α -Helical coiled coils and bundles: how to design an α -helical protein. *Prot Struct Funct Genet* 1990;7:1-15.
- Laclette JP, Shoemaker CB, Richter D, Arcos L, Pante N, Cohen C, Bing D, Nicholson-Weller A. Paramyosin inhibits complement C1. *J Immunol* 1992;148:124-128.
- Kalinna B, McManus DP. An IgG (Fc gamma)-binding protein of *Taenia crassiceps* (Cestoda) exhibits sequence homology and antigenic similarity with schistosome paramyosin. *Parasitology* 1993;106:289-296.
- Pearce EJ, James SL, Hieny S, Lanar DE, Sher A. Induction of protective immunity against *Schistosoma mansoni* by vaccination with schistosome paramyosin (Sm97), a nonsurface parasite antigen. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:5678-5682.
- Flanigan TP, King CH, Lett RR, Nanduri J, Mahmoud AA. Induction of resistance to *Schistosoma mansoni* infection in mice by purified parasite paramyosin. *J Clin Invest* 1989;83:1010-1014.
- Richter D, Incani RN, Harn DA. Isotype responses to candidate vaccine antigens in protective sera obtained from mice vaccinated with irradiated cercariae of *Schistosoma mansoni*. *Infect Immun* 1993;61:3003-3011.
- Richter D, Reynolds SR, Harn DA. Candidate vaccine antigens that stimulate the cellular immune response of mice vaccinated with irradiated cercariae of *Schistosoma mansoni*. *J Immunol* 1993;151:256-265.
- Yang W, Waine GJ, McManus DP. Antibodies to *Schistosoma japonicum* (Asian bloodfluke) paramyosin induced by nucleic acid vaccination. *Biochem. Biophys. Res Commun* 1995; 212:1029-1039.
- McManus DP, Wong JY, Zhou J, Cai C, Zeng Q, Smyth D, Li Y, Kalinna BH, Duke MJ, Yi X. Recombinant paramyosin (rec-SJ-97) tested for immunogenicity and vaccine efficacy against *Schistosoma japonicum* in mice and water buffaloes. *Vaccine* 2001;20:870-878.
- Nanduri J, Kazura JW. Paramyosin-enhanced clearance of *Brugia malayi* microfilaraemia in mice. *J Immunol* 1999;143:3359-3363.
- Li BW, Chandrashekar R, Weil GJ. Vaccination with recombinant filarial paramyosin induces partial immunity to *Brugia malayi* infection in birds. *J Immunol* 1993;150:1881-1885.
- Nara T, Matsumoto N, Janecharut T, Matsuda H, Yamamoto K, Irimura T, Nakamura K, Aikawa M, Oswald I, Sher A, Kita K, Kojima S. Demonstration of the target molecule of a protective IgE antibody in secretory glands of *Schistosoma japonicum* larvae. *Int Immunol* 1994;6:963-971.
- Correa-Oliveira R, Pearce EJ, Oliveira GC, et al. The human immune response to defined immunogens of *Schistosoma mansoni*: elevated antibody levels to paramyosin in stool-negative individuals from two endemic areas in Brazil. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 1989;83:798-804.
- Conraths FJ, Harnett MJ, Worms, MJ, Parkhouse RM. Immunological cross-reaction between an Onchocerca paramyosin-like molecule and a microfilaria surface antigen. *Trop Med Parasitol* 1992;43:135-138.
- Vázquez-Talavera J, Solís CF, Terrazas LI, Laclette JP. Characterization and protective potential of the immune response to *Taenia solium* paramyosin in a murine model of cysticercosis. *Infect Immun* 2001;69(9):5412-5416.
- Sciutto E, Fragoso G, Trueba L, Lemus D, Montoya RM, Díaz ML, Govezensky T, Lomeli C, Tapia G, Larralde C. Cysticercosis vaccine: cross protecting immunity with *Taenia solium* antigens against experimental murine *Taenia crassiceps* cysticercosis. *Parasite Immunol* 1990;12:687-696.
- Vázquez-Talavera J, Solís CF, Medina-Escutia E, López ZM, Proaño J, Correa D, Laclette JP. Human T and B cell epitope mapping of *Taenia solium* paramyosin. *Parasite Immunol* 2001;23:575-579.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680-685.
- Tang DC, DeVit M, Johnston SA. Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature* 1992;356:152-154.
- Whitton JL, Rodríguez F, Zhang J, Hassett DE. DNA immunization: mechanistic studies. *Vaccine* 1999;(17);1612-1619.
- Flo J, Pérez AB, Tisminetzky S, Baralle F. Superiority of intramuscular route and full length glycoprotein D for DNA vaccination against herpes simplex 2. Enhancement of protection by the co-delivery of the GM-CSF gene. *Vaccine* 2000;3242-3253.
- Nara T, Tanabe K, Mahakunkijcharoen Y, Osada Y, Matsumoto N, Kita K, Kojima S. The B cell epitope of paramyosin recognized by a protective monoclonal IgE antibody to *Schistosoma japonicum*. *Vaccine* 1997;15:79-84.
- Abraham R, Singh A, Mukhopadhyah SK, Basu V, Bal V, S. Rath. Modulation of immunogenicity and antigenicity of proteins by myelination to target scavenger receptors on macrophages. *J Immunol* 1995;154:1-8.
- Sciutto E, Fragoso G, Baca M, De la Cruz V, Lemus L, Lamoyi E. Depressed T-cell proliferation associated with susceptibility to experimental *Taenia crassiceps* infection. *Infect Immun* 1995;63:2277-2281.
- Villa OF, Kuhn RE. Mice infected with the larvae of *Taenia crassiceps* exhibit a Th2-like immune response with concomitant anergy and down regulation of Th1-associated phenomena. *Parasitology* 1996;112:561-570.
- Terrazas LI, Cruz M, Rodríguez-Sosa M, Bojalil R, García-Tamayo FY, Larralde C. Th1-type cytokines improve resistance to murine cysticercosis caused by *Taenia crassiceps*. *Parasitol Res* 1999;85:135-141.
- Sher A, Pearce E, Hieny S, James S. Induction of protective immunity against *Schistosoma mansoni* by a nonliving vaccine. IV. Fractionation and antigenic properties of a soluble adult worm immunoprophylactic activity. *J Immunol* 1986;136:3878-3883.
- Kojima S, Janecharut H, Hata H, Niimura Y. Role of a mouse monoclonal IgE antibody in passive transfer of immunity to *Schistosoma mansoni* infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz Rio J* 1987;82:237-241.
- Chen H, Nara T, Zeng X, Satoh M, Wu G, Jiang W, Yi F, Kojima S, Zhang S, Hirayama K. Vaccination of domestic pig with recombinant paramyosin. against *Schistosoma japonicum* in China. *Vaccine* 2000;18:2142-2146.
- Nanduri J, Kazura JW. Paramyosin-enhanced clearance of *Brugia malayi* microfilaraemia in mice. *J Immunol* 1989;143:3359-3363.
- Wisniewski AV, Kresina TF. Induction of protective immunity to schistosomiasis with immunologically cross-reactive Lumbricus molecules. *Int J Parasitol* 1995;25:503-510.