

03062  
17  
2 eje.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS

UACPyP/CCH

ESTUDIO DE LA SUSCEPTIBILIDAD A LA  
CISTICERCOSIS MURINA: APORTES EN LA  
PREVENCIÓN

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE  
MAESTRIA EN INVESTIGACION  
BIOMEDICA BASICA  
P R E S E N T A :  
BIOL. SABINA FABIOLA VALDEZ ORTEGA

MEXICO, D. F.

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

1994



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

LAS INVESTIGACIONES MATERIA DE ESTA TESIS SE LLEVARON A CABO EN EL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS, DEPTO DE INMUNOLOGIA, UNAM, BAJO LA SUPERVISION DE LA **DRA. EDDA SCIUTTO CONDE**.

AGRADEZCO A LOS DOCTORES **CARLOS LARRALDE Y CARLOS HUITRON** POR SU ORIENTACION, ALIENTO Y APOYO DURANTE MI ESTANCIA EN EL IIB.

AGRADEZCO DE MANERA ESPECIAL A LOS DOCTORES **JUAN PEDRO LACLETTE Y PASCAL HERION** POR SU AMABLE Y AMISTOSA DISPOSICION PARA LA REVISION DE ESTE TRABAJO, ASI COMO SUS COMENTARIOS Y CRITICA DISCUSION.

LA EDICION DEL PRESENTE TRABAJO NO HUBIERA SIDO POSIBLE SIN LA AYUDA DE **VIOLETA AGUILAR, DANIEL MENENDEZ, JOSE AVILES Y ENRIQUE VAZQUEZ**

## **JURADO EXAMINADOR**

<b>Presidente</b>	<b>Dr. Ruy Pérez Tamayo</b>
<b>Vocal</b>	<b>Dra. Edda Lydia Sciutto Conde</b>
<b>Secretario</b>	<b>Dr. Juan Pedro Laclette San Román</b>
<b>Suplente</b>	<b>Dra. Aline Schunemann de Aluja</b>
<b>Suplente</b>	<b>Dr. Pascal Herion Scohy</b>

Soy parte del sol,  
como mi ojo es parte de mi.  
Mi pie sabe que soy parte de la tierra,  
y mi sangre es parte del mar.  
Mi alma sabe que soy parte de la  
raza humana,  
y mi espíritu es parte de mi nación.  
Y en mi propio ser, soy parte de mi familia

David Herbert Lawrence

A LAS PERSONAS MAS QUERIDAS Y FUENTE DE MI  
INSPIRACION

MIS PADRES

*CARMEN ORTEGA DE VALDEZ*

*HERIBERTO VALDEZ RAMIREZ*

MIS HERMANOS

*MARIA TALIA VALDEZ ORTEGA*

*JAIME VALDEZ ORTEGA*

POR NUESTRA HERMOSA INFANCIA JUNTOS, A MI TIO

***HUMBERTO CASILLAS RAMIREZ***

POR SU CARÍÑO Y SU APOYO, A MIS TIAS

***ROSITA, ALEJANDRA, SILVIA, ANTONIA, PATRICIA, BELEM,***

***CARMEN Y LUISA CASILLAS RAMIREZ***

A MIS MARAVILLOSOS AMIGOS

***FLOR DE MARIA PEÑA***

***JESUS VEGA ALLENDE***

**A RAFAEL S. SAAVEDRA DURAN,**  
**POR LOS GRANDIOSOS MOMENTOS QUE TUVIMOS JUNTOS,**  
**PERO SOBRE TODO, POR ESCUCHARME, APOYARME Y HABER**  
**ESTADO SIEMPRE A MI LADO.**



A MIS AMIGOS DEL INSTITUTO DE INV. BIOM.

IRMA AGUILAR	ALEJANDRA NUÑEZ
TZIPE GOVEZENSKY	VIOLETA AGUILAR
ANDREA TOLEDO	CARMEN CRUZ
MARIA DE JESUS A.	ALEJANDRO PADILLA
MIGUEL RUBIO	IGNACIO TERRAZAS
JORGE MONTOR	DANIEL MENENDEZ
BERNARDO REINA	JORGE CALDERON
CARLOS CASTELLANOS	JOSE AVILES
ENRIQUE VAZQUEZ	JUAN J. CARREÑO.

## INDICE

	PAGINA
I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCION	2
III. ANTECEDENTES Y OBJETIVO	7
IV. TRABAJO DE INVESTIGACION	15
IMMUNIZATION AGAINST <i>Taenia crassiceps</i> CYSTICERCOSIS : IDENTIFICATION OF THE MOST PROMISING ANTIGENS IN THE INDUCTION OF PROTECTIVE IMMUNITY. <u>Valdez F.</u> , Hernández M., Govezensky T., Frago G. and Sciutto E. .	
V. DISCUSION GENERAL Y PERSPECTIVAS	30
VI. REFERENCIAS	37
VII. APENDICES	
A. AVANCES EN EL DESARROLLO DE NUEVAS VACUNAS.	44
B. AVANCES EN EL DESARROLLO DE VACUNAS CONTRA PARASITOS.	67

## RESUMEN

La existencia de inmunidad cruzada entre los cisticercos de *Taenia solium* y *Taenia crassiceps*, establece a la cisticercosis experimental murina, causada por este último, como un modelo conveniente donde evaluar antígenos promisorios para desarrollar una vacuna contra la cisticercosis porcina por *T. solium*. Dado que los antígenos totales de *T. crassiceps* inducen niveles significativos de protección contra la cisticercosis porcina, desarrollamos el presente trabajo para identificar los principales antígenos asociados a protección. Doce diferentes fracciones antigénicas, aisladas del fluido vesicular de cisticercos de *T. crassiceps*, fueron evaluadas en su capacidad de inducir resistencia en ratones machos BALB/cAnN contra el desafío con 10 cisticercos de *T. crassiceps*. Se identificaron tres grupos de fracciones antigénicas: protectoras (200, 123, 74, 66, 56, 40-50, 27 y 8-14 kDa), facilitadores (220-205 kDa), e irrelevantes (150-160, 108 y 93 kDa) de acuerdo a su efecto sobre la carga parasitaria. Considerando su capacidad protectora, las tres fracciones antigénicas más promisorias (56, 66 y 74 kDa) fueron reevaluadas en inmunizaciones subcutáneas y se obtuvo un alto nivel de protección.

## ***INTRODUCCION***

Las cisticercosis humana y porcina causadas por *Taenia solium* representan un problema de salud y socioeconómico respectivamente en los países en vía de desarrollo, especialmente en áreas donde la falta de instalaciones sanitarias favorece el ciclo de transmisión de este parásito, como en el caso de muchas regiones de Asia, Africa y Latinoamérica (Mahajan, 1982; Schenone *et al.*, 1982).

La permanencia del ciclo parasitario se favorece, en primer lugar, por la práctica del fecalismo al aire libre y por los métodos de crianza rústica de cerdos, lo que aumenta la probabilidad del contacto entre el cerdo y las excretas humanas contaminadas. Es así, que la población de cerdos criados rústicamente presenta la mayor incidencia de cisticercosis. Esto es de especial interés en México, considerando que la crianza rústica representa aproximadamente el 40 % del total de la producción porcina (Mazón, 1991). El problema de la transmisión se agrava puesto que la mayoría de los cerdos criados rústicamente se introduce al consumo sin someterse a inspección sanitaria (Aluja, 1982).

### **Ciclo de vida de *T. solium***

La teniasis-cisticercosis es una parasitosis que involucra una intrincada relación hospedero-parásito. En su ciclo de vida *T. solium* requiere dos hospederos: cuando los hospederos intermediarios, el cerdo y el hombre, se infectan con huevecillos del parásito, éstos se diferencian a metacéstodos (cisticercos) en algún compartimento anatómico del hospedero. Cuando el humano, que es el único hospedero definitivo, come carne de cerdo infectada, los cisticercos llegan al intestino delgado donde se desarrollan y dan lugar a

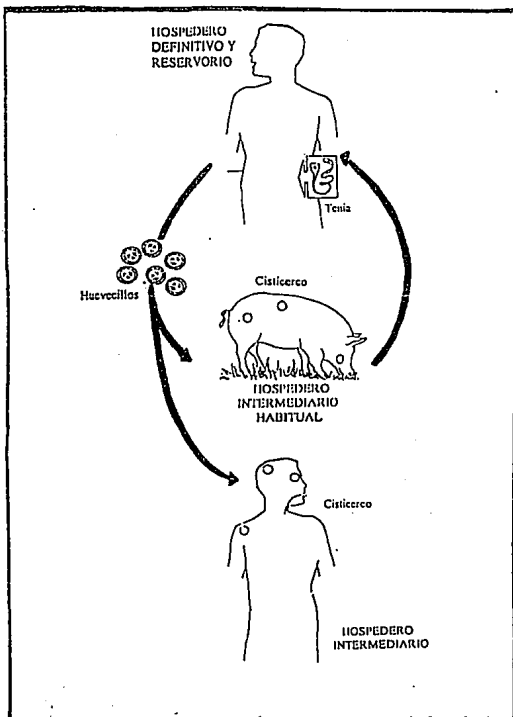


Figura 1. Ciclo de vida de *Taenia solium*

la forma adulta del parásito (la tenia o solitaria). En el intestino, la tenia se diferencia sexualmente y produce millones de huevecillos que salen al medio en las heces. El ciclo se completa cuando el hombre o el cerdo ingieren los huevecillos (Fig. 1). El requerimiento indispensable del cerdo como hospedero intermediario para la mantención del ciclo nos ofrece la posibilidad de interferir en la transmisión. Si pudiéramos modificar los niveles de infección en los cerdos, reduciéndolos o anulándolos, incidiríamos en la posibilidad del parásito para desarrollarse hasta la fase adulta y como resultado podríamos reducir la transmisión de la cisticercosis.

### **La cisticercosis por *T. solium*, un problema de salud y socioeconómico en México**

En el humano *T. solium* afecta preferentemente al sistema nervioso central, causando neurocisticercosis, lo que puede originar perturbaciones sensoriales o motoras leves, cefaleas, hipertensión endocraneana, epilepsia (Del Bruto y Sotelo, 1988; Medina *et al.*, 1990) y otros graves trastornos neurológicos que pueden llevar hasta la muerte (Sotelo *et al.*, 1985; Grisolia y Wiederholt, 1982). La cisticercosis ocular se presenta con menor frecuencia, y es debida al establecimiento del parásito dentro del globo ocular o detrás de la retina; también existen cisticercosis espinal, subcutánea y muscular (Schenone *et al.*, 1982). Es importante señalar que muchos de los casos de neurocisticercosis humana son asintomáticos, con valores que varían entre 25 y 80 % dependiendo de la fuente de obtención de los datos, y que sólo se identifican en la autopsia (Albores y Altamirano, 1971; Rabiela *et al.*, 1982). La neurocisticercosis sintomática afecta también la economía, ya que el enfermo se ve imposibilitado para desarrollar una vida activa, requiere

cuidados médicos especiales no sólo para su diagnóstico sino también para su tratamiento, lo que repercute en sus ingresos monetarios y afecta la economía individual y nacional. En el apéndice B de este trabajo se da información sobre la respuesta inmune a esta parasitosis.

En cuanto a la teniasis humana, si bien no representa un grave problema de salud, se asocia a síntomas leves como insomnio, anorexia o bulimia y trastornos abdominales (Tay *et al.*, 1984). Es de gran importancia en el mantenimiento del ciclo parasitario considerando que cada teniásico libera al ambiente millones de huevecillos que pueden ser ingeridos por cerdos y humanos al contaminar, por ejemplo, las aguas de riego agrícola.

### **Prevalencia de la enfermedad**

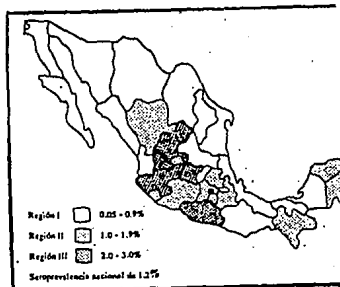
Los primeros intentos por conocer la prevalencia de la cisticercosis humana se hicieron a partir de autopsias y revelaron cifras de neurocisticercosis del 1 al 3 % en México (Albores y Altamirano, 1971; Rabiela *et al.*, 1982). A finales de la década de los 70 se realizó la Primera Encuesta Seroepidemiológica Nacional en donde se analizaron más de 18,000 sueros humanos a fin de conocer la prevalencia de diferentes padecimientos, incluyendo la cisticercosis (Woodhouse *et al.*, 1982). En esta encuesta se encontró una seropositividad global del 1 % y que la prevalencia de los positivos era mayor en las áreas relacionadas a la porcicultura, pero no se encontró relación con la clase socioeconómica. Recientemente se terminó en México la Segunda Encuesta Seroepidemiológica Nacional en donde se analizaron aproximadamente 70,000 sueros humanos. Los resultados señalan que el porcentaje de seropositividad promedio es del orden del 1.2 %, con



CUADRO 2 Seroprevalencia de anticuerpos contra <i>T. solium</i> en la Entidad Federativa, México 1987-1988			
Entidad	Población muestral	Seropositivos <sup>a</sup>	
		Población	Porcentaje
Baja California Sur	1 739	1	0.06
Sonora	2 251	5	0.22
Baja California	1 605	5	0.31
Tabasco	2 958	10	0.34
San Luis Potosí	2 125	10	0.47
Tlaxcala	1 434	7	0.49
Nuevo León	3 174	16	0.50
Tamaulipas	1 937	10	0.52
Veracruz	2 257	12	0.53
Coahuila	1 997	12	0.60
Oaxaca	1 709	12	0.70
Sinaloa	2 292	17	0.74
Chihuahua	2 194	17	0.77
Querétaro	1 642	13	0.79
Campeche	1 541	13	0.84
Morelos	1 254	13	1.04
Chiapas	1 912	20	1.05
Hidalgo	2 042	23	1.13
Estado de México	2 837	34	1.20
Yucatán	1 775	23	1.30
Colima	1 703	23	1.35
Puebla	2 814	38	1.35
Michoacán	2 036	29	1.42
Quintana Roo	1 515	22	1.45
Agascalientes	1 518	24	1.58
Durango	1 963	31	1.58
Nayarit	1 474	30	2.04
Jalisco	3 563	75	2.10
Guanajuato	2 970	66	2.22
Zacatecas	2 162	58	2.73
Distrito Federal	2 644	78	2.95
Guerrero	1 717	51	2.97
Total	66 754	799	1.20

<sup>a</sup> Títulos por ITSA  $\geq 1:80$

(a) Seroprevalencia de anticuerpos contra *T. solium* por entidad federativa.



(b) Población de 1 a 98 años según seroprevalencia de anticuerpos por entidad federativa.

Figura 2. Distribución de seropositividad a *Taenia solium* en la República Mexicana (Larralde et al., 1992).

grandes y significativas diferencias según los estados. Si bien la presencia de anticuerpos en suero no es un marcador de enfermedad, sí sugiere un gran contacto con los antígenos de cisticercos en la población mexicana (Fig. 2) (Larralde *et al.*, 1992). Mientras tanto, la prevalencia de la teniasis sólo ha sido determinada en comunidades pequeñas de diferentes estados en donde han trabajado distintos grupos de investigación (Schantz y Sarti-Gutierrez, 1988; Keilbach, 1989). La falta de información más precisa sobre esta fase de la parasitosis probablemente se deba a que rara vez un teniásico consulta un servicio médico, aunado a la baja sensibilidad y especificidad de los métodos de diagnóstico.

Con el fin de avanzar en el conocimiento sobre la prevalencia de la cisticercosis humana y los factores de riesgo para su establecimiento y transferencia, se han realizado estudios pilotos en comunidades pequeñas. Estos estudios permitieron detectar núcleos familiares donde coexisten individuos teniásicos e individuos seropositivos, que además están en contacto con cerdos infectados. Estos resultados apuntan al contacto íntimo con el teniásico como un importante factor en la transmisión de la cisticercosis (Sarti-Gutierrez *et al.*, 1988; Díaz-Camacho *et al.*, 1989; López Samano, 1990; Aguilera-García y Galvan-Cervantes, 1989). Sin embargo, dado que en el país hay una amplia distribución de personas seropositivas que no están en contacto directo con cerdos infectados ni individuos teniásicos, es muy posible que, además del contacto íntimo, existan mecanismos de transmisión de los huevecillos dependientes de algún factor de distribución universal, como el aire. Esto no sería sorprendente, dado que en México el fecalismo al aire libre es altamente frecuente, inclusive en las zonas urbanas.

## ***ANTECEDENTES Y OBJETIVO DEL PROYECTO***

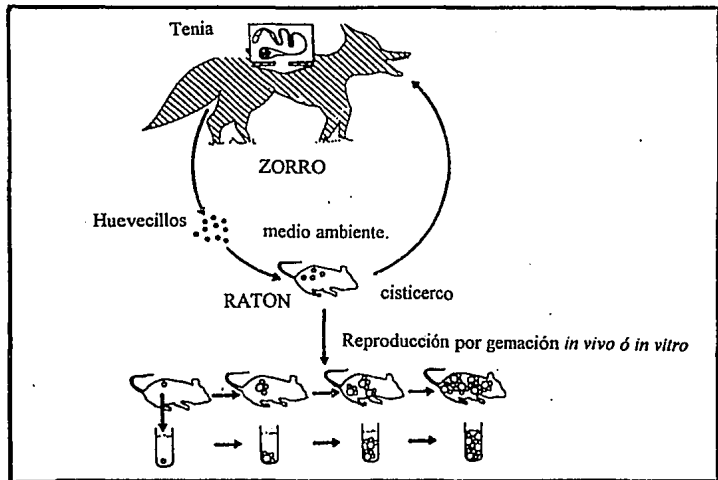


Figura 3. Ciclo de vida de *Taenia crassiceps*.

Dadas las limitaciones para instalar un modelo de la cisticercosis por *T. solium* experimentalmente, hemos contemplado el estudio de *Taenia crassiceps*, y de la cisticercosis murina a fin de orientar la investigación en la cisticercosis por *T. solium*. Este céstodo [*Taenia crassiceps* (Zeder 1800) Rudolphi, 1810] vive en su fase adulta en el intestino delgado de felinos y cánidos, especialmente el zorro. En la etapa de cisticerco se reproduce en roedores y menos frecuentemente en lagomorfos, insectívoros, carnívoros y primates (Fig. 3). En roedores infectados naturalmente, los cisticercos se localizan subcutáneamente cerca de la axila, cuello y menos frecuentemente entre la escápula o en la región inguinal. Ocasionalmente los cisticercos pueden desarrollarse en la pleura o en la cavidad peritoneal. La infección natural en la cavidad peritoneal generalmente acompaña la infección en otro sitio. Además de la forma sexual de reproducción, este parásito es capaz de dividirse por gemación polar múltiple (Freeman, 1962). Esta forma de reproducción asexual se ha utilizado para mantenerlo en el laboratorio a través de la inoculación del cisticerco en la cavidad peritoneal de ratones, localización que en condiciones experimentales, permite que se reproduzca óptimamente (Kroeze y Freeman, 1982). Así, este modelo experimental de cisticercosis resulta accesible y sencillo de mantener, y permite un estudio sistemático y controlado de los fenómenos inmunológicos que se suceden en la relación hospedero-parásito.

El uso de la cisticercosis murina como modelo experimental adquiere mayor interés considerando las similitudes entre *T. solium* y *T. crassiceps*, entre las que figuran:

- Ambos requieren hospederos intermediarios (hombre y/o cerdo y roedores respectivamente) donde se encuentran como cisticercos y en la fase adulta requieren un hospedero definitivo (humanos y cánidos o felinos).

- Existe una reacción cruzada de más del 90 % entre sus antígenos (Larralde *et al.*, 1989).

- Los antígenos de *T. solium* se pueden reemplazar por los de *T. crassiceps* en el inmunodiagnostico de la cisticercosis humana (Larralde *et al.*, 1990; Kuntz *et al.*, 1989; Ramos-Kuri *et al.*, 1992), y en la inmunoprevención de la cisticercosis porcina (Sciutto *et al.*, 1994).

Sin embargo, no hay que olvidar que es un modelo experimental, y como tal puede tener o presentar ciertas limitaciones, las cuales pueden representar desventajas en relación a lo que se pretende estudiar.

Utilizando la accesibilidad de este modelo de cisticercosis se evaluó la factibilidad de una vacuna inmunizando ratones con un extracto total de *T. crassiceps* y con un extracto total de *T. solium* y desafiando los ratones con cisticercos de *T. crassiceps*. Los resultados indicaron que ambos tipos de extractos antigénicos son igualmente eficaces en la protección contra la cisticercosis murina (Sciutto *et al.*, 1990). Estos resultados sirvieron de base para el desarrollo de protocolos de inmunización en cerdos, usando como inmunógeno un extracto total de cisticercos de *T. crassiceps* y desafiando con *T. solium*. Las mejores condiciones de inmunización permitieron obtener una reducción de la carga parasitaria de más del 50 % (Sciutto *et al.*, 1994). Parece entonces factible que la cisticercosis murina pueda utilizarse como

modelo donde evaluar antígenos para desarrollar una vacuna. Además, es importante señalar la capacidad de producción de antígenos a partir de los cisticercos de *T. crassiceps*, considerando su rápido y extenso crecimiento en el ratón.

### **La respuesta inmune y la inducción de protección**

Los parásitos presentan epítopos diferentes al sistema inmune, capaces de estimular en diferente grado un extenso conjunto de células que los reconocen. Este reconocimiento activa diferentes sistemas efectores. Así, tenemos una gran diversidad de sistemas efectores disparados por estímulos inducidos por epítopos reconocidos diferencialmente:

a) Epítopos estimuladores de células B y desencadenadores de una respuesta humoral protectora.

b) Epítopos pobremente inmunogénicos.

c) Epítopos que presentan reacción cruzada con moléculas del hospedero y que pueden causar problemas de autoinmunidad.

d) Epítopos inductores de supresión de la respuesta inmune, que favorecen el establecimiento del patógeno.

e) Epítopos reconocidos por células T citotóxicas (Tc) y/o por células T cooperadoras (Th) (Roitt, 1989).

Actualmente los intentos para prevenir enfermedades virales, bacterianas y parasitarias a través del uso de vacunas, consideran la posibilidad de obtener una respuesta inmune óptima hacia epítomos protectores y eliminar los que sean potencialmente desventajosos (en este sentido, y considerando lo amplio de la información existente, en el Apéndice A se incluyen algunos datos con relación al desarrollo de nuevas vacunas). Simultáneamente, los avances en el conocimiento de las moléculas y de los mecanismos del sistema inmune aumentan la esperanza de mejorar las vacunas y optar por esta forma de prevención para un conjunto extenso de enfermedades parasitarias (en el Apéndice B se incluye información sobre el desarrollo de vacunas contra algunas parasitosis). Sin embargo, hay que considerar que el uso de antígenos aislados tiene asociado un costo, tomando en cuenta la complejidad de eventos inmunológicos asociados a la protección, por ejemplo (a) la inducción de cooperación entre células T, B y presentadoras de antígeno, la cual requiere cierto grado de complejidad antigénica, (b) la exposición diferencial de antígenos inductores de protección en diferentes fases del ciclo parasitario, y (c) la presencia de variación antigénica entre otros. Así, la omisión de epítomos puede limitar la efectividad de las vacunas obtenidas.

### **Influencia del Complejo Principal de Histocompatibilidad en algunas parasitosis**

Entre los genes que se han estudiado respecto a su asociación con la resistencia a infecciones parasitarias figuran los del Complejo Principal de Histocompatibilidad (CPH) y se han encontrado, en algunas infecciones, asociaciones con susceptibilidad. Así, en el ratón los genes del CPH



(denominado H-2) influyen en la respuesta a la infección con *Trichinella spiralis*. De esta forma, ratones con haplotipo H-2<sup>a</sup> son capaces de expulsar del intestino a los parásitos rápidamente y los parásitos hembras tienen una baja fecundidad, en tanto que los ratones con haplotipos H-2<sup>k</sup>, H-2<sup>b</sup>, H-2<sup>d</sup> y H-2<sup>m</sup> responden más lentamente, retienen por más días a los parásitos adultos y los parásitos hembras son más fecundas. Los datos obtenidos con ratones recombinantes sugieren que los alelos del loci H-2K tienen una fuerte influencia en la inmunidad, en tanto que los alelos del loci H-2D ejercen un importante efecto modulador (Wakelin, 1980). En concordancia con la influencia del H-2 en la resistencia a este parásito, Wassom y colaboradores (1983) encontraron que estos genes influyen en la capacidad del hospedero para resistir una infección primaria y que los genes que no pertenecen al H-2 influyen en la susceptibilidad, sobre todo en ratones con haplotipos H-2<sup>k</sup> y H-2<sup>b</sup>. En las cepas congénicas de H-2 más resistentes a *T. spiralis* (haplotipos q, f y s), las células presentadoras de antígenos exponen en su superficie los antígenos del parásito asociados a los antígenos IA y estos ratones carecen de la expresión de antígenos IE en sus células. Aquellas cepas de ratones que expresan antígenos IE resultan más susceptibles (haplotipos k, p, r y h), lo que sugiere que estos antígenos están mediando la activación de poblaciones linfoides supresoras. También se identificó al alelo Ts-1 del gene A $\beta$  del complejo H-2 que puede funcionar como un gene de respuesta inmune, y al alelo Ts-2 de un gene localizado entre las regiones S y D que podría controlar la respuesta de las células T (Wakelin, 1985; Wasson *et al.*, 1987). Por otro lado, en *Trichuris muris*, estudiando la expulsión de los helmintos del intestino, se encontró que el haplotipo H-2<sup>k</sup> es más susceptible que haplotipos H-2<sup>b</sup> o H-2<sup>a</sup> (Else y Wakelin, 1988), y que los genes del H-2 y del fondo genético tienen un papel importante en el control de la respuesta inmune

humoral hacia la infección (Else y Wakelin, 1989). El H-2 también influye en la susceptibilidad a la infección por *Schistosoma*. Cepas congénicas en H-2 muestran diferencias en la mortalidad y en su respuesta inmune hacia este parásito, y se ha reportado que la respuesta inmune de ratones vacunados con parásitos atenuados de *S. mansoni* es más eficiente si tienen haplotipos H-2<sup>b</sup> y H-2<sup>d</sup> (Wakelin, 1985). Se ha propuesto además que podría existir control genético a través del H-2 en el repertorio de anticuerpos hacia antígenos secretados por *Ascaris*, sin descartar la posible influencia del fondo genético (Kennedy *et al.*, 1986). Existen evidencias que sugieren que el H-2 se asocia a la eficiencia de la respuesta inmune hacia bacterias de *Salmonella typhimurium*, y como en los ejemplos anteriores, también hay influencia de genes fuera del H-2 (Naucliel *et al.*, 1988).

En el caso de la cisticercosis experimental murina por *T. crassiceps*, hemos observado que la susceptibilidad innata a la infección se asocia al haplotipo del hospedero, siendo los ratones de haplotipo H-2<sup>d</sup> los más susceptibles mientras que los de haplotipo H-2<sup>b</sup> y H-2<sup>k</sup> son resistentes (Larralde *et al.*, 1989; Sciutto *et al.*, 1991). También el sexo se relaciona con diferencias de susceptibilidad a esta parasitosis, las hembras son más susceptibles que los machos en todas las cepas, y esto se atribuye a una influencia del sistema endocrino sobre el sistema inmune (Huerta *et al.*, 1992; Bojalil *et al.*, 1993). En la cisticercosis murina por *T. taeniaeformis* también se ha reportado influencia del H-2 en la susceptibilidad (Mitchell, 1982).

Considerando las diferencias individuales en la capacidad de control de infecciones parasitarias, es también esperable una amplia distribución de eficiencias de vacunación en una población genéticamente heterogénea. La identificación de antígenos asociados a protección, tanto en individuos

susceptibles como en individuos resistentes, podría aumentar la eficiencia de la vacunación en la población.

El objetivo del presente proyecto es contribuir al diseño de una vacuna contra la cisticercosis porcina utilizando el modelo de cisticercosis murina para identificar antígenos potencialmente interesantes.

***TRABAJO DE INVESTIGACION***

THE JOURNAL OF  
**PARASITOLOGY**

*Founded by Henry Baldwin Ward*

Gerald W. Esch, Editor  
Department of Biology  
Box 7629, Reynolda Station  
Wake Forest University  
Winston-Salem, NC 27109

February 17, 1994

Dr. Edda Scitutto  
Instituto de Investigaciones Biomédicas  
UNAM  
Apdo. Postal 70228  
México, D. F. 04510, MÉXICO

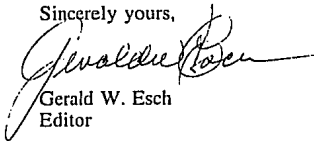
Dear Dr. Scitutto,

Herewith enclosed are three reviews of your ms., GE-122. Two of the referees say to publish it and a third says no. On the recommendation of our Associate Editor for Immunology, Dr. Don Wassom, I have decided to accept the paper for publication following revision. Please consider the referee's comments as you revise. I have marked, extensively, one copy in blue pencil. Also, remove the label at the top of Figure 1. In Figure 2, two graphs are skewed with respect to each other and the "millimeters" at the bottom. This needs to be fixed. Finally, we do not accept photo reductions in our Figures or our Tables. Change accordingly.

I am enclosing a reprint of our Policy and Guidelines for Authors publishing in the *Journal of Parasitology*. Please follow them carefully as you revise. It will make my job of editing easier to do and will expedite publication of your paper.

I look forward to working with you.

Sincerely yours,



Gerald W. Esch  
Editor

Telephone (910) 759-5323 FAX (910) 759-6008

Email: [esch@wfu.edu](mailto:esch@wfu.edu)

The *Journal* is an official publication of the American Society of Parasitologists.

IMMUNIZATION AGAINST TAENIA CRASSICEPS CYSTICERCOSIS:  
IDENTIFICATION OF THE MOST PROMISING ANTIGENS IN THE  
INDUCTION OF PROTECTIVE IMMUNITY

F., Valdez, M., Hernández, T., Govezensky, G., Fragoso, and E., Sciutto.  
Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas.  
Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F.

Mailing Address:  
Dr. Edda Sciutto  
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM  
Apdo. Postal 70228  
México, D.F. 04510, México.  
Fax Number: 5500048

**ABSTRACT:** Cross immunity between Taenia solium and Taenia crassiceps parasites points to T. crassiceps cysticercosis as a convenient model to test promising antigens aimed at the development of a vaccine against T. solium cysticercosis. Since total antigens from T. crassiceps metacestodes induce significant levels of protection in pigs against T. solium cysticercosis, we initiated this work to identify the most interesting antigens involved in protection. Twelve different antigen fractions isolated from T. crassiceps cysticerci were evaluated with respect to their capacity to induce resistance against a challenge with 10 T. crassiceps cysticerci in male mice BALB/cAnN. Mice were intraperitoneally immunized with 2 doses of each antigen; 5 or 15  $\mu\text{g}$  per mouse. The 12 antigen fractions were classified as protecting (200, 123, 74, 66, 56, 40-50, 27 and 8-14 kDa), facilitating (220-205 kDa) or irrelevant (150-160, 93, 108 kDa), according to their effect on the parasite load. The 3 most promising antigen fractions were reevaluated via subcutaneous immunization with Freund's complete adjuvant. High level of protection was obtained when antigen fractions of 56, 66 and 74 kDa were used together. Interestingly, antigens with similar molecular weights were also detected in early steps of differentiation in T. solium cysticercosis. These observations may be helpful in the development of a synthetic or a recombinant vaccine against cysticercosis.

Taenia solium cysticercosis is an important socioeconomic problem in Mexico, Latin America, Asia and Africa (Mahajan, 1982; Schenone et al., 1982; Gemmell et al., 1985). In Europe it stopped being a health problem during this century, having been eradicated by the application of sanitary engineering, personal hygiene, effective inspection of slaughter-houses, improved hog rearing and a general improvement in living conditions. In contrast, in Mexico as in other developing countries, conditions which favor transmission persist: more than 40 % of pork consumed in Mexico are from areas where sanitation is poor (Mazon-Rubio, 1991), meat inspection is inadequate and unsound environmental and behavioral habits prevail (Aluja, 1982; Sartí-Gutiérrez et al., 1988; Keilbach et al., 1989). The life cycle of this parasite includes a larval phase which may occur either in the pig or in man, or both, and the cycle is completed when the man ingests infected pork. Porcine cysticercosis is, therefore, indispensable in maintaining the life cycle. This offers the possibility of interfering with this life cycle by modifying the prevalence of pork cysticercosis through vaccination which is probably a more realistic measure than those mentioned above to successfully interrupt transmission.

We used the experimental T. crassiceps murine cysticercosis as a model to evaluate immunogens in the design of a vaccine. The value of this system reflects the antigenic cross-reactivity between both cestodes (Larralde et al., 1990; Kunz et al., 1990; Ramos-Kuri et al., 1992), the fact that the life cycles of the 2 cestodes are remarkably similar and that there is a high growth rate of this parasite within the peritoneal cavity of the mouse (Larralde et al., 1988, 1989).



## MATERIAL AND METHODS

BALB/cAnN male mice of 4 to 6 wk of age were employed. They were bred in our animal facilities by the brother-sister inbreeding system over 20 generations, starting with original stock from Jackson Labs in 1982. Taenia crassiceps cysticerci used in this study were of the ORF strain, supplied by Dr. B. Enders (Behringwerke, Marburg, Germany) in 1986, and maintained in our laboratory by intraperitoneal inoculation of 20 small larvae in female BALB/cAnN mice 4-6 wk old (Freeman, 1962). The parasites were harvested after 60-90 days post-infection (pi).

Parasites from infected BALB/cAnN female mice were recovered in cold 0.01 M phosphate buffered saline, pH 7.2 containing protease inhibitors (0.006 % phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF) and 0.04 % sodium p-hydroxi mercuribenzoate (PCMB) (Sigma Chemical Co., St. Louis MO), and washed in the same buffer with a 1:10 (parasite:PBS) ratio. To recover cysticerci vesicular fluid, parasites were suspended in a minimal amount of buffer and centrifuged at 25,000 g for 60 min, at 4C. The pellet containing the cysticerci membranes was discarded; the protein content of the vesicular fluid was determined using Lowry's method (Lowry et al., 1951).

Sera from T. crassiceps infected mice and from human neurocysticercosis patients were used. Sera from pork experimentally infected with T. solium (250,000 eggs/pig) were used 30 (early) and 60 (late) days after infection.

Antigens from T. crassiceps cysticerci were separated by SDS-PAGE following the protocol of Laemmli as described elsewhere (Larralde et al., 1986). High (220 to 56 kDa) and low (50 to 8 kDa) molecular weight antigens were separated in 7 % and 15 % polyacrylamide gels, respectively, to optimize the resolution of the complex antigen mixture, using 3 or 8 mg of total antigen for analytic or preparative gels. After protein separation the edge of the gel was cut, fixed and stained with 0.1 % Coomassie/Blue R-250 and used as a reference. Percentage quantitation of each identified antigen fraction relative to the total protein in the mixture was calculated using a Beckman DU-8B Spectrophotometer. Bands to be cut were visualized with 4 M sodium acetate for 20-40 min (Higgins and Dahmus, 1970). The cut bands were washed with distilled water to remove the remaining sodium acetate before homogenizing the gel for immunization. Immunoblotting of the vesicular fluid was performed as described elsewhere (Larralde et al., 1986).

Eight to 16 mice per group were intraperitoneally or subcutaneously immunized. Intraperitoneal (ip) injections consisted of 5 or 15  $\mu$ g/mouse of each antigen fraction. Subcutaneous (sc) injections consisted of 5  $\mu$ g of each antigen fraction per mouse. Control animals were immunized with 7 % or 15 % polyacrylamide gels containing total vesicular fluid antigens, or no antigens.

For sc immunizations, either Freund's complete adjuvant (FCA) was used at a ratio of 1:1 antigen/adjuvant, or muramyl dipeptide (MDP, 15  $\mu$ g per mouse) previously homogenized in incomplete Freund's adjuvant at a ratio of 1:1 antigen/adjuvant. Aluminium hydroxide was also employed at 4  $\mu$ g/mouse for ip immunizations.

Mice were ip challenged 15 days after immunization with 10 non-budding cysticerci (2-3 mm). Thirty days after the challenge, mice were killed and the number of cysticerci in the peritoneal cavity was determined by counting the parasites recovered from each mouse. Results were statistically analyzed by multifactorial analysis of variance ANOVA (Anonymous, 1985).

## RESULTS

To identify the antigens of T. crassiceps involved in protective immunity against murine cysticercosis, mice were immunized with several antigen fractions and challenged with larvae 15 days later. The concentration of each fraction was calculated by gel densitometry scan (Fig. 1). Mice were immunized with 12 different antigenic complexes ranging from 220 to 56 kDa (Table I) and from 50 to 8 kDa (Table II). Both immunization doses, i.e., 5 and 15  $\mu$ g, of antigens of 200, 74, 66, 56, 40-50 and 8-14 kDa provoked a statistically ( $P < 0.01$ ) significant decrease in the parasite load when compared with non-immunized animals; antigens of 150-160, 108 and 93 kDa at both doses, i.e., 5 and 15  $\mu$ g, and 220-205 kDa at the low dose (5  $\mu$ g) did not significantly affect ( $P < 0.01$ ) the parasite load. Antigens of 123 kDa induced protection only with the higher dose and 27 kDa antigens protected with the low dose. On the other hand, antigens of 220-205 kDa at 15  $\mu$ g/mouse significantly increased ( $P < 0.01$ ) the parasite load (Tables I, II). All the cysticerci recovered both from immunized and non-immunized mice were viable by appearance (cysts containing a clear transparent fluid). 7 % or 15 %

gel injected mice were respectively used as non-immunized control with immunizations of > 50 kDa or < 50 kDa.

From the 8 protective antigen fractions detected (56, 66, 74, 123, 200, 40-50, 27 and 8-14 kDa), the 3 most effective (56, 66 and 74 kDa) were selected to reevaluate their protective capacity. These antigen fractions were selected because they induced the highest level of protection independently of the dose used and they could be cut without contamination of other antigen fractions because they appeared in the gels as single bands (Fig. 1), although densitometric scanning revealed some fractions have more than one component. Since we observed that sc immunizations with total antigens induced protection only when injected in FCA while no protection was observed when aluminium hydroxide or muramyl dipeptide were used in incomplete Freund's adjuvant (data not shown), we reevaluated these 3 most promising antigen fractions. Of the 3 only 2, 66 and 74 kDa, maintained their protective capacity when injected subcutaneously in FCA and were equally effective whether used individually or in combination. Immunization efficiency was also as high when the 3 antigen fractions were used subcutaneously as with total antigens (74.5 vs 62%; Table III). Antigens of similar size from T. crassiceps were recognized by sera from humans and pigs infected with T. solium cysticerci as well as by sera from T. crassiceps infected mice (Fig. 2). Interestingly, the 3 antigens are recognized early in the cysticercus development as shown by Western blot performed with sera from pigs with early T. solium infections (Fig. 2).

## DISCUSSION

The protective capacity of 12 different antigenic fractions of T. crassiceps cysticercus vesicular fluid was evaluated in mice. In the present study we identified 6 antigenic groups (8-14, 40-50, 56, 66, 74 and 200 kDa) capable of inducing high levels of protection against experimental murine cysticercosis, regardless of whether they were administered in high or low doses. The protective effect induced independently of the dose used is of special interest considering previous results which emphasize a strict relationship between dose and protection inducing capacity. This was reported for total cysticercus antigens used as immunogens to prevent murine cysticercosis (Sciutto et al., 1990), or porcine cysticercosis. In pigs, immunization with high antigen doses not only did not reduce parasite numbers, but it clearly facilitated their increase (Rodarte, 1992).

Of the 6 protective antigenic fractions identified in this study, we selected the 3 most promising (56, 66 and 74 kDa) to continue their evaluation as candidates for protective immunization. These 3 antigen fractions were selected because they were prominent bands in the polyacrilamide gels used for their separation as single bands. This suggested that we were dealing with a simple combination and opened possibilities regarding future production by means of recombinant DNA techniques. Since it seemed scarcely possible that we could affect the destiny of a complicated relationship such as that of host and parasite with only 1 antigen, we considered combining the 3 antigen fractions. Protection efficiency obtained is at least as high as levels achieved with total antigen. The use of a combination of antigens, instead of a unique one,

increases the probability of inducing a protective immune response capable of controlling the parasite in its different developmental stages. Moreover, it increases the probability of obtaining protection despite parasitic heterogeneity, due to various genetic and environmental factors (Aluja and Vargas, 1988; Correa et al., 1987). It is also relevant considering the variable susceptibility of the host population which may be associated to the heterogeneous recognition of parasitic antigens. Thus, important differences in susceptibility to cysticercosis have been reported not only in porcine (Rodarte, 1992) and ovine cysticercosis caused by T. ovis (Gommel and Lawson, 1982), but also in experimental murine models where a group of antigens recognized at higher frequencies by antibodies from genetically resistant individuals have been reported (Sciutto et al., 1991).

To evaluate the potential capacity of the identified T. crassiceps antigenic fractions to prevent porcine cysticercosis, we investigated if T. solium cysticerci shared them and found that sera from both cysticercotic humans and pigs, recognize antigens with similar molecular weights. Since these possibly shared antigens are recognized early in the infection, they are likely to be present in oncospheres and young larvae. This lends importance to our 3 antigenic fractions because they could induce an immune response capable of interfering not only with cysticercus proliferation but also with transformation from oncosphere to cysticercus. In fact, some cysticercal antigens of T. crassiceps are capable of effectively protecting rats infected with T. taeniaeformis oncospheres (Ito et al., 1991).

The identification of antigens of interest for immunization against cysticercosis has not been limited to porcine cysticercosis. Fruitful efforts in the development of immunogens against cysticercosis by T. ovis have been made (Johnson et al., 1989). The production of this vaccine was based on the use of rodent experimental models which allowed the identification of protection inducing antigens. Johnson et al. (1989) identified and cloned an oncosphere antigen of 45 kDa which efficiently prevents ovine cysticercosis.

Finally, the strategy of the present study allowed the identification of 3 antigenic fractions (56, 66 and 74 kDa) which seem promising for the prevention of porcine cysticercosis. We are presently evaluating them against the challenge of pigs with T. solium eggs and initial observations are encouraging. Should this protection inducing capacity turn out to be effective then we will consider antigen production with recombinant DNA techniques.

## LITERATURE CITED

Aluja, S.A. 1982. Frequency of porcine cysticercosis in Mexico. *In* Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives. A., Flisser, K., Willms, J.P., Lacleste, C., Larralde, C., Ridaura and F., Beltrán (eds.). Academic Press, New York, p. 53-62.

———, and G. Vargas. 1988. The histopathology of porcine cysticercosis. *Veterinary Parasitology* 25: 65- 71.

Anonymous. 1985. Introductory guide for personal computers, version 6. SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, p III .

Correa, D., Lacleste, J.P., Rodríguez-Del-Rosal, E., Merchant, M.T., and A. Flisser. 1987. Heterogeneity of Taenia solium cysticerci obtained from different naturally infected pigs. *Journal of Parasitology* 73: 443-445.

Freeman, R.S. 1962. Studies on the biology Taenia crassiceps (Zeder, 1800) Rudolphi, 1810 (Cestoda). *Canadian Journal of Zoology* 40: 969-990.

Gemmell, M., and J.R. Lawson. 1982. Ovine cysticercosis. an epidemiology model for the cysticercosis. II. Host immunity and regulation of the parasite population. *In* Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives. A., Flisser. K., Willms, J.P., Lacleste, C., Larralde, C., Ridaura, and F., Beltrán (eds.). Academic Press, New York, p. 647-660.



——, Matyas, Z., Pawlowski, Z., Soulsby, E., Larralde, C., Nelson, G.S., and B. Rosicky. 1985. In Guidelines for surveillance prevention and control of taeniasis/cysticercosis. VPH/83.49 World Health Organization Geneva, Switzerland.

Higgins, R.C., and Dahmus. 1970. Rapid visualization of protein bands in preparative SDS polyacrylamide gels. *Annals of Biochemistry* **93**: 257-262.

Ito, A., Takami, T. and M. Itoh. 1991. Vaccine effect of intact metacestodes of Taenia crassiceps against Taenia taeniaeformis infection in rats. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **44** (6): 696-701.

Johnson, K.S., Harrison, G.B.L., Lightowers, M.W., O'Hoy, K.L., Cougle, W.G., Dempster, R.P., Lawrence, S.B., Vinton, J.G., Heath, D.D. and M.D. Rickard. 1989. High level protection against a helminth parasite induced by a defined recombinant antigen. *Nature* **338**: 585-587.

Keilbach, N.M., Aluja, A. and E. Sarti-Gutiérrez. 1989. A program to control taeniasis-cysticercosis (Taenia solium): experiences in a mexican village. *Acta Leidensia* **57**(2): 181-190.

Kunz, J., Kalinna, B., Watschake, V. and E. Geyer. 1989. Taenia crassiceps metacestode vesicular fluid antigens shared with the Taenia solium larval stage and reactive with serum antibodies from patients with neurocysticercosis. *Zentralblatt für Bakteriologie* **272**: 510-516.

Larralde, C., Lacleste, J.P., Owen, C.S., Madrazo, I., Sandoval, M., Bojalil, R., Sciutto, E., Contreras, L., Arzate, J., Díaz, M.L., Govezensky, T., Montoya, R.M. and F. Goodsaid. 1986. Reliable serology of Taenia solium cysticercosis with antigens from cyst vesicular fluid: ELISA and hemagglutination tests. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 35(5): 965-993.

——, Montoya, R.M., Sciutto, E., Díaz, M.L., Govezensky, T. and E. Coltorti. 1989. Deciphering Western blots of tapeworm antigen (Taenia solium, Echinococcus granulosus and Taenia crassiceps) reacting with sera from neurocysticercosis and hydatid disease patients. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 40(3): 282-290.

——, Sciutto, E., Grun, J., Díaz M.L., Govezensky, T. and R.M. Montoya. 1988. Biological determinants of host-parasite relationship in mouse cysticercosis by Taenia crassiceps: influence of sex, major histocompatibility complex and vaccination. In *Cell Function and Disease*. Cañedo, L.E., Todd, L.E., Parker, L. and J. Jaz. (eds). Plenum Press, New York, p. 325-332.

——, Sotelo, J., Montoya, R.M., Palencia, G., Padilla, A., Govezensky, T., Díaz, M.L. and E. Sciutto. 1990. Immunodiagnosis of human cysticercosis in cerebrospinal fluid: Antigens from murine Taenia crassiceps cysticerci effectively substitute those from porcine Taenia solium. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* 114: 926-928.

Lowry, O.H., Rosenbroug, N.J., Farr, A.L. and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* **193**: 265-270.

Mahajan, R.C. 1982. Geographical distribution of human cysticercosis. *In* *Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives*. A., Flisser. K., Willms, J.P., Laclette, C., Larralde, C., Ridaura, and F. Beltrán (eds.). Academic Press, New York, p. 39-46.

Mazón-Rubio, J. 1991. La porcicultura mexicana ante el TLC. *Desarrollo Porcícola* **32**:13-16.

Ramos-Kuri, M., Montoya, R.M., Padilla, A., Govezensky, T., Díaz, M.L., Sciutto, E., Sotelo, J. and C. Larralde. 1992. Immunodiagnosis of neurocysticercosis. *Archives of Neurology* **49**: 633-636.

Rodarte, L.F. 1992. Evaluación experimental de la capacidad de protección de antígenos de Taenia crassiceps contra la cisticercosis porcina por Taenia solium. Tesis. Universidad Autónoma de México. México, D.F., México, 44 p.

Schenone, H., Villaroel, F., Rojas, A., and R. Ramírez. 1982. Epidemiology of human cysticercosis in Latin America. *In*: A. Flisser. K. Willms, J.P. Laclette, C. Larralde, C. Ridaura, F. Beltrán (eds.). *Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives*. Academic Press, New York, p. 25-38.

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

———, ——, G., Díaz, M.L., Valdez, F., Montoya, R.M., Govezensky, T., Lomeli, C. and C. Larralde. 1991. Murine Taenia crassiceps: H-2 complex and sex influence on susceptibility. *Parasitology Research* 77: 243- 246.

Sarti-Gutiérrez, E.J., Schantz, P.M., Lara-Aguilera, R., Gomez-Dandoy, H., and A. Flisser. 1988. Taenia solium taeniasis and cysticercosis in a mexican village. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 39: 194-198.

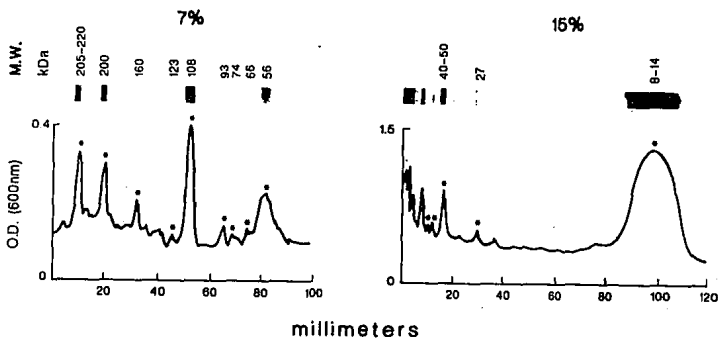


Figure 1. SDS-PAGE (7 % and 15 %) chromatogram and densitometry analysis after staining with 0.1 % Coomassie/Blue R-250 illustrate the protein composition of soluble antigens of the *T. crassiceps* cysticercus. Bands localized at 8-14 kDa represents 60.5 % of the total protein content and appear systematically in all different cysticerci antigens tested. \* Fraction used for immunization.

Antigens  
KDa

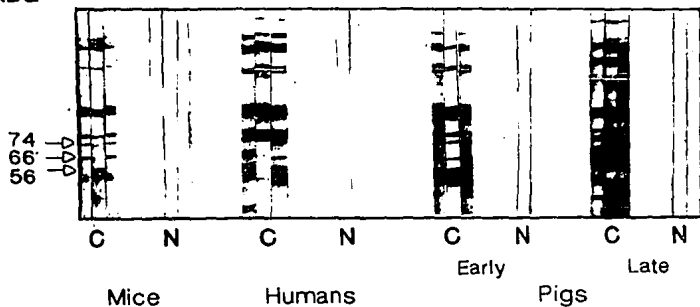


Figure 2. Western blots of vesicular fluid of *Taenia crassiceps* cysticerci reacting with sera of cystercotic and healthy humans, pigs and mice. C, cystercotic; N, normal.

TABLE I. Protection against murine *Taenia crassiceps* cysticercosis by intraperitoneal immunization with *T. crassiceps* antigens separated and included in 7 % SDS-PAGE

Groups	Dose ( $\mu$ g)	*Number of cysticerci (N)	†Protection efficiency (PE)	Number of tested mice
Total antigens‡	100	6.3 $\pm$ 7.8§	82.3 %	9
Separated antigens (kDa)				
56	5	4.8 $\pm$ 3.7§	86.5 %	8
	15	18.5 $\pm$ 6.1§	48.1 %	8
66	5	14.7 $\pm$ 16.8§	58.8 %	8
	15	13.3 $\pm$ 12.3§	62.7 %	8
74	5	8.0 $\pm$ 6.6§	77.5 %	8
	15	15.5 $\pm$ 9.7§	56.5 %	8
93	5	34.1 $\pm$ 13.7	4.4 %	10
	15	21.9 $\pm$ 8.4	38.6 %	10
108	5	31.4 $\pm$ 21.2	12.0 %	10
	15	39.7 $\pm$ 12.3	-11.2 %	10
123	5	23.7 $\pm$ 12.2	33.6 %	10
	15	10.1 $\pm$ 4.1§	71.7 %	10
150-160	5	23.8 $\pm$ 8.9	33.3 %	8
	15	35.0 $\pm$ 12.7	1.9 %	8
200	5	13.0 $\pm$ 7.9§	63.5 %	9
	15	11.8 $\pm$ 7.7§	66.9 %	8
220-205	5	27.5 $\pm$ 9.4	22.9 %	9
	15	52.4 $\pm$ 24.4#	-49.7 %	10
Controls	-	35.7 $\pm$ 12.6	---	17

**TABLE I (Cont.)**

\* Mean and standard deviation of individual parasite load recovered after 30 days of infection from non-immunized (control) and immunized mice.

†  $PE = (N \text{ in control mice}) - (N \text{ in immunized mice}) / (N \text{ in control mice})$

‡ Total antigens include antigens of high and low molecular weight in 7 % gels.

§ Significant protective differences with control value at 99 % confidence level.

# Significant facilitating differences with control value at 99 % confidence level.



TABLE II. Protection against murine Taenia crassiceps cysticercosis by intraperitoneal immunization with T. crassiceps antigens separated and included in 15 % SDS-PAGE

Groups	Dose ( $\mu$ g)	*Number of cysticerci (N)	†Protection efficiency (PE)	Number of tested mice
Total antigens‡	100	15.1 $\pm$ 11.4§	78.6 %	9
Separated antigens (kDa)				
8-14	5	33.0 $\pm$ 16.5§	53.3 %	15
	15	16.2 $\pm$ 12.3§	77.1 %	15
27	5	28.5 $\pm$ 35.3§	59.7 %	10
40-50	5	27.9 $\pm$ 18.3§	60.5 %	16
	15	19.7 $\pm$ 14.8§	72.1 %	14
Controls	-	70.5 $\pm$ 42.0	---	11

\* Mean and standard deviation of individual parasite load recovered after 30 days of infection from non-immunized (control) and immunized mice.

† PE = (N in control mice) - (N in immunized mice) / (N in control mice)

‡ Total antigens include antigens of high and low molecular weight in 7% gels.

§ Significant protective differences with control value at 99 % confidence level.

TABLE III. Combined use of electrophoretically separated antigens in subcutaneous immunization against murine cysticercosis

Groups	Dose ( $\mu$ g)	*Number of cysticerci (N)	†Protection efficiency (PE)	Number of tested mice
Total antigens‡	100	14.3 $\pm$ 7.2§	62.0 %	16
Separated antigens (kDa)				
56	5	27.5 $\pm$ 11.2	27.8 %	14
66	5	17.9 $\pm$ 6.9§	53.0 %	13
74	5	16.6 $\pm$ 10.7§	56.4 %	13
56 + 66	10	12.6 $\pm$ 7.0§	66.9 %	15
56 + 74	10	14.2 $\pm$ 6.7§	62.7 %	15
66 + 74	10	12.6 $\pm$ 7.7§	66.9 %	14
56 + 66 + 74	15	9.7 $\pm$ 6.6§	74.5 %	11
Controls	-	38.1 $\pm$ 20.3	---	9

All immunizations were carried out in Freund's complete adjuvant.

\* Mean and standard deviation of individual parasite load recovered after 30 days of infection from non-immunized (control) and immunized mice.

† PE = (N in control mice) - (N in immunized mice) / (N in control mice)

‡ Total antigens include antigens of high and low molecular weight in 7% gels.

§ Significant protective differences with control value at 99 % confidence level.

§, ||, Data labeled with the same letter are not significantly different at 99 % confidence level.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. M. Ramos-Kuri for kindly supplied of sera from human neurocysticercosis patients, Dr. Gerald W. Esch, Dr. Rafael Saavedra and Dr. Enrique Ortega for critical reading of the manuscript, discussion and helpful comments, Ms. Violeta Aguilar for her secretarial work, Isabel Pérez Montfort for revision and correction of the manuscript and Mercedes Baca for her technical assistance. This research was supported by DGAPA IN209393 and CONACyT, México.

**Index descriptors**

**Taenia crassiceps, cysticercosis, immunization**

**Running head**

**Valdez et al. - Cysticercosis immunization**

## ***DISCUSION GENERAL Y PERSPECTIVAS***

La cisticercosis por *T. solium* representa un problema de salud y socioeconómico en México, otros países de Latinoamérica y África (Mahajan, 1982; Schenone *et al.*, 1982; Gemmell *et al.*, 1985). La persistencia de esta parasitosis en México se debe a que aún subsisten las condiciones que propician la transmisión: más del 40 % de los cerdos que se consumen son de crianza rústica (Mazon, 1991), se continúa practicando el fecalismo al aire libre en medios rurales y urbanos, la inspección sanitaria es insuficiente y existe insalubridad ambiental y conductual (Aluja, 1982; Sarti-Gutierrez *et al.*, 1988; Keilbach, Aluja & Sarti-Gutierrez, 1989; Larralde *et al.*, 1992). El requerimiento indispensable del cerdo para la mantención del ciclo parasitario de este céstodo, ofrece la posibilidad de incidir en la transmisión, modificando la incidencia de la cisticercosis porcina.

La vacunación ha resultado ser una medida efectiva en el control y erradicación de algunas enfermedades infecciosas, sin embargo, parece más difícil lograr modificar por vacunación la incidencia de enfermedades parasitarias. De hecho, a la fecha no existen vacunas contra parásitos humanos recomendadas para su aplicación, mientras que para animales de consumo, recientemente se ha comenzado a utilizar una vacuna recombinante contra la cisticercosis ovina producida por el grupo de investigación de Johnson y colaboradores (1991). Así, aunque el desarrollo de vacunas para la prevención de enfermedades parasitarias está en general restringido a evaluaciones experimentales (Apéndice B), este antecedente nos alienta a considerar factible una vacuna efectiva contra la cisticercosis porcina por *T. solium*.

En esta tesis se reporta el trabajo de investigación realizado para avanzar en el diseño de una vacuna eficiente contra la cisticercosis porcina por *T. solium*. Utilizamos como estrategia continuar usando el modelo de la cisticercosis murina por *Taenia crassiceps*, siguiendo un proceso de investigación que se inició bajo la dirección del Dr. Larralde. El uso de esta cisticercosis murina nos permitió avanzar en la investigación de las posibilidades de prevención de la cisticercosis (Sciutto *et al.*, 1990, 1994). Aún con las restricciones implícitas al uso de un modelo experimental, consideramos la utilización de la cisticercosis murina como modelo de la cisticercosis por *T. solium*, basándonos en la extensa reactividad cruzada entre ambos céstodos, la que ha permitido utilizar antígenos de *T. crassiceps* para inmunodiagnóstico de neurocisticercosis por *T. solium* (Larralde *et al.*, 1989; Ramos-Kuri *et al.*, 1992), y en la capacidad de los antígenos de ambos céstodos de inducir inmunoprotección cruzada contra ambas especies (Sciutto *et al.*, 1991, 1993). Así, tanto los antígenos de *T. solium* protegen contra *T. crassiceps* en el ratón, como los de *T. crassiceps* contra *T. solium* en el cerdo. A fin de identificar antígenos de interés en vacunación, decidimos utilizar los antígenos de la fase larvaria considerando la disponibilidad de los mismos, en especial los provenientes de *T. crassiceps* que, dada la rápida capacidad de división y crecimiento del cisticerco, permite disponer de gramos de antígenos a partir de cada ratón infectado. El uso de antígenos larvarios como vacuna a fin de interferir contra la fase de oncosfera o de transformación de oncosfera a cisticerco, se justifica considerando muy probable la compartición de antígenos entre ambas fases así como resultados obtenidos por el grupo de Molinari y colaboradores (1989, 1993) quienes demostraron que la inmunización con antígenos del cisticerco de *T. solium*



son capaces de prevenir efectivamente la cisticercosis porcina, con eficiencias de vacunación que van del 82 % al 90 %.

En la experiencia de nuestro laboratorio, los antígenos totales del cisticerco de *T. crassiceps* reducen la carga parasitaria, hasta ahora, en un 50 % en la cisticercosis porcina. También se observó que existe un efecto de dosis sobre la eficiencia de la vacunación inducida con antígenos totales del cisticerco de *T. crassiceps*, que no sólo podía reducir sino favorecer el crecimiento parasitario. Estudiando la respuesta inmune humoral después del desafío en los cerdos vacunados y los no vacunados, observamos que la protección mediada por vacunación se asocia a una mayor frecuencia de reconocimiento a ciertos antígenos del extenso conjunto utilizado como vacuna (Sciutto *et al.*, 1994). Así, consideramos probable que el uso de antígenos aislados, restringiéndonos a aquellos asociados a protección, podría ofrecer una vacuna más eficiente y controlable en cuanto a la inducción de efectos no deseados.

A fin de avanzar en el diseño de una vacuna contra la cisticercosis porcina, contemplamos evaluar fracciones antigénicas aisladas del conjunto de antígenos del cisticerco de *T. crassiceps* en su capacidad de inducir protección. Para ello, aislamos un conjunto de 12 fracciones antigénicas, separadas en base a su peso molecular y las evaluamos en su capacidad de inducir protección en la cisticercosis murina. Identificamos fracciones protectoras del hospedero, facilitadoras de la infección e irrelevantes para el crecimiento parasitario. Los resultados obtenidos sugieren que de todos los antígenos presentados por un parásito al hospedero, cada uno induce una respuesta independiente con respecto a su efecto sobre la carga parasitaria.

Probablemente cada antígeno pueda inducir diferentes mecanismos inmunológicos en diferente extensión, y la suma de estas respuestas determine su efecto en el destino de la parasitosis, propiciando o deteniendo su desarrollo. Esto señala la existencia de intrincados mecanismos inmunoregulatorios involucrados en la inmunidad o la susceptibilidad a esta parasitosis, y esta información resulta de utilidad en las consideraciones al respecto del diseño de una vacuna.

La evaluación experimental de las doce fracciones antigénicas se realizó utilizando cada una en dos dosis diferentes, 5 y 15  $\mu\text{g}/\text{ratón}$ . Este diseño nos permitió observar que existe un importante efecto de la dosis de las fracciones utilizadas en la inmunización sobre la carga parasitaria. Modificándola de 5 a 15  $\mu\text{g}/\text{ratón}$  se puede convertir una fracción antigénica irrelevante en facilitadora (205-220 Kd). Este aspecto es especialmente relevante para el diseño de esta vacuna y dicta la necesidad de establecer adecuadamente la dosis y su número de aplicaciones a fin de evitar efectos indeseables, como tolerancia o facilitación (Sciutto *et al.*, 1993; Grzych, 1984).

La evaluación de las 12 fracciones antigénicas en su capacidad para prevenir la cisticercosis, nos permitió seleccionar las 3 más prometedoras (56, 66 y 74 Kd) para ser usadas como vacuna en base a la eficiencia de protección inducida, a la independencia del efecto protector con respecto a las dosis utilizadas y a que se visualizan como bandas sencillas, lo que sugiere que probablemente no se trata de un grupo extenso de antígenos. Es importante señalar que la fracción antigénica de 200 Kd también cumple estas condiciones, sin embargo no fue posible reevaluarla por limitaciones en la

disponibilidad de ratones. Con esta información decidimos evaluar estas tres fracciones en su capacidad de inducir protección contra la cisticercosis porcina. Los resultados fueron prometedores: de 18 cerdos infectados, en los no inmunizados se recuperó un promedio de 5 parásitos, en los vacunados con antígenos totales 2.5 parásitos en promedio y en los inmunizados con las tres fracciones conjuntamente un promedio de 0.16. Más interesante aún es el hecho de que, mientras todos los cerdos no vacunados se infectaron, 2 de 6 de los inmunizados con antígenos totales no se infectaron y 5 de 6 de los inmunizados con las tres fracciones aisladas no se infectaron. Estos resultados están actualmente confirmándose y se ha iniciado el diseño para obtener los antígenos existentes en estas fracciones por técnicas de DNA recombinante.

En el desarrollo de cualquier vacuna, un punto de especial interés y consideración es la relación entre la eficiencia de vacunación y la heterogeneidad genética de la población receptora de la vacuna. La vacuna debe proteger a una población hospedera heterogénea expuesta a una población parasitaria que también puede ser heterogénea. Dentro de la población hospedera es importante identificar a los individuos poco o no respondedores, que contribuyen a la transmisión. Al respecto del diseño de una vacuna, deberá evaluarse si la misma protege eficientemente a individuos de diferente susceptibilidad innata a la parasitosis. Es así, que considerando este aspecto, utilizamos los individuos más susceptibles dentro de la población murina para identificar antígenos de interés en vacunación. En este sentido, y en nuestro tema de estudio, no se ha estudiado sistemáticamente las diferencias de susceptibilidad en la cisticercosis porcina, aunque hemos observado que cerdos con un alto componente genético proveniente de la raza

Durok y Spott muestran alta resistencia a la cisticercosis en desafíos experimentales. Actualmente estamos confirmando esta observación y tratando de identificar las diferencias de susceptibilidad en un conjunto de razas de cerdos a fin de, en un futuro próximo, evaluar la eficiencia de vacunación en individuos naturalmente resistentes y susceptibles.

En la cisticercosis murina observamos que las diferencias genéticas de la población pueden afectar importantemente la susceptibilidad. Durante mi maestría he participado en la identificación de los factores genéticos involucrados en la determinación de susceptibilidad a la cisticercosis murina. Evaluamos la influencia de los genes Qa-2 (genes no clásicos del MHC) sobre el desarrollo de la infección. Los resultados muestran que en un fondo genético de susceptibilidad (BALB/cAnN) los genes del H-2 influyen pero Qa-2 no es determinante en el desarrollo de la parasitosis, en tanto que en un fondo intermedio de susceptibilidad, la presencia combinada de los antígenos H-2Db y Qa-2 está asociada a resistencia. Estos resultados señalan que éstos genes influyen en la susceptibilidad innata a la cisticercosis murina, aunque aún no conocemos a través de que mecanismos.

Adicionalmente, la transfección del gene que codifica para la proteína Qa-2 en ratones de susceptibilidad intermedia aumentó significativamente la resistencia innata a la cisticercosis murina (Fragoso *et al.*, 1994). Este hallazgo aumenta nuestra esperanza de acceder en un futuro a la producción de razas de cerdos naturalmente menos susceptibles a la cisticercosis porcina, además de incidir en el aumento de la resistencia a través de la vacunación. Así, utilizando ambas estrategias, vacunación y transgenesis, esperamos poder modificar la incidencia de esta parasitosis.

## ***REFERENCIAS***

Aguilera-García J. and Galvan-Cervantes A.D. (1989) Prevalencia del *Cysticercus cellulosae* en la población porcina de la comunidad de Angahuan, municipio de Uruapan, Michoacan y anteproyecto de control. Tesis de Licenciatura, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM.

Albores S.J. y Altamirano M. (1971) Algunas consideraciones sobre 9412 autopsias realizadas en el Hospital General de México. *Revista de Investigación en Salud Publica* 31: 1.

Aluja S.A. (1982). Frequency of porcine cysticercosis in Mexico. *En: A. Flisser, K. Willms, J.P. Lacleste, C. Larralde, C. Ridaura, F. Beltrán (eds.). Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives. Academic Press, New York. p. 53-62.*

Bojalil R., Terrazas I., Govezensky T., Sciutto E. and Larralde C. (1993). Thymus-related cellular immune mechanisms in sex-associated resistance to experimental murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). *Journal of Parasitology* 79(3): 384-389.

Else K. and Wakelin D. (1988). The effects of H-2 and non-H-2 genes on the expulsion of the nematode *Trichuris muris* from inbred congenic mice. *Parasitology* 96: 543-550.

Else K. and Wakelin D. (1989). Genetic variation in the humoral immune responses of mice to the nematode *Trichuris muris*. *Parasite immunology* 11: 77-90.

Del Bruto O.H. and Sotelo J. (1988) Neurocysticercosis: un update. *Reviews of Infectious Diseases* 10: 1075-1087.

Díaz-Camacho S.P., Candil-Ruiz A., Uribe-Beltrán M. and Willms-Manning K. (1989) Epidemiología de taeniasis/cisticercosis en una comunidad de Sinaloa. *En: A. Flisser, F. Malagón (eds.). Cisticercosis humana y porcina. Su conocimiento e investigación en México. Limusa-Noriega, México D.F., p. 243-250.*

Fragoso G., Lamoyi E., Mellor A., Valdez F., Hernández M., Baca M. & Sciutto E. (1994). Induction of resistance to murine cysticercosis by transference of the non-classic histocompatibility Q9 gene. *En preparación*.

Freeman R.S. (1962) Studies on the biology of *Taenia crassiceps* (Zedor, 1800) Rudolphi, 1810 (cestoda). *Canadian Journal of Zoology* 40: 969-990.

Gemmell M., Matyas Z., Pawlowski Z., Solusby E., Larralde C., Nelson G.S. & Rosicky B. (1985). In: Guidelines for surveillance prevention and control of taeniasis/cysticercosis. VPH/83.49 World Health Organization. Geneva, Switzerland.

Grisolia J.S. & Wiederholt W.C. (1982). CNS cysticercosis. *Archives of Neurology* 78(3): 540-544.

Grzych J.M., Capron M., Dissous C. & Capron A. (1984). Blocking activity of rat monoclonal antibodies in experimental schistosomiasis. *Journal of Immunology* 133(2): 998-1004.

Huerta L., Terrazas I., Sciutto E. and Larralde C. (1992). Immunological mediation of gonadal effects on experimental murine cysticercosis caused by *Taenia crassiceps* metacestodes. *Journal of Immunology* 78(3): 471-476.

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

Keilbach N.M. (1989). Teniasis-cisticercosis, un estudio de población. Tesis de Maestría. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. División de Estudios de Posgrado, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.

Keilbach N.M., Aluja S.A., & Sarti-Gutierrez E. (1989). A progame to control taeniasis-cysticercosis (*Taenia solium*): experiences in a mexican village. *Acta Leidensia* 57(2): 181-190.

Kennedy M., Gordon A., Tomlin L. and Qureshi F. (1986). Genetic (Major Histocompatibility Complex ?) control of the antibody repertoire to the secreted antigens of *Ascaris*. *Parasite Immunology* 9: 269-273.

Klein J. (1990). Immunology. *Blackwell Scientific Publications*. 508 pp.

Kroeze W.K. and Freeman R.S. (1982). *Taenia crassiceps*: Rate of cysticerci following ingestion by the mouse. *Experimental Parasitology* 54: 425-431.

Kuntz J., Watschake V. & Geyer E. (1989). *Taenia crassiceps* metacystode vesicular fluid antigens shared with *Taenia solium* larval stage and reactive with serum antibodies from patients with neurocysticercosis. *Zentralblatt für Bakteriologie* 272: 510-516.

Larralde C., Montoya R.M., Sciutto E., Díaz M.L., Govezensky T. and Coltorti E. (1989). Deciphering Western Blots of tapeworm antigen (*Taenia solium*, *Echinococcus granulosus* and *Taenia crassiceps*) reacting with sera from neurocysticercosis and hydatid disease patients. *American journal of tropical Medicine and Hygiene* 40(3): 282-290.

Larralde C., Padilla A., Hernández M., Govezensky T., Sciutto E., Gutiérrez G., Tapia-Conyer R., Salvatierra B. y Sepúlveda J. (1992). Seroepidemiología de la cisticercosis en México. *Salud Pública de México* 34(2): 197-210.

López Samano A. (1990) Epidemiología de la cisticercosis porcina en la comunidad de Xoxocotla, municipio de Puente de Ixtla, Morelos y anteproyecto de control. Tesis de licenciatura. *Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia*, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia Michoacán.

Mahajan R.C. (1982). Geographical distribution of human cysticercosis. En: A. Flisser, K. Willms, J.P. Lacleste, C. Larralde, C. Ridaura, F. Beltrán (eds.). Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives. *Academic Press*, New York. p. 39-46.

Mazón R.J. (1991) La porcicultura mexicana ante el TLC. *Desarrollo Porcicola*, p. 13-16 y 32.



Medina M.T., Rosas E., Rubio F., Sotelo J. (1990) Neurocysticercosis as the main cause of late-onset epilepsy in Mexico. *Archives of Internal Medicine* 150: 325-327.

Mitchell G.F. (1982). Genetic variation in resistance of mice to *Taenia taeniaeformis*: analysis of host-protective immunity and immune evasion. *En: A. Flisser, K. Willms, J.P. Laclette, C. Larralde, C. Ridaura, F. Beltrán (eds.). Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives. Academic Press, New York. p. 575-584.*

Nauciel C., Ronco E., Guenet J. and Pla M. (1988). Role of H-2 and non-H-2 genes in control of bacterial clearance from the spleen in *Salmonella typhimurium*-infected mice. *Infection and Immunity* 56(9): 2407-2411.

Rabiela-Cervantes M.T., Rivas-Hernández A., Rodríguez-Ibarra J., Castillo-Medina S. and Cancino F.M. (1982) Anatomopathological aspects of human brain cysticercosis. *En: A. Flisser, K. Willms, J.P. Laclette, C. Larralde, C. Ridaura, F. Beltrán (eds.). Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives. Academic Press, New York. p. 25-38.*

Roitt I.M. (1990) Essential Immunology. *Blackwell Scientific Publications.*

Roitt I.M. (1989) Basic concepts and new aspects of vaccine development. *Parasitology* 98: S7-S12.

Ramos-Kuri M., Montoya R.M., Padilla A., Govezensky T., Díaz M.L., Sciutto E., Sotelo J. & Larralde C. (1992). Immunodiagnosis of neurocysticercosis. *Archives of Neurology* 49: 633-636.

Schenone H., Villarroel F., Rojas A. and Ramirez R. (1982). Epidemiology of human cysticercosis in Latin America. *En: A. Flisser, K. Willms, J.P. Laclette, C. Larralde, C. Ridaura, F. Beltrán (eds.). Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives. Academic Press, New York. p. 25-38.*

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

Sciutto E., Fragoso G., Valdez F., Montoya R.M., Govezensky T., Lomeli C. & Larralde C. (1991). Murine *Taenia crassiceps* cysticercosis: H-2 complex and sex influence on susceptibility. *Parasitology Research* 77: 243-246.

Sciutto E., Aluja S.A., Fragoso G., Rodarte L.F., Hernández M., Villalobos M.N., Padilla A., Keilbach N., Baca M., Govezensky T., Díaz M.L. & Larralde C. (1994). Vaccination of pigs against *Taenia solium* cysticercosis: factors related to the induction of host protection or parasite facilitation. *En preparación*.

Sarti-Gutierrez E., Schantz P.M., Lara-Aguilera R., Gomez Dandoy H. and Flisser A. (1988) *Taenia Solium* taeniasis and cysticercosis in a Mexican village. *The American Journal of Tropical Medicine And Hygiene* 39: 194-198.

Sotelo J., Guerrero V. and Rubio F. (1985) Neurocysticercosis: a new classification based on active and inactive forms: a study of 753 cases. *Archives Internal Medicine* 145: 442-445.

Tay Z.N., Lara A.R., Velasco C.O. and Gutierrez Q.M. (1984) *Parasitología Médica*. Méndez Otero (ed.), México.

Wakelin D. (1980). Genetic control of immunity to parasites infection with *Trichinella spiralis* in inbred and congenic mice showing rapid and slow responses to infection. *Parasite Immunology* 2(2): 85-98.

Wakelin D. (1985). Genetic control of immunity to helminth infections. *Parasitology Today* 1(1): 17-23.

Wassom D., Brooks B., Cypess R. and David C. (1983). A survey of susceptibility to infection with *Trichinella spiralis* in inbred mouse strains sharing common H-2 alleles but different genetic backgrounds. *The Journal of Parasitology* 69(6): 1033-1037.

Wassom D., Krco J. and David C. (1987). I-E expression and susceptibility to parasite infection. *Immunology Today* 8(2): 39-42.

**APENDICE A**

***AVANCES EN EL DESARROLLO DE NUEVAS VACUNAS***

Con el fin de enmarcar este trabajo de investigación, presento a continuación una breve revisión sobre los actuales enfoques en el desarrollo de vacunas. Es importante señalar el hecho de que la mayoría de los avances en el desarrollo de vacunas se han obtenido contra organismos virales, lo cual refleja la dificultad existente para el desarrollo de estas medidas inmunoprolácticas contra patógenos complejos como parásitos.

Las llamadas vacunas de nueva generación incluyen a aquellas que no usan al patógeno completo, ya sea virus, bacteria, o parásito atenuado o muerto. Su desarrollo incorpora tanto la información inmunológica reciente como los avances en las técnicas de biología molecular y síntesis de péptidos. Con este enfoque, las nuevas vacunas sólo incluyen algunas moléculas nativas o recombinantes, péptidos sintéticos o en su defecto, anticuerpos anti-idiotipo que mimetizan alguna estructura original del patógeno.

El desarrollo de vacunas que sólo incluyan algunas moléculas del patógeno (subunitarias), implica un primer paso de identificación de los antígenos relevantes en la inducción de protección, sin dejar de notar que las moléculas más inmunogénicas no están necesariamente involucradas en protección. La identificación de antígenos protectores se facilita si se dispone de un modelo experimental apropiado.

En base al conocimiento actual sobre los procesos infecciosos, podemos identificar tres características de la respuesta inmune indispensables para inducir protección de una manera óptima:

a) Activar apropiadamente las células presentadoras de antígeno, para que éstas procesen los antígenos pertinentes y se de inicio a la producción de citocinas.

b) Activar linfocitos T y B para generar niveles adecuados de células de memoria.

c) Genera linfocitos T cooperadores (Th) (Ada 1990, 1991)

Idealmente, la vacuna debería incluir un fuerte determinante de células T cooperadoras (Th) que sea funcional en todos los haplotipos existentes del Complejo Principal de Histocompatibilidad (CPH). Sin embargo, el repertorio de células T potencialmente respondedor tiene diferentes jerarquias de expresión y este repertorio está determinado por el mismo CPH e incluye un amplio conjunto de distintas versiones codificadas por este sistema polimórfico (Klein, 1986). Así, ciertas células T específicas a cierto determinante se activarían sólo cuando se expresa la molécula nativa. Dada la alta diversidad del sistema CPH en humanos y que no hay una universalidad en la respuesta de células T (es decir, no hay un determinante T universal), es recomendable que haya más de un determinante con altas jerarquias de expresión en la vacuna para tratar de cubrir la capacidad respondedora de la mayor parte de la población receptora posible. También se podrían inducir respuestas de memoria de células Th y B simultánea e independientemente a través del uso de una vacuna con determinantes antigénicos para células T dentro de un particular grupo de alelos del CPH y uno o más péptidos o moléculas idiotípicas asociados a un acarreador (Zanety *et al.*, 1987)

Una de las ventajas más importante de las vacunas subunitarias es que ofrecen la posibilidad de eliminar determinantes inductores de respuestas

supresoras. La coexistencia de determinantes supresores (Ds) y de determinantes cooperadores (Dh) en un antígeno puede provocar una no-inmunogenicidad al dominar los Ds sobre los Dh e impedir la inducción de células Th y B de memoria. Generalmente, los determinantes de cada tipo están separados y esto podría permitir eliminar específicamente los Ds o bien inactivarlos con tratamientos en base a moléculas anti-Ds. También es importante eliminar determinantes supresores para determinados haplotipos para tratar de proteger la mayor cantidad de haplotipos diferentes sin restricción por CPH, aún cuando no se han identificado Ds ni Dh universales, ni hay que descartar que genes no-CPH influyan en determinar epítomos supresores.

Aunque el avance en el conocimiento sobre la respuesta inmune aún no ha enriquecido sustancialmente el desarrollo de vacunas, es la esperanza que este conocimiento mejore el diseño de una vacuna en un futuro próximo. Entre las tecnologías que han permitido contemplar nuevas estrategias para el diseño de vacunas figuran:

1. Técnicas de DNA recombinante, a través de la producción de antígenos por clonación, lo que permite (a) la manipulación de vectores de expresión como acarreadores *in vivo* de vacunas y (b) el uso de vacunas basadas en vectores infecciosos recombinantes.

2. Vacunas basadas en péptidos sintéticos.

3. Vacunas basadas en la producción de anticuerpos anti-idiotipo.

## **I. VACUNAS OBTENIDAS POR DNA RECOMBINANTE**

La tecnología del DNA recombinante se ha aplicado para la identificación y aislamiento de antígenos protectores. Una vez identificada la(s) molécula(s) protectora(s), se procede a su clonación para poder manipularla. Esto permite obtener cantidades suficientes de un antígeno puro y su aplicación masiva. Las técnicas de ingeniería genética, ofrecen además la posibilidad de producir antígenos del patógeno sin riesgo. Por medio de técnicas de DNA recombinante ha sido posible el desarrollo de cepas atenuadas y avirulentas que pueden ser usadas como vacunas vivas.

### **IDENTIFICACIÓN DE ANTIGENOS A PRODUCIR**

La estrategia general para obtener vacunas recombinantes implica:

(1) El análisis inmunológico e inmunoquímico del sistema, ya sea a través de un modelo experimental o *in vitro*. Puede utilizarse un modelo animal para identificar las moléculas potencialmente protectoras. Los sistemas *in vitro* son importantes sobre todo si no se cuenta con grandes cantidades del agente infeccioso o no se puede experimentar directamente en el hospedero natural o un análogo. El aislamiento de las fracciones protectoras permite su caracterización química y su posterior síntesis.

(2) Producción de anticuerpos policlonales o monoclonales con el fin de utilizarlos para la purificación de los antígenos de interés o para identificar clonas recombinantes productoras del antígeno protector. Estos reactivos biológicos sirven también como sondas para localizar epitopos en antígenos



complejos y de esta forma identificar regiones consenso que permitan obtener determinantes específicos que den una mayor protección. Dado que los anticuerpos monoclonales identifican cualquier epítipo antigénico, sin importar su naturaleza química y que la ingeniería genética sólo permite la clonación de genes que codifican para antígenos de origen proteínico, es importante el análisis químico del determinante identificado con el anticuerpo monoclonal, ya que éste determina la estrategia a seguir para su aislamiento y producción como vacuna.

(3) Producción y tamizaje de bibliotecas de cDNA y bibliotecas de expresión genómica.

(4) Obtención de epítopos relevantes a través de la producción de las proteínas recombinantes correspondientes.

(5) Optimización del protocolo de vacunación, incluyendo el uso de adyuvantes o moléculas acarreadoras que aumenten la inmunogenicidad de los antígenos recombinantes. Es importante conocer las características biológicas y la inmunología de la infección contra la cual se dirige la vacuna para poder determinar la mejor estrategia de inmunización.

La tecnología del DNA recombinante ha permitido expresar y purificar porciones seleccionadas del genoma de patógenos que codifican para determinantes antigénicos supuestamente involucrados en la inducción de una respuesta inmune protectora. De esta forma se han obtenido diversos productos, candidatos a ser usados como vacunas. La subunidad  $\beta$  de la toxina del cólera (Mekalonos *et al.*, 1983), la glicoproteína D del virus simple

del herpes tipo I (Berman, 1984), proteínas del circumsporozoito de *Plasmodium falciparum* (Enea, 1984) y antígenos inmunogénicos de *Mycobacterium leprae* (Young, 1985) entre otros.

Un problema en la aplicación de esta tecnología es que no se pueden obtener productos con procesamiento tales como glicosilación o fosforilación.

## AVANCES EN EL DISEÑO DE VECTORES DE EXPRESION

Otra forma de desarrollar vacunas es a través de la formación de microorganismos recombinantes formados por cepas vivas en las que se clonan los genes que codifican a los antígenos del agente patógeno heterólogo. Estas cepas funcionan como vectores de expresión. Entre los más comúnmente usados se encuentran el virus de la vaccinia, el bacilo de Calmette y Guèrin (BCG), *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae* y más recientemente las levaduras y los bacilovirus. Entre sus ventajas figuran poder aumentar la inmunogenicidad, ser fáciles de administrar y almacenar, ser de bajo costo y no requerir el uso de adyuvantes. Sin embargo, se pueden tener efectos secundarios por el vector ya que su replicación puede suprimirse por haber sido usado antes como vacuna.

## VIRUS DE LA VACCINIA

Su uso como vector se implementó por Mackett (1982). Este virus puede infectar mamíferos y aves, se produce a bajo costo, es termoestable, resistente a la liofilización, fácil de administrar y permite la inducción de

inmunidad continua a lo largo de la vida del individuo. Este virus ha sido modificado genéticamente para impedir reversibilidad en su patogenicidad y actualmente los métodos para insertar un gene extraño en una secuencia de vaccinia, así como su replicación y expresión específica son de uso corriente (Smith G.L., 1983; Brown, 1986). En vaccinia se han podido expresar antígenos protectores y epitopos inmunogénicos del virus B de la hepatitis (Paoletti *et al.*, 1984; Yilma *et al.*, 1988), virus del herpes simple ( Cremer *et al.*, 1985 ), virus de la influenza ( Smith *et al.*, 1983 ), de la rabia (Kieny *et al.*, 1988) y malaria (Tartaglia *et al.*, 1990). Para el caso de la influenza (Bennink *et al.*, 1984) y la hepatitis en chimpances (Zahradnik *et al.*, 1987) se logró la expresión adecuada de antígenos inductores de buenas respuestas de linfocitos T citotóxicos, adicionando los promotores adecuados para la replicación de vaccinia (Brown *et al.*, 1986). La ruta de inmunización utilizando vaccinia también es importante en el tipo y magnitud de la respuesta protectora (Galosso *et al.*, 1977).

## VECTORES INFECCIOSOS RECOMBINANTES

### *Salmonella*

El uso de cepas atenuadas de *Salmonella* como vectores de expresión para desarrollar vacunas orales (Dougan *et al.*, 1987) ha sido especialmente importante para el control de enfermedades gastrointestinales y está fundamentado en el hecho de que estas cepas pueden colonizar y proliferar en los intestinos, invadiendo la mucosa e induciendo así respuestas inmunes humorales, celulares y secretorias localizadas, y al conocimiento y control de los genes responsables de su virulencia.

Para poder usar *Salmonella*, como vector de expresión, se requiere que las cepas sean totalmente avirulentas y muy inmunogénicas, conferir protección con dosis únicas, poder colonizar el intestino sin causar enfermedad, que ningún factor interno o externo al individuo vacunado cause reversibilidad en su avirulencia y que se asegure la expresión de los genes clonados para inducir inmunidad protectora. Existen muchas cepas avirulentas ya caracterizadas y aisladas que han sido usadas para obtener cepas recombinantes factibles de ser usadas como vacunas, por ejemplo, se han expresado proteínas de *Vibrio cholerae* (Newton *et al.*, 1989), de *Streptococcus pyogenes* (Poirier *et al.*, 1988) e incluso del circunsporozoito de *Plasmodium berghei* (Sadoff *et al.*, 1988). Las complicaciones que pueden presentarse con el uso de esta bacteria como vector de expresión es que no expresen al antígeno por inestabilidad del gen clonado, que no sobrevivan las cepas recombinantes, y su expresión diferencial según las diferentes circunstancias individuales del entorno.

### BACILO DE CALMETTE Y GUERIN (BCG)

Este bacilo, con una cepa diferente a la de la vacuna humana contra la tuberculosis, se usa actualmente para desarrollar vacunas recombinantes que permitan expresar simultáneamente múltiples antígenos protectores, contra diferentes patógenos.

El uso de este bacilo ofrece varias ventajas: (1) es la vacuna más usada en el mundo y tiene baja incidencia de complicaciones, (2) se puede administrar en cualquier momento después del nacimiento y no es afectada por anticuerpos maternos, (3) se da en una sola dosis, (4) es un potente

adyuvante *per se* en animales y humanos, (5) se puede administrar oralmente, (6) es estable al calor y (7) su producción no es muy cara (Stover *et al.*, 1991). La estrategia para lograr la introducción, mantenimiento y expresión estable de genes ajenos es a través del uso de plásmidos multi-infectivos (shuttle) que repliquen en *Escherichia coli* como plásmidos y en micobacterias como fagos que permitan expresar DNA ajeno en *Mycobacterium smegmatis* y cepas vacunables de BCG (Snapper *et al.*, 1988). A través de la selección de secuencias regulatorias de plásmidos y de *Mycobacterium* ha sido posible clonar y expresar en BCG genes recombinantes de antígenos patógenos diversos, en donde se logró aumentar la expresión cuantitativamente, tener un refuerzo continuo con una sola inmunización y posiblemente se puedan inducir también células T cooperadoras para inducir la producción de IgG y células T productoras de IFN- $\gamma$ . Se sabe también que si antígenos virales expresados en BCG no inducen la producción de anticuerpos neutralizantes, si pueden en cambio inducir memoria inmunológica que da una eficiente respuesta secundaria ante la infección natural (Stover *et al.*, 1991).

## OTROS VECTORES

Actualmente se está investigando la posibilidad de obtener sistemas de expresión génica que produzcan grandes cantidades de proteínas recombinantes pero que estén modificadas en forma similar a su composición natural, ésto es, que sean productos glicosilados y/o fosforilados, modificaciones postranscripcionales que no realizan los sistemas procaríotes. En este campo los candidatos más fuertes como vectores de expresión son las

levaduras y los baculovirus. Estos sistemas, como todos los anteriores, dependen críticamente de los promotores génicos seleccionados.

## **2. PEPTIDOS SINTETICOS COMO VACUNAS**

La síntesis de péptidos correspondientes a la secuencia antigénica de un patógeno, representa otro camino para construir vacunas no infecciosas. Se cuenta actualmente con la tecnología necesaria para su producción. Las vacunas de péptidos sintéticos deben mimetizar tanto epítomos continuos como discontinuos para activar células T y B, ser específicas, no inducir anticuerpos de reactividad cruzada con tejidos ni componentes propios normales, ser capaces de unirse al mayor número de secuencias de CPH clase II e incluir una secuencia o diseño que incremente su inmunogenicidad ya que generalmente son de pequeño tamaño (Steward y Howard, 1987). La mayor complicación para producirlos es que para muchos organismos no se saben aún las secuencias de aminoácidos ni de los determinantes antigénicos relevantes. La efectividad de una vacuna formada por péptidos sintéticos se refleja generalmente en su habilidad para inducir la formación de anticuerpos neutralizantes y/o de memoria inmunológica (Zanetti *et al.*, 1987).

Ya que la respuesta protectora contra antígenos timo-dependientes mediada por anticuerpos requiere que las células B y T reconozcan diferentes determinantes (epítomos) de la misma molécula (Roitt 1990), en una vacuna de este tipo es deseable incluir epítomos para ambos tipos celulares. Esta simultaneidad de determinantes puede incluso generar mejores respuestas que cuando sólo se usan determinantes para células B.

El problema esencial es determinar y seleccionar cual de los numerosos epítomos presentes en un patógeno va a ser usado para tratar de inducir inmunidad protectora. Algunos epítomos para células B son lineales, pero la mayoría son conformacionales, es decir, se encuentran formados por diferentes partes de una misma molécula con localizaciones no necesariamente contiguas y su función depende de su estructura espacial. En cuanto a los epítomos para células T, se sabe que no se traslapan con los de las células B en la misma molécula y que su repertorio está limitado por la restricción por moléculas del CPH (Roitt, 1990).

Para tratar de identificar sitios potencialmente inmunogénicos se han desarrollado diversos métodos de predicción. Estos se basan en un conjunto de diferentes criterios tales como hidrofobicidad e hidrofiliidad, movilidad, anfipaticidad y predicción de estructura secundaria. Estos criterios son considerados por estar relacionados con antigenicidad, sobre todo para determinantes para células B. Para células T se considera principalmente la búsqueda de homología con secuencias de determinantes ya conocidas. Con la identificación de sitios potencialmente inmunogénicos otra estrategia de utilidad ha consistido en la determinación de la afinidad de los péptidos por anticuerpos obtenidos con el antígeno nativo. Esto se extendió a la identificación de residuos importantemente involucrados en el reconocimiento y función del péptido sintético a través de estudios de sustitución de aminoácidos y formación de péptidos sobrelapados (Steward y Howard, 1987).

Hasta el momento, la mayoría de las vacunas basadas en péptidos sintéticos han dado resultados alentadores en varios sistemas como en el caso

del polivirus tipo 1 (Emini *et al.*, 1983) y el virus VIH-1 (Javaheriank *et al.*, 1990). Esta aproximación para producir vacunas ha permitido desarrollar protocolos de inmunización en humanos, específicamente para el caso de la malaria se han producido péptidos sintéticos correspondientes al antígeno del circunsporozoito de *Plasmodium falciparum* (Patarroyo *et al.*, 1988; Zavala *et al.*, 1985) donde se obtuvo protección y del esporozoito (Herrington *et al.*, 1987) que si bien no indujo protección, demostró que la vacuna es tolerada por el humano e induce anticuerpos.

### 3. ANTICUERPOS ANTI-IDIOTIPO COMO VACUNAS

Una alternativa al desarrollo de vacunas recombinantes y sintéticas es la inmunización con anticuerpos anti-idiotipo para determinantes no proteínicos, los cuales son seleccionados por mimetizar la conformación del antígeno nativo. Primero, se produce un anticuerpo monoclonal específico al antígeno deseado. Este anticuerpo es usado como inmunógeno para obtener anticuerpos específicos al idiotipo del primer anticuerpo, es decir, son anticuerpos anti-idiotipo dirigidos contra epítomos que representan la imagen en espejo del antígeno (Roitt, 1989).

Los idiotipos pueden representar a epítomos por (a) tener, por un factor fortuito, secuencias de aminoácidos idénticas al epítomo inmunogénico (Zanetti *et al.*, 1987; Bruck *et al.*, 1986), (b) por mimetizar estereoquímicamente al epítomo, sin tener su secuencia o (c) por originar uniones iónicas hidrofóbicas, hidrofílicas y de Van Der Waals similares a las que genera el epítomo (Roitt *et al.*, 1989).



Se han podido sustituir antígenos por anticuerpos que los mimetizan, ya propios o aloantígenos exógenos, logrando inducir inmunidad específica protectora en el caso del virus de la hepatitis B (Kennedy *et al.*, 1984), virus de la polio tipo I (Uytdehaag *et al.*, 1985), de *E. coli* (Stein y Eichmann, 1984), *Listeria monocytogenes* (Kaufmann *et al.*, 1985) así como con *Trypanosoma rhodesiense* (Sacks *et al.*, 1982), *Schistosoma mansoni* (Grzych *et al.*, 1985) y *Trypanosoma cruzi* (Sacks *et al.*, 1985). En todos estos casos se producen anticuerpos neutralizantes del patógeno incluso en casos de dosis letales, además de demostrar que no siempre se requiere adyuvante. También se han podido obtener respuestas celulares específicas sin restricción por CPH para ciertos virus (Sharpe *et al.*, 1984; Ertl *et al.*, 1984).

#### **AVANCES EN EL USO DE INMUNOPOTENCIADORES**

El uso de vacunas subunitarias permite eliminar los componentes adversos presentes en agentes patógenos complejos. Dado que los antígenos definidos usados como vacunas pueden tener la especificidad pero no necesariamente la potencia inmunogénica dada por la arquitectura antigénica nativa, frecuentemente se requiere la presencia de adyuvantes e inmunopotenciadores para restaurar y aumentar su inmunogenicidad.

El efecto potenciador dado por los adyuvantes se induce a través de (a) la capacidad de liberar lenta y gradualmente al antígeno, lo que aumenta su vida media y por lo tanto su capacidad estimuladora, (b) inducir la acumulación de células inmunocompetentes en órganos linfoides estimulados por el antígeno, (c) activación de macrófagos y linfocitos, (d) estimulación

directa de procesos de proliferación y diferenciación, (e) modificar la permeabilidad de linfocitos facilitando la captación del antígeno, (f) modificar la cinética de la respuesta inmune humoral y celular, (g) aumentar del AMP cíclico que influye en la síntesis de aminoácidos y la proliferación celular. Estas actividades en general dependen del tipo y vía de administración del adyuvante. Existen muchos adyuvantes, aunque la mayoría no se pueden usar en humanos, de hecho, por ahora, sólo está permitido el uso del hidróxido de aluminio. Entre las nuevas opciones figuran:

a) Proteosomas con anclas hidrofóbicas. Son vesículas de membranas proteínicas altamente hidrofóbicas, que no causan daño ni efecto colaterales y son potentes mitógenos de linfocitos B humanos. Su hidrofobicidad y el ancla peptídica con el que unen al antígeno evita que éste se degrade rápidamente y favorece su orientación espacial permitiendo, incluso, que queden rígidos. Se pueden usar con péptidos sintéticos y proteínas recombinantes (Lowell *et al.*, 1988)

b) Complejos inmunoestimulantes (ISCOM). Compuestos formados por una matriz de saponina glicósida (Quill A), proteínas y lípidos membranales (colesterol) (Morein *et al.*, 1984, 1987). Se les puede incorporar el antígeno mediante interacciones hidrofóbicas, produciendo respuestas celulares y humorales aumentadas hasta 20 veces, lo que permite utilizar concentraciones bajas de antígeno. Desafortunadamente, dosis de 10 a 50  $\mu\text{g}$  de Quill A son tóxicas, por lo que se debe determinar cuidadosamente la dosis a usar.

c) Liposomas. Son vesículas artificiales con bicapas lipídicas formadas por adyuvantes como lecitina, estearilamina y fosfodilcolinas. Los antígenos pueden estar dentro o sobre la bicapa (Estrada, 1992)

d) Inmunosomas o Virosomas. Son liposomas que contiene proteínas virales. Pueden incrementar importantemente la inmunogenicidad de antígenos superficiales o membranales, que con sus anclas naturales se adhieren a los liposomas adquiriendo una forma más parecida a la natural. Se pueden formar con hemaglutinina del virus de la influenza y con proteínas membranales del virus de la rabia (Estrada, 1992). Además, si les agregan moléculas clase I del MHC pueden activar *in vitro* células T citotóxicas (Loh *et al.*, 1979)

e) Actualmente se está considerando el uso de microesferas construidas con poli DL-lactidil-glicolil, un copolímero biocompatible y biodegradable donde se pueden depositar los antígenos vacunables en estado seco, permitiendo controlar el grado de liberación fácilmente a través del tamaño y la cantidad de glicolil y lactidil (Eldridge *et al.*, 1991)..

## CONCLUSIONES

A pesar del notable avance de las técnicas de DNA recombinante, de la síntesis química y del conocimiento de los procesos y relaciones inmunológicas en enfermedades humanas y animales, es notable el atraso existente en el desarrollo de nuevas vacunas para controlarlas, sobre todo en el caso de enfermedades parasitarias. Sin embargo, no hay que menospreciar el potencial de todas estas innovaciones, que si bien no han llevado aún a la

obtención de nuevas vacunas aplicables, han permitido acceder a la reducción de las desventajas y riesgos que se presentan con las vacunas tradicionales, y se espera que en un plazo no muy largo permitirán el control efectivo de un mayor número de enfermedades infecciosas.

## REFERENCIAS

Ada G.L. (1990). The immunological principles of vaccination. *Lancet* 335: 523-526.

Ada G.L. (1991). Strategies for exploiting the immune system in the design of vaccine. *Molecular Immunology* 28: 225-230.

Berman P.W., Gregory T., Crase D. & Lasky L.A. (1984). Protection from genital herpes simplex virus type 2 infection by vaccination with cloned type 1 glycoprotein D. *Science* 227: 1490-1492.

Bennink J.R., Yewdell J.W., Smith G.L., Moller C., Moss C. & Moss B. (1984). Recombinant vaccinia virus primes and stimulates influenza virus HA-specific CTL. *Nature* 311: 578-579.

Brown F., Schild G.C. & Ada G.L. (1986). Recombinant vaccinia viruses as vaccines. *Nature* 319: 549-550.

Bruck C., Co M.S., Slaoui M., Gaulton G.N., Smith T., Fields B.N., Mullins J.I. & Greene M.I. (1986). Nucleic acid sequence of an internal image-bearing monoclonal anti-idiotypic and its comparison to the sequence of the external antigen. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 83: 6578-6582.

Cremer K.J., Mackett M., Wohlenberg C. Notkins A.L. & Moss B. (1985). Vaccinia virus recombinant expressing herpes simplex virus type 1 glycoprotein D prevents latent herpes in mice. *Science* 228: 737-739.

Dougan G., Hormaeche C.E. & Maskell D.J. (1987). Live oral *Salmonella* vaccines: potential use of attenuated strains as carriers of heterologous antigens to the immune system. *Parasite Immunology* 9: 151-162.

Eldridge J.H., Atsas J.K., Meulbroek J.A., McGhee J.R., Tice T.R. & Gilley R.M. (1991). Biodegradable microspheres as a vaccine delivery system. *Molecular Immunology* 28: 287-294.

Ermini E.A., Jameson B.A. & Wimmer E. (1983). Priming for and induction of antipoliovirus neutralizing antibodies by synthetic peptides. *Nature* 304: 699-703.

Enea V., Ellis J., Zavala F., Aenot D.E., Asavanich A., Masuda A., Quakyi I., Nussenzweig R.S. (1984). DNA cloning of *Plasmodium falciparum* circumsporozoite gene: amino acid sequence of repetitive epitope. *Science* 225: 628-629.

Ertl H.C., Homans E., Tourmas S. & Finderg R.W. (1984). Sendai virus-specific T cell clones. V. Induction of a virus-specific response by antiidiotypic antibodies directed against a T helper cell-clone. *Journal of Experimental Medicine* 159: 1778-1783.

Estrada I. (1992). Vacunas Ciencia y Salud. *Secretaria de Salud, México. México.*

Galasso G.J., Karzon D.T., Katz S.L., Krugman S., Neff J., & Robbins F.C. (1977). Clinical and serological study of four smallpox vaccines comparing variations of dose and route of administration. *Journal of Infectology Diseases* 135: 131-185.

Grzych J.M., Capron M., Lambert P.H. Dossous C. & Capron A. (1985). An antiidiotype vaccine against experimental schistosomiasis. *Nature* 316: 74-76.

Herrington D.A., Clyde D.F., Losonsky G., Cortesia M., Murphy J.R., Davis J., Bagar S., Felix A.M., Heimer E.P., Gillesen D., Nardin E., Nussenzweig R.S., Nussenzweig V., Hollingdale M.R. & Levine M.M. (1987). Safety and immunogenicity on man of a synthetic peptide malaria vaccine against *Plasmodium falciparum* sporozoites. *Nature* 328: 257-259.

Lamb J.R. & Eckels D.D. (1982). *In vitro* influenza virus-specific antibody production in man: antigen-specific and HLA-restricted induction of helper activity mediated by cloned human T lymphocytes. *Journal of Immunology* 129: 1465-1470.

Loh D., Ross A.H., Hale A.H., Baltimore D. & Eisen H.N. (1979). Synthetic phospholipid vesicles containing a purified viral antigen and cell

membrane proteins stimulate the development of cytotoxic T lymphocytes. *Journal of Experimental Medicine* 150: 1067-1072.

Lowell G.H., Smith L.F., Seid R.S. & Zollinger W.D. (1988). Peptides bound to proteasomas via hydrophobic feet become highly immunogenic without adjuvants. *Journal of Experimental Medicine* 167: 658-663.

Javaherian K., Langlois A.J., Larosa G.J., Profy A.T., Bolognesi D.P., Herlihg W.C., Putney S.D. & Mattheus T.J. (1990). Broady neutralizing antibodies elicited by the hypervariable neutralizing determinant of HIV-1. *Science* 250: 1590-1593.

Kaufmann S.H., Eichmann K., Muller I. & Wrazel L.J. (1985). Vaccination against the intracellular bacterium *Listeria monocytogenes* with clonotypic antiserum. *Journal of Immunology* 134: 4123-4127.

Kennedy R.C. & Dreesman G.R. (1984). Enhancement of the immune response to hepatitis B surface antigen. *Journal of Experimental Medicine* 159: 655-665

Kieny M.P., Blancou J., Lathe R., Pastoret P.P., Soulebot J.P., Desmettre P. & Lecocq J.P. (1988). Development of animal recombinant DNA vaccine and its efficacy in foxes. *Reviews of Infectious Diseases* 10: S799-S802.

Klein J. (1986). Natural history of the major histocompatibility complex. *John Wiley & Son*, New York, USA. 775 pp.

Mackett M., Smith G.L. & Moss B. (1982) Vaccinia virus: a selectable eukaryotic cloning and expression vector. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 79: 7415-7419.

Mekalanos J.J., Swartz D.J., Pearson G.C., Harford N., Groyne F. & De Wilde M. (1983). Cholera toxin genes: nucleotide sequences, deletion analysis and vaccine development. *Nature* 306: 551-557.

Morein B., Lovgren K., Holund S., Dalsgar D., Osterhaus A. (1984). ISCOM a novel structure for antigenic presentation of membrane proteins from envelopment viruses. *Nature* 308: 457-460.

Morein B., Lovgren K., Hoglund S., Sundquist B. (1987). The ISCOM: an immunostimulating complex. *Immunology Today* 8: 333-339.

Newton S.M.C., Jacob C.O. & Stocker B.A.D. (1989). Immune response to cholera toxin epitope inserted in *Salmonella* flagellin. *Science* 244: 70-72.

Roitt I.M. (1989). Basic concepts and new aspects of vaccine development. *Parasitology* 98: S7-S12.

Roitt I.M. (1990). Essential Immunology. *Blackwell scientific Publications*.

Paoletti E., Lipinskas B.R., Samsonoff C., Mercer S. & Panicali D. (1984). Construction of live vaccines using genetically engineered poxviruses: biological activity of vaccinia hepatitis B virus surface antigen and the herpes simplex virus glycoprotein D. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 81: 193-197.

Patarroyo M.E., Amador R., Clavijo P., Moreno A., Guzmán F., Romero P., Tascon R., Franco A., Murillo L.A., Ponton G. & Trujillo G. (1988). A synthetic vaccine protects humans against challenge with asexual blood stages of *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature* 332: 158-161.

Poirier T.P., Kehoe M.A. & Beachey E.H. (1988). Protective immunity evoked by oral administration of attenuated *aroA* *Salmonella Typhimurim* expressing cloned streptococcal M protein. *Journal Experimental Medicine* 168: 25-32.

Sacks D.L., Esser k.M., & Sher A. (1982). Immunization of mice against african trypanosomiasis using anti-idiotypic antibodies. *Journal of Experimental Medicine* 155: 1108-1119.

Sacks D.L., Kirchhoff L.V., Hiény S. & Sher A. (1985). Molecular mimicry of a carbohydrate epitope on a major surface glycoprotein of *Trypanosoma cruzi* by using anti-idiotypic antibodies. *Journal of Immunology* 135: 4155-4159.



Sadoff J.C., Ballou W.R., Baron L.S., Majarian W.R., Brey R.N., Hockmeyer W.T., Young J.F., Cryz S.J., Ou J., Lowell G.H. & Chulay J.D. (1988). Oral *salmonella typhimurium* vaccine expressing circumsporozoite protein protects against malaria. *Science* 240: 336-338.

Sharpe A.H., Gaulton G.N., McDade K.K. et al. (1984). Singenic monoclonal antibodies can induce cellular immunity to reovirus. *Journal Of Experimental Medicine* 160: 1195-1205

Smith G.L. & Moss B. (1983). Infectious poxvirus vectors have capacity for at least 25,000 base pairs of foreign DNA. *Gene* 25: 21-24.

Smith E.L., Murphy B.R., & Moss B. (1983). Construction and characterization of an infectious vaccinia virus recombinant that expresses the influenza hemagglutinin gene and induces resistance to influenza virus infection in hamsters. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 90: 7155-7159.

Snapper S.B., Lugosi I., Jekkerl A., Melton R.E., Kieser T. & Bloom B.R. (1988). Lysogeny and transformation in mycobacteria: stable expression of foreign genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 85: 6987-6991.

Stein K.E. & Soderstrom T. (1984). Neonatal administration of idiotype or antiidiotype primers for protection against *E.coli* K13 infection on mice. *Journal of Experimental Medicine* 160: 1001-1011.

Steward M.W. & Howard C.R. (1987). Synthetic peptides: a next generation of vaccines?. *Immunology Today* 8: 51-58.

Stover C.K., De la Cruz V.F., Fuerst T.R., Burlein J.E., Benson L.A., Bennett L.T., Bansal G.P., Young J.F., Lee M.H., Hatfull G.F., Snapper S.B., Barletta R.G., Jacobs W.R. & Blomm B.R. (1991). New use of BCG for recombinant vaccines. *Nature* 351: 456-460.

Tartaglia J., Pincus S. & Paoletti E. (1990). Poxvirus-based vectors as vaccine candidates. *Immunology* 10: 13-30.

Uytdehaag G.C. & Osterhaus D.M.E. (1985). Induction of neutralizing antibodies in mice against poliovirus type II with monoclonal anti-idiotypic antibodies. *Journal of Immunology* 134: 1225-1229.

Yilma T., Hsu D., Jones L., Owens S., Grubman M., Mebus C.H., Yamanaka M. & Deal B. (1988). Protection of cattle against rinderpest with vaccinia virus recombinant expressing the Ha of F gene. *Science* 242: 1058-1061.

Young R.A., Mehra V., Sweetser D. Buchanan T., Clark-curtiss J., Davis R.W. & Bloom B.R. (1985). Genes for the major protein antigens of the leprosy parasite *Mycobacterium leprae*. *Nature* 316: 450-452.

Zahradiik J.M., Couch R.B. & Gerin J.L. (1987). Safety and immunogenicity of a purified hepatitis B virus vaccine prepared by using recombinant DNA technology. *Journal of Infected Diseases* 155: 903-907.

Zanetti M., Sercarz E. & Salk J. (1987). The immunology of new generation vaccines. *Immunology Today* 8: 18-25.

Zavala F., Tam J.P., cochrane A.H., Quaky I., Nussenzweig R.S., Nussenzweig V. (1985). Rationale for development of a synthetic vaccine against *Plasmodium falciparum* malaria. *Science* 228: 1436-1438.

**APENDICE B**

***AVANCES EN EL DESARROLLO DE VACUNAS CONTRA  
PARASITOS***

La vacunación como medida profiláctica ha resultado muy efectiva en el control de algunas enfermedades humanas. Así, ha permitido el control de la fiebre amarilla, la poliomielitis, el sarampión y erradicar la viruela. Aún cuando los nuevos conocimientos en inmunología, biología celular y molecular, bioquímica y genética molecular han permitido avanzar en el desarrollo de nuevas vacunas, no han permitido aún desarrollar nuevas vacunas eficientes. Este punto es más notorio aún en el control de enfermedades parasitarias. Probablemente la dificultad para desarrollar vacunas contra enfermedades parasitarias se deba a la complejidad de los parásitos, su capacidad de modificar al hospedero y su respuesta inmune, aunado a los problemas intrínsecos del desarrollo de una vacuna. Entre las características del parásito podemos citar (1) la complejidad estructural y de los ciclos de vida de los parásitos, de los que aún falta por conocer muchos aspectos de su biología básica, así como de la naturaleza de los mecanismos inmunes que activan, (2) la cronicidad de las infecciones probablemente determinadas por una respuesta inmune controlada y la alta eficiencia de diversos mecanismos de evasión y (3) dificultades para evaluar la eficiencia de la vacunación en poblaciones, dadas principalmente por la carencia de estudios epidemiológicos adecuados para medir efectos reales en el campo (Mitchell, 1989). Así, el desarrollo de vacunas contra enfermedades parasitarias está casi totalmente restringido a fases experimentales.

Los siguientes aspectos se consideran relevantes en la obtención de vacunas contra enfermedades parasitarias:

(a) Evaluar si existe resistencia natural a la enfermedad. Con la vacunación se intenta inducir una resistencia similar a la encontrada en

hospederos que se han recuperado de la infección natural. Aquí es importante diferenciar entre inmunidad concomitante (resistencia hacia la reinfección homóloga en individuos infectados) y la resistencia relacionada con factores circunstanciales y genéticos así como la no exposición al parásito.

(b) Identificar la fase parasitaria más susceptible al control del sistema inmune del hospedero. Esto permite también la identificación de los eventos moleculares críticos y vitales para la invasión, diferenciación, persistencia y propagación del parásito en el hospedero, los cuales al ser determinantes probablemente puedan ser blancos para el ataque inmune inducido por vacunación.

(c) Identificación de los componentes antigénicos presentados por el parásito que inducen protección pero no patología. Para la identificación de epítomos asociados a la respuesta inmune protectora ha sido sumamente importante el uso de (i) anticuerpos monoclonales, (ii) clones de líneas celulares de células T específicas (iii) identificación de la respuesta inmune en individuos genéticamente resistentes, (iv) utilización de modelos relevantes, particularmente los murinos para los cuales existe amplia información inmunogenética e inmunológica, así como reactivos biológicos disponibles, (v) identificación y caracterización de epítomos relevantes invariantes en antígenos variantes que puedan cambiar ante presiones evolutivas hacia respuestas inmunes potencialmente protectoras, (vi) identificación de los antígenos expuestos al sistema inmune en los distintos estadios de la parasitosis, (vii) fraccionamiento progresivo de extractos de antígenos crudos que sean candidatos a vacunas, (viii) construcción de librerías de expresión

de las proteínas del parásito e identificación y selección de clonas que expresen antígenos protectores.

(d) Identificación de secuencias de epítomos protectores. Para ello se utilizan métodos de síntesis biológica y/o química que permitan excluir secuencias no deseables por ser inmunopatológicas, inmunodominantes pero irrelevantes, inductoras de respuestas supresoras, autoepítomos, etc. Aún cuando extractos crudos de parásitos pueden ser efectivos confiriendo altos niveles de protección en hospederos naturales, su complejidad probablemente influya en el poco éxito obtenido cuando se usan como inmunógenos (Sciutto *et al.*, 1990, Molinari *et al.*, 1983), además de que los extractos crudos puedan contener epítomos adversos. También se pueden combinar varios epítomos protectores para diseñar antígenos protectores múltiples.

(e) Selección de inmunopotenciadores seguros y aplicables.

(f) Caracterización de la respuesta inmune asociada a infecciones crónicas y a la susceptibilidad a la parasitosis que pueda ser salvada por preprogramación del sistema inmune por vacunación.

(g) La presencia y relevancia de mecanismos de evasión. Parásitos causantes de enfermedades crónicas utilizan una variedad de estrategias para evitar la inducción y expresión de respuestas inmunes agresivas. Estas incluyen desde ocupar sitios inmunológicamente privilegiados (mucosas o superficies cutáneas) o sitios intracelulares donde expresan un mínimo de antígenos o epítomos, hasta la variación antigénica y heterogeneidad poblacional.

(h) Identificación de genotipos de parásitos que permitan conocer la heterogeneidad genética en la población parasitaria.

(i) Identificación de los factores genéticos y ambientales que influyen en la respuesta hacia la vacunación.

(j) Desarrollar protocolos adecuados para la administración óptima de la vacuna.

En esta revisión se resumen los principales aspectos del desarrollo actual de vacunas para algunas de las enfermedades parasitarias más importantes por su incidencia, prevalencia y por los trastornos que causan en la salud. Sólo se describe un número limitado de antígenos candidatos a ser usados como vacunas, aquellos que han sido explorados en diseños de vacunas humanas o en extensas pruebas experimentales en diferentes sistemas o modelos.

## MALARIA

El paludismo es una enfermedad febril que afecta a millones de personas en el mundo, especialmente en países donde las condiciones climáticas favorecen la movilidad de los vectores críticos para la mantención del ciclo. Existen cuatro especies que infectan al hombre, *Plasmodium falciparum* que es el principal responsable de muertes, *P. vivax* con distribución media y morbilidad considerable, y las menos prevalentes *P. ovale* y *P. malarie*. Todas las cepas tienen numerosos fases en el ciclo

biológico y en cada uno son morfológica y antigénicamente diferentes. Así, cada fase presenta diversos blancos antigénicos en diferentes moléculas que pueden ser útiles para usar como vacuna, y obviamente ésta debe ser multivalente y producida por técnicas de DNA recombinante o por síntesis de péptidos, ya que el material biológico sólo puede ser producido por cultivo en cantidades limitadas y tienen alto riesgo de contaminación.

El paludismo induce una respuesta inmune muy débil, mediada en parte por anticuerpos y es fase y especie específica (Miller *et al.*, 1986). Se puede adquirir resistencia parcial en adultos por infecciones constantes a lo largo de toda la vida (Rodríguez, 1992). Existen tres corrientes en el desarrollo de vacunas anti-malaria.

#### (a) Inmunidad contra el esporozoito

Las vacunas contra el estadio de esporozoito tienen como objetivo bloquear la infección controlando la entrada del esporozoito y su desarrollo en el hígado. Se ha logrado obtener resistencia parcial a la infección inmunizando con esporozoitos irradiados en ratones, monos y humanos (Rodríguez, 1992) mientras los anticuerpos calostrales de madres así inmunizadas inducen resistencia total (Orjih *et al.*, 1981). Los esporozoitos son altamente inmunogénicos y la respuesta inmune inducida por esta fase parasitaria es la más estudiada. A través de la reacción de CSP se puso en evidencia la presencia de una proteína superficial que cubre al parásito. La proteína CSP del esporozoito (circunsporozoite protein) tiene propiedades bioquímicas e inmunológicas muy especiales. Está formada por una serie de aminoácidos repetidos en tandem en su parte media, diferente en tamaño y



secuencia para cada especie y constituyen los epítomos predominantemente reconocidos por los linfocitos (Zavala *et al.*, 1983). En *P. falciparum* los anticuerpos contra su tandem, denominado (NANP)<sub>3</sub>, evitan la invasión de hepatocitos *in vitro* y su desarrollo dentro de estas células. Personas inmunizadas con (NANP)<sub>3</sub> de diferentes tamaños acoplados a toxoide tetánico e hidróxido de aluminio como adyuvante, denominado (NANP)<sub>3</sub>tt, fueron completamente resistentes a la infección por esporozoitos, en una forma dosis-dependiente (Herrington *et al.*, 1987). Se han desarrollado otras dos vacunas basadas en la secuencia de (NANP)<sub>3</sub>. Una es una proteína de fusión hecha en *E. coli* con 32, 16 y 48 repeticiones de esta secuencia. En ratones indujo altos títulos de anticuerpos que reaccionan con la CSP natural y bloquean la invasión de hepatocitos humanos *in vivo*. La otra, llamada FSV-1, que ha sido probada en ratones y conejos, está constituida por una proteína acarreadora y el repetido (NANP)<sub>3</sub>, reconocido por sueros de humanos de zonas endémicas y de animales inmunizados con esporozoitos. Esta vacuna produjo altos niveles de anticuerpos que también reconocen a la CSP natural y bloquean la infectividad del parásito (Miller *et al.*, 1986). Actualmente, estas dos vacunas se están evaluando en humanos. Los primeros resultados han dado respuestas similares a los obtenidos en los sistemas experimentales. Las evaluaciones de ambas proteínas confirman la posibilidad de proteger contra esporozoitos utilizando una vacuna subunitaria derivada de CSP. Sin embargo, estas evaluaciones son sesgadas pues se utilizó para el desafío a subgrupos que se sabía responderían con el más alto título de anticuerpos. Aún dejando esto de lado, sólo un voluntario en cada caso fue completamente protegido, y en los que se dio la parasitemia su curso no se alteró, sólo se retardó. Otro punto importante es la dependencia dosis antígeno-título de anticuerpos y la ausencia de una respuesta secundaria eficiente con los

refuerzos. Con FSV-1, dosis de 800 mg indujo títulos similares a los obtenidos en poblaciones de zonas endémicas, y algunos de los receptores desarrollaron anticuerpos capaces de mediar la reacción de CSP y la inhibición de esporozoitos *in vitro*. Sin embargo, no hubo correlación entre el nivel de inmunidad inducido y el título de anticuerpos o la dosis (Ballou *et al.*, 1987). Con la vacuna (NANP)<sub>3</sub>tt la mayoría de los que recibieron dosis de 100 ó 160 µg seroconvirtieron y fueron positivos en inmunofluorescencia (IF) contra esporozoitos, pero no producen la reacción de CSP, respuesta secundaria ni proliferación linfocitaria (Herrington *et al.*, 1987). Esta falta de estimulación de células T señala la necesidad de obtener vacunas constituidas por epítomos inductores de células CD4+ y CD8+ cuando se usan péptidos de (NANP)<sub>3</sub>, ya que es necesaria la estimulación de ambas respuestas celulares para la generación de óptimas respuestas humorales de memoria y efectoras, así como para el reforzamiento de éstas por la exposición natural al parásito.

Se han identificado determinantes para células T cooperadoras en la CSP (Good *et al.*, 1988). Un inmunógeno constituido con uno de estos determinantes unido a un péptido de (NANP)<sub>3</sub> induce altos títulos de anticuerpos en ratones que no responden a (NANP)<sub>n</sub> sólo (Mitchell, 1989). Además, la CSP es capaz de inducir respuestas de linfocitos T citotóxicos (Kumar *et al.*, 1988).

Se han probado otras proteínas superficiales del esporozoito, como la p2 que cuando se administra junto con CSP induce protección total contra *P. yoelii* en la infección murina (Khusmith *et al.*, 1991).

(b) Inmunidad contra fases asexuales.

El parásito asexual (merozoito) que infecta eritrocitos es el causante de todos los síntomas de la enfermedad. Una vacuna basada en antígenos del merozoito tendría la ventaja de inducir inmunidad que se reforzaría con las infecciones naturales subsecuentes.

Se han identificado diversos antígenos del merozoito, superficiales, integrales de la membrana, de reconocimiento del eritrocito, de adhesión y de los organelos, así como receptores y proteínas estructurales del eritrocito, aunque aún no han sido probados (Perkins, 1984; Perkins 1989; Holder & Freeman 1984; Holder *et al.*, 1985). Entre los mecanismos de protección más estudiados figuran aquellos mediados por anticuerpos de acción neutralizante que bloquean la invasión de los eritrocitos y los que reconocen eritrocitos infectados.

Se ha obtenido protección de monos contra la infección fatal con *P. falciparum* con diferentes proteínas, pero todas requieren FCA (Miller *et al.*, 1986), lo cual señala la necesidad de encontrar un adyuvante equivalente para su uso en humanos que sea seguro y efectivo.

Una de las proteínas más estudiadas del merozoito es la RESA (ring-infected erythrocyte surface antigen) que también está constituida por secuencias repetidas inmunodominantes (Holder *et al.*, 1985). Anticuerpos contra la molécula nativa o contra su porción C-terminal son capaces de bloquear la invasión *in vitro* (Udomsangpetch *et al.*, 1986; Ruangjirachuporn *et al.*, 1988). Cuatro polipéptidos correspondientes a diferentes regiones de

RESA, obtenidos como proteínas de fusión en *E. coli*, fueron utilizados en inmunizaciones de monos *Aotus*. Los resultados muestran que hubo diferentes niveles de protección, con correlación directa entre título de anticuerpos y nivel de protección. El antígeno más prometedor es el ag632, que representa la secuencia repetida del extremo 5' (Collins et al., 1986).

De las moléculas membrales identificadas, la más promisorias para ser usada en vacunación es la PMMSA o MSA (precursor of the major merozoite surface antigen o merozoite surface antigen) de peso molecular entre 185-220 Kd (Holder & Freeman, 1984; Holder *et al.*, 1985). Esta molécula varía en tamaño y en sus epítomos antigénicos. Algunos anticuerpos que reaccionan con proteínas del PMMSA pueden inhibir la invasión por el merozoito *in vitro*, probablemente por aglutinación o por bloqueo del receptor en el eritrocito (Miller, 1986), como por ejemplo los fragmentos Fab o F(ab') de anticuerpos contra el complejo de 66-44-42 Kd de *P. knowlesi* (Thomas, 1984). Las inmunizaciones con esta molécula intacta o con diferentes partes de ella han dado diferentes grados de protección (Perrin *et al.*, 19885). Los protocolos con los que se han obtenido mejores resultados son con el uso de grandes dosis de la molécula intacta (Mitchell, 1989).

Es importante mencionar que cuando se usaron las proteínas superficiales de 140/143 y 66 kd, que se sintetizan separadamente del PMMSA, no se obtuvo protección, a pesar de que anticuerpos monoclonales contra ellas inhiben la invasión del merozoito. Ambas proteínas habían sido identificadas como invariantes, sin embargo, cuando se encuentran bajo presiones inmunes sufren una rápida variación antigénica que impide que los anticuerpos específicos bloquear su invasión a los eritrocitos (Klotz *et al.*,

1987; Deans *et al.*, 1988). Este mecanismo de evasión le permite escapar de la respuesta inmune y lo habilita para establecer la infección. Este fenómeno no es raro, por lo que es necesario identificar epítomos que sean expresados en todas las cepas naturales con nula o baja variación antigénica.

También en el organelo apical del merozoito, el rodopcito, se han identificado moléculas que inducen protección parcial en monos *Saimiri*, como el doblete de 41 kd, con parasitemias que no necesitan ser tratadas (Cooper *et al.*, 1989; Perrin *et al.*, 1985; Holder *et al.*, 1985; Certa *et al.*, 1988).

En la superficie de los eritrocitos infectados se desarrollan protuberancias de adhesión a células endoteliales o melanocitos, con lo cual impiden que sean arrastrados a tejidos donde pudieran ser destruidas, como en bazo, y aseguran su permanencia en compartimentos adecuados para su desarrollo. En la superficie exterior de estas protuberancias se ha identificado una proteína de tamaño variable de 250-350 kd (Leech *et al.*, 1984; Aley *et al.*, 1984). Los anticuerpos contra esta proteína aglutinan las células infectadas y bloquean la adhesión *in vitro* de una manera cepa-específica. A pesar de tener mucha variación antigénica, presenta epítomos conservados inmunogénicos y existen anticuerpos contra ellos en sueros de pacientes de zonas endémicas (Leech *et al.*, 1984; Marsh *et al.*, 1986; Marsh & Howard, 1986).

Aún cuando no se han realizado pruebas en humanos con PMMSA ni RESA solos, se han probado combinaciones que incluyen secuencias de éstas y de NANP. Después de ensayar diferentes combinaciones de polipéptidos,

se eligieron las proteínas de 83, 55 y 35 kd (Rodríguez, 1990). Estas tres proteínas fueron sintetizadas en una sola molécula con secuencias de NANP, lo que se llamó SPF66 y se probó en monos (Patarroyo *et al.*, 1987) y en humanos (Patarroyo *et al.*, 1988). En el caso de los voluntarios humanos, en la inmunización sin adyuvante sólo un individuo de 13 no desarrolló anticuerpos y presentó parasitemia alta. Cuando se administró con hidróxido de aluminio se obtuvieron diferentes niveles de protección, desde completa hasta nula. Los anticuerpos obtenidos bloquean la invasión y bajan el crecimiento del parásito *in vitro*. Además, se identificó un epitopo que interacciona con eritrocitos humanos con alta afinidad y que está presente también en una proteína de 200 kd de *P. vivax*, presentándose protección cruzada. Esta vacuna, inocua y eficaz en parte en humanos, se aplicó en estudios poblacionales, en donde protegió contra *P. falciparum* y contra *P. vivax* en un 44-85 %, con dos o tres dosis. Sin embargo, estos experimentos sólo han permitido avanzar conclusiones parciales. Así, las parasitemias debieron ser interrumpidas, no se incluyeron grupos controles adecuados, y los resultados no han podido ser reproducidos en otros laboratorios (Rodríguez, 1992; Mitchell, 1989).

(c) Inmunidad dirigida a las fases críticas de la transmisión.

Dado que no todos los gametocitos sanguíneos son tomados por el mosquito, muchos son presentados al sistema inmune, lo que origina la formación de anticuerpos y tal vez de células T específicas contra antígenos internos y externos. Cuando los gametos se localizan en el intestino del mosquito, quedan expuestos a estos anticuerpos. El efecto se manifiesta por un bloqueo en la infección de los mosquitos y aparentemente puede ser

mediado por inmunidad celular en roedores (Miller *et al.*, 1986). Este tipo de inmunidad humoral y celular también se da en humanos (Graves *et al.*, 1988; Mendis *et al.*, 1987, 1990; Good *et al.*, 1987).

Se ha identificado un complejo polipéptido de 23, 48 y 45 kd en la superficie de gametos y cigotos de *P. falciparum* y *P. gallinaceum* que es blanco de anticuerpos monoclonales bloqueadores, no tienen elementos repetidos, y el reconocimiento depende de la estructura terciaria de los epítomos (Vermeulen *et al.*, 1985; Quakyi *et al.*, 1987; Renner *et al.*, 1983; Ong *et al.*, 1990). También se ha identificado una proteína de 25 kd en los oocinetos de *P. falciparum* blanco de anticuerpos monoclonales bloqueadores de efecto postfertilizante (Vermeulen *et al.*, 1985). De esta forma, los antígenos usados para obtener inmunidad previenen la fertilización de los gametos y su desarrollo. Sin embargo, existe el riesgo potencial de que estos antígenos potencien la transmisión, ya que anticuerpos monoclonales y sueros humanos que bloquean la transmisión de *P. vivax* a altas concentraciones (periodo avanzado de la infección), la aumentan a bajas concentraciones (primeros días de la infección) (Mendis *et al.*, 1992; Peiris *et al.*, 1988). Así, una vacuna basada en estos antígenos deberá originar una inmunidad que se estimule rápidamente por las infecciones naturales, al iniciarse la temporada de propagación.

## CISTICERCOSIS

El estado inmunológico de los hospederos intermediarios tiene un importante papel en la regulación de la transmisión de parásitos, y se han

hecho varios intentos a fin de desarrollar vacunas para ser usadas en este tipo de hospederos.

La cisticercosis es una enfermedad causada por céstodos del género *Taenia*, y las más importantes a nivel socioeconómico y de salud son la cisticercosis humana y porcina causada por *T. solium*, la ovina por *T. ovis* y la bovina por *T. saginata*.

Sobre la respuesta inmune a esta parasitosis, se sabe que se desarrolla una respuesta humoral en pacientes humanos y diferentes modelos experimentales con anticuerpos específicos circulantes, pero no parece ser lo suficientemente eficiente en el control de la infección o en el establecimiento del parásito ya que el cisticerco logra sobrevivir por periodos prolongados (Sciutto *et al.*, 1994; Correa *et al.*, 1991). El sistema del Complemento parece jugar un papel importante en la destrucción de la oncosfera (Mitchell, 1982). En cuanto a la respuesta celular, se presenta una respuesta inflamatoria, que varía entre hospederos y con la localización de los parásitos en estos, y en la que generalmente se identifican eosinófilos, macrófagos, células granulomatosas, linfocitos y células plásmáticas (Willms & Merchant, 1980; Aluja, 1989; Bogh *et al.*, 1990, Flisser *et al.*, 1982). Sin embargo estas respuestas inmunes no parecen estar asociadas a protección en la cisticercosis murina por *T. crassiceps* (Sciutto *et al.*, 1991, 1994), probablemente debido a la forma de reproducción del parásito. La caracterización de poblaciones celulares ha permitido detectar diferencias en la relación de células CD4+/CD8+ y células B, dependiendo del órgano estudiado y la especie animal. Aún cuando existen controversias a este respecto, parece ser que se induce un alto número de células CD4+ en animales



TABLA I

Resumen de datos publicados de protección homóloga en el estudio de la cisticercosis.

Especie	Antígeno	vía de Adm.	Protección	Ref.
<i>T. pisiformis</i>	Extracto oncosferal	i.m.	94 %	Rajasekariah <i>et al.</i> , 1985
	Oncosferas solubilizadas	i.m.	97 %	
<i>T. taeniaeformis</i>	Cultivo de metacéstodos	i.p. oral	31 % 93 %	Ayuya <i>et al.</i> , 1979
	Metacéstodos solubilizados	i.p. oral	93 %	
<i>T. crassiceps</i>	Metacéstodos vivos	i.p.	37-99 %	Siebert & Good, 1980
<i>T. solium</i>	Extracto de metacésto	s.c.	82 %	Molinari <i>et al.</i> , 1983
		i.m.	99 %	Molinari <i>et al.</i> , 1993

i.p. Intraperitoneal

s.c. Subcutánea

i.m. Intramuscular

inmunizados (Meeusen *et al.*, 1990). Así, los estudios inmunológicos realizados sugieren que, en la cisticercosis porcina, existe una convivencia pacífica entre el hospedero y el parásito.

Los primeros experimentos para desarrollar vacunas contra la cisticercosis fueron usando antígenos obtenidos de cultivo de oncosferas *in vitro* y probados en infecciones experimentales en ovejas y ganado vacuno. Estudios subsecuentes mostraron que no era necesario cultivar las oncosferas para obtener antígenos vacunables, ya que al solubilizarlas por diferentes procedimientos se podían obtener antígenos inmunogénicos (Rickard, 1982). Sin embargo, el uso de antígenos de metacéstodos (larvas) también ha dado resultados prometedores, tanto en inmunizaciones heterólogas (Ito *et al.*, 1991) como homólogas (Tabla I) aunque no se han explorado tan extensamente.

Muchas evidencias apoyan la existencia de inmunoprotección cruzada entre diferentes especies de tenias, aún cuando los niveles de protección obtenidos por inmunización con antígenos de especies heterólogas (Tabla II, Lightowers, 1989) no es tan efectiva como la inmunización con productos antigénicos de especies homólogas (Tabla I). Resalta el hecho de que la ruta de administración, la naturaleza de los adyuvantes empleados y la dosis tienen una importante y definitiva influencia en la efectividad de los protocolos de inmunización. La característica más evidente de estos estudios es el hecho de que la mayoría de los experimentos han sido usando antígenos oncosferales, probablemente por ser estructuralmente más accesible al ataque por la respuesta inmune y constituir el primer contacto, y suponiendo que al

TABLA II  
Resumen de datos publicados de protección cruzada entre diferentes especies  
de tenidos (Lightowers M.W., 1989).

Challenge species	Immunizing species	Immunizing regimen/antigen	Protection afforded	Reference		
<i>T. pisiformis</i>	<i>T. hydatigena</i>	eggs (V), oral	88.8%	20		
		eggs (V), IM	19.3%	21		
		onc. (V), IM	28.1% <sup>a</sup>	21		
		onc. (V), DC <sup>f</sup>	47.5% <sup>M</sup>	18		
	<i>T. ovis</i>	eggs (V), oral	22.9%	20		
		eggs (V), IM	0	21		
		onc. (V), IM	40.6% <sup>a</sup>	21		
		onc. (V), DC	46.3% <sup>M</sup>	18		
		onc. (V), DC	0	20		
		onc. ES (NV), IM	0	20		
		<i>T. saginata</i>	<i>T. crassiceps</i>	metacystodes (V), IP	28.3%	22
				metacystodes (NV), IP	22.6%	22
<i>T. hydatigena</i>	eggs (V), oral		15.6%	22		
	onc. (V), IM		92.8%	21		
	onc. (V), IV		25.7%	22		
	onc. ES (NV), IM		26.8%	22		
<i>T. ovis</i>	onc. ES (NV), IM	60.3%	24			
	onc. ES (NV), IM	60.3%	25			
<i>T. taeniaeformis</i>	<i>T. crassiceps</i>	onc. ES (NV), IM	77.5% <sup>a</sup>	26		
		onc. ES (NV), IM	64.9% <sup>a</sup>	24		
	<i>T. hydatigena</i>	onc. ES (NV), IM	21.1%	22		
		onc. ES (NV), IM	28.4% <sup>a</sup>	27		
	<i>T. taeniaeformis</i>	metacystode (V), IP	73.5%	27		
		metacystode (NV), IM	54.3%	27		
	<i>T. hydatigena</i>	eggs (V), oral	88.4%	28		
		onc. (NV), oral	12.6%	28		
		onc. (NV), SC	30.4%	28		
	<i>T. pisiformis</i>	eggs (V), oral	41.3%	29		
		eggs (V), oral	94.5%	28		
		onc. (NV), oral	45.9%	28		
onc. (NV), SC		70.6%	28			
adult worm (V), IP		83.6% <sup>a</sup>	29			
metacystode (IV), SC		56.3% <sup>a</sup>	30			

Challenge species	Immunizing species	Immunizing regimen/antigen	Protection afforded	Reference
<i>T. saginata</i>	gravid proglottid (NV), IM		35.3%	27
		adult worm (NV), SC	0	30
		adult worm (V), SC	0	30
		adult worm (NV), IP	33.3%	29
		onc. ES (NV), IM	95.9%	27
		onc. ES (NV), oral	96.3%	27
<i>T. serialis</i>	metacystode (NV), SC	88.5% <sup>a</sup>	30	
<i>T. solium</i>	adult worm (V), SC	31.0% <sup>a</sup>	30	

Abbreviations: DC diffusion chamber; ES excretory/secretory;

IM intramuscular; IP intraperitoneal; IV intravenous; NV non-viable; onc. oncosphere; SC subcutaneous; V viable.

- <sup>a</sup> Original data indicate that the immunization resulted in a decreased viability of metacystodes established following the challenge infection compared with controls.
- <sup>b</sup> Prior infection via the normal route of infection as distinct from atypical infection which may occur as a result of other immunization protocols e.g. development of cystodes intramuscularly, in draining lymph nodes etc., following intramuscular injection of oncospheres.
- <sup>c</sup> Percent protection calculated on transformed data, see original reference.
- <sup>d</sup> Egg infection with "challenge species" and "immunizing species" given simultaneously.
- <sup>e</sup> Supernatant from *in vitro* culture of oncospheres.
- <sup>f</sup> Activated oncospheres implanted intraperitoneally in diffusion chambers.
- <sup>g</sup> Immunized with culture supernatant plus freeze-thaw-sonicate of cultured oncospheres.

dirigir la respuesta inmune contra éste, se detendrá ó evitará la infección en etapas tempranas (Mitchell, 1982).

Los estudios para desarrollar vacunas contra *T. ovis* han permitido identificar y producir por clonación, un antígeno oncosferal que induce protección altamente efectiva contra la infección por esta especie en ovejas, lográndose niveles de protección de hasta el 94 %. El antígeno está formado por una molécula recombinante simple llamada GST-45W y el nivel de protección es el más alto y prometedor reportado hasta ahora por vacunación contra parásitos (Johnson *et al.*, 1989).

En cuanto a *T. saginata*, M. Parkhouse y colaboradores ha identificado un antígeno oncosferal de superficie de 100-200 kd. A través de un anticuerpo monoclonal dirigido a este antígenos se obtuvieron niveles de protección altos en ganado vacuno (Harrison & Parkhouse, 1986). Actualmente se está clonando para obtener una proteína recombinante y utilizarla en las pruebas de inmunización correspondientes.

Si bien existen grandes y exitosos avances en el desarrollo de vacunas contra *T. ovis* y *T. saginata*, en el caso de la cisticercosis por *T. solium* es un aspecto menos desarrollado. A través de estudios de inmunizaciones heterólogas con antígenos totales del cisticerco de *Taenia crassiceps*, se ha logrado reducir en más del 50 % la infección en cerdos (Sciutto *et al.*, 1993). Recientemente se identificaron tres antígenos del fluido vesicular de *T. crassiceps* que inducen un 74 % de protección en ratones y los primeros resultados de inmunización en cerdos los señalan como fuertes candidatos para ser utilizados como vacuna (Valdez *et al.*, 1994).

Otras alternativas de control han sido desarrolladas a través de la transferencia pasiva de anticuerpos específicos a antígenos oncosferales que confieren protección o con suero de animales inmunizados naturalmente por infecciones primarias. Los resultados son controversiales aún en sistemas homólogos, pero a pesar de ésto se ha podido señalar la importancia de la inmunidad humoral en la resistencia hacia estados tempranos de infección (Harrison *et al.*,1986).

## TOXOPLASMOSIS

*Toxoplasma gondii* es un protista intracelular ampliamente distribuido en todo el mundo y capaz de infectar todas las especies de mamíferos. Mientras la infección en adultos causa una enfermedad leve o no aparente, en niños infectados congénicamente por vía transplacentaria (por infección durante la gestación) y en individuos inmunodeficientes infectados oralmente causa serias complicaciones e incluso la muerte. En los individuos con sistema inmune competente la infección induce inmunidad protectora a la reinfección de por vida, lo cual no es común en parasitosis. En este caso es importante desarrollar una vacuna que confiera inmunidad a la infección en mujeres para impedir la transmisión al feto y en animales domésticos para bloquear la vía de transmisión al humano y otros animales.

En cuanto a la inmunidad contra *T. gondii*, las células T sensibilizadas con extractos totales exhiben tanto fenotipos cooperadores como supresores ante la estimulación con antígenos *in vitro* (McLeod *et al.*, 1988). El IFN- $\gamma$  activa macrófagos capaces de destruir al parásito, además de bloquear su crecimiento en fibroblastos y aumentar la población de células Natural Killer

(NK) (Minato *et al.*, 1980; Suziki *et al.*, 1988, 1989). La IL-2 induce protección parcial contra taquizoitos virulentos *in vivo* aumentando la población de células NK (Sharma *et al.*, 1985), y también se ha demostrado la presencia de células NK directamente citotóxicas en ratones (Hauser & Tsai, 1986).

Se ha demostrado que algunos antígenos citoplasmáticos o superficiales del taquizoito pueden proteger ratones contra cepas moderadamente virulentas, como los antígenos de 58 y 28 Kd (Sharma *et al.*, 1984; Sibley & Sarma 1987). Del mismo modo, anticuerpos contra estos antígenos, así como contra los antígenos de 35 y 14 Kd, inducen protección (Johnson *et al.*, 1983). En tanto, un antígeno dominante del taquizoito de 30 Kd aumentó la mortalidad ante una cepa poco virulenta, al igual que los anticuerpos monoclonales específicos a dicho antígeno (Kasper *et al.*, 1985)

Darcy y colaboradores (1988) reportaron que antígenos de secreción-excreción del taquizoito inducen buenos niveles de protección de tipo humoral. Además, la transferencia pasiva de antisucros inmune o anticuerpos monoclonales específicos a estos antígenos induce en ratones niveles significativos de protección contra la cepa RH, la más virulenta de *T. gondii*.

Como en la mayoría de los protocolos de inmunización, la vía de inoculación y desafío son determinantes en la inducción de inmunidad protectora. Así, en vacunaciones subcutáneas o intraintestinales de ratones con una cepa atenuada de *T. gondii* (ts4) se desarrolló inmunidad protectora parcial al desafío parental con dosis letales de taquizoitos (cepa M7741) y también con desafíos orales de bradizoitos, observándose un mayor nivel de

protección en inmunizaciones subcutáneas. En tanto, ratones neonatos de madres inmunizadas intrainestinalmente son protegidos, pero no cuando fueron inmunizados subcutáneamente (McLeod *et al.*, 1988).

En cuanto a antígenos aislados, la proteína de membrana p30 del taquizoito de *T. gondii*, induce en ratón una respuesta específica predominantemente de células citotóxicas CD8+, que es parasitocida a parásitos extracelulares en ausencia de opsonización por anticuerpos, secreción de linfocinas, actividad de células NK y aparentemente sin restricción por MHC (Khan *et al.*, 1988). En tanto, la depleción de células CD4+ en ratones con infecciones agudas y crónicas tiene diferentes efectos, para los primeros se da una infección sistémica severa con poco daño al cerebro, en tanto que para los segundos se reactiva la infección llevando a la muerte, como ocurre con pacientes con SIDA, (Vollmer *et al.*, 1987). Sin embargo, Israelski (1989) encontró lo contrario, en ratones crónicamente infectados con las mismas características no sólo no se desarrolló tal respuesta inflamatoria, sino que decrece, a menos que se suspenda el tratamiento con anticuerpos específicos a células CD4+, en cuyo caso si se presenta la histopatología reportada. Estas diferencias pueden deberse a la tiempos de infección en que se realizaron los estudios. Así, el más fuerte candidato a ser usado como vacuna es la proteína superficial p30 del taquizoito. Esta proteína es dominante y es reconocida predominantemente por sueros de infecciones agudas y de convalescientes, induce la formación de anticuerpos específicos que protegen en inmunizaciones pasivas, y también induce la producción de IFN- $\gamma$  y células T citotóxicas, y tiene efecto parasiticidad *in vitro* cuando se usan sueros poli y monoclonales específicos a ella. Cuando esta proteína es administrada con Quil-A, se obtiene protección del 90 al 100 % en ratones,

dependiendo de la cepa de éstos. Se confiere protección por transferencia de células inmunes de ratones vacunados, demostrando además que la población de células de CD8+ está directamente involucrada en la protección, en tanto que las CD4+ parecen ser irrelevantes. Este protocolo de inmunización además produce un incremento importante de IL-2 y de IFN- $\gamma$ , y las células CD8+ son también capaces de lisar parásitos extracelulares e intracelulares en macrófagos peritoneales (Khan *et al.*, 1991). Cuando la p30 es obtenida de la cepa RH, la más virulenta, y usando liposomas como adyuvante se obtienen niveles de protección cercanos al 93 % ante el desafío de la cepa C, que aún mantiene todas las propiedades de una cepa silvestre (Bulow & Boothrogd, 1991).

## ESQUISTOSOMIASIS

La esquistosomiasis es una infección intravascular crónica causada por los tremátodos del género *Schistosoma*. Esta parasitosis es una de las más importantes por su incidencia en el humano, registrándose los más altos índices de infección en zonas tropicales. Las especies principales son *S. mansoni*, *S. japonicum* y *S. haematobium*.

La información más importante con respecto a la naturaleza de la inmunidad ha sido obtenida de modelos experimentales con roedores. Los más empleados son el ratón (altamente susceptible), la rata (susceptibilidad media) y el conejillo de indias (susceptibilidad media). Se han identificado dos tipos de mecanismos principalmente involucrados en la inmunidad contra la esquistosomula (fase infectiva), (i) mecanismos dependientes de anticuerpos, donde IgG e IgE median la protección en ratas, en conjunto con



eosinófilos, macrófagos y plaquetas (Capron *et al.*, 1987) (ii) mecanismos mediados principalmente por células dependientes de linfocitos T que funcionan a través de la actividad citotóxica directa de macrófagos activados por linfocitos T cooperadores, como se ha observado principalmente en el ratón (James *et al.*, 1985; James & Cheener, 1985; Lewis *et al.*, 1987). Sin descartar que se den ambas respuestas.

La mayoría de los antígenos candidatos a vacuna han sido identificados a través de la transferencia pasiva de inmunidad. Se ha obtenido protección parcial en inmunizaciones homólogas con antígenos membranales de la forma adulta de *S. mansoni* (Smithers *et al.*, 1989). Esta protección se da por anticuerpos que reconocen un antígeno de 25 Kd que actualmente está en proceso de clonación (Smithers *et al.*, 1989; Knight *et al.*, 1989).

Entre los más fuertes candidatos se encuentra la P28 (Gluthathione-S-transferase) de *S. mansoni*, la P26 de *S. japonicum* (Smith *et al.*, 1987, Balloul *et al.*, 1976; Wolowczuki *et al.*, 1989a, b). El antisuero anti-P28 transfiere altos niveles de protección en ratas, al igual que la proteína recombinante, dando en ratón protección de 40 %, en rata de 65 % y en el conejillo de Indias del 50 % (Capron *et al.*, 1987). Ambas proteínas son poco inmunogénicas en el ratón, pero su inmunogenicidad puede aumentarse con hidróxido de aluminio. Se han identificado epitopos para células B y T en P28, lo cual lo refuerza como candidato vacunable (Auriault *et al.*, 1988).

La GP38 es otro candidato, esta es una glicoproteína de membrana altamente inmunogénica identificada por anticuerpos monoclonales protectores de rata (Capron *et al.*, 1987; Kelly *et al.*, 1986). La inmunización

activa contra este antígeno fue lograda usando un anticuerpo anti-idiotipo dirigido contra el monoclonal protector IPLSm1, que desventajosamente es inhibido por anticuerpos inducidos por este mismo antígeno y está glicosilado, lo que limita su producción por técnicas de DNA recombinante. Ambos, el IPLSm1 y su anti-idiotipo, inducen protección en un rango del 70 al 90 % (Grzych *et al.*, 1984; Grzych *et al.*, 1985; Omer-Ali *et al.*, 1988).

Otra de las moléculas que se destacan por su nivel de protección (60 %) es la paramiosina o Sm97 (Pearce *et al.*, 1986; Lanar *et al.*, 1986). La proteína pura o recombinante induce niveles de protección en ratón, equivalentes a los obtenidos por extractos totales de parásitos, y la inmunidad está dada por respuesta de células T y la producción de altos títulos de anticuerpos (Sher *et al.*, 1989). Esta molécula no se expresa en la superficie y parece ser un factor determinante en la inmunidad adquirida hacia *S. mansoni* en el hombre.

Finalmente, la molécula GP18, que parece expresarse establemente en la superficie membranal de la esquistosomula, y que reconocida principalmente por anticuerpos de ratones vacunados con cercarias irradiadas, está siendo estudiada ya que en su forma nativa induce protección significativamente (Sher *et al.*, 1989).

## TRIPANOSOMIASIS

*Trypanosoma* es un protista flagelado, parásito de humanos y otros mamíferos. La profilaxis de la enfermedad de chagas es a través del control de los vectores de transmisión, como los animales domésticos que cohabitan

con chinches *Triatoma infestans*, el vector más importante de *T. cruzi* en Latinoamérica (Barnes, 1985).

No se conocen completamente los mecanismos inmunes involucrados en la protección, pero se sabe que en infecciones murinas participan los linfocitos T contra la forma aguda (Nogueira *et al.*, 1986; Nickell *et al.*, 1987), que el parásito puede ser destruido *in vitro* por macrófagos activados por productos de linfocitos (Nogueira & Cohn, 1978), lo que se asocia con procesos oxidativos (Nathan *et al.*, 1979). Un componente importante en la destrucción del parásito es el IFN- $\gamma$ , que administrado en ratones *in vivo* e *in vitro* aumenta la capacidad de los macrófagos peritoneales para matarlo, al igual que en monocitos periféricos y macrófagos humanos, aunque en menor grado (Reed *et al.*, 1987; Reed, 1988). En Animales protegidos por infecciones activas se inducen anticuerpos protectores o líticos, que se detectan en ensayos de lisis mediada por complemento y/o inmunofluorescencias realizadas con tripanomastigotes de cultivo o formas sanguíneas viables. En tanto, en animales inmunizados con diferentes antígenos de *T. cruzi* sólo se detectan anticuerpos serológicos convencionales, los cuales se unen sólo a parásitos fijados, sin generar lisis y no se asocian a resistencia (Brenner, 1986). Esto tiene fuertes implicaciones en el hecho de que hasta ahora todos los intentos por vacunar animales con los varios tipos de antígenos probados (organismos vivos, atenuados o no prliferaivos, parásitos muertos, glucoproteínas membranales purificadas, homogenados celulares o fracciones subcelulares) han fallado en conferir protección, ya que los anticuerpos serológicos convencionales no se pueden unir a formas viables y por lo tanto no inducen mecanismos inmunes

efectores que dependen de la presencia de anticuerpos en la superficie de las células blanco.

Tal vez los resultados más alentadores son los obtenidos en estudios de control de la transmisión en pruebas de campo con sistemas naturales de dispersión. En este aspecto, inmunogénos constituidos por tripamastigotes vivos protegen mejor que los constituidos por tripamastigotes muertos. De esta forma se logró reducir la transmisión en un 60 % (Basombrio, 1990).

### LEISHMANIASIS

La *Leishmania* es transmitida por las moscas del género *Phlebotomus* e infecta células fagocíticas mononucleares en hospederos vertebrados, y en el hombre causa principalmente leishmaniasis visceral, que es fatal, y cutánea que no es fatal pero puede causar severas mutilaciones (Barnes, 1985). Su localización intracelular, en los fagolisosomas, le permite evadir la lisis. Actualmente se sabe que la inmunidad protectora está mediada por células CD4 Th-1, a través de la producción de IFN- $\gamma$  y de IL-2 que activan macrófagos. Por otro lado los linfocitos Th-2 exacerbaban la enfermedad a través de la producción de IL-4 (Modabber, 1989; Murray *et al.*, 1988; Heinzl *et al.*, 1989; Scott *et al.*, 1988). En humanos se ha observado el mismo papel para el IFN- $\gamma$  (Modabber, 1989), y también se atribuye la participación de las células CD8+ en protección por acción citotóxica directa (Playfair *et al.*, 1990).

La práctica profiláctica más usada en humanos es la leishmanización que es la infección provocada deliberadamente a partir de la transferencia de

organismos cutáneos, a partir de la cual se obtienen inmunidad esterilizante por largo tiempo. Este procedimiento es ampliamente aplicado en Iran y Rusia. El inóculo (aproximadamente  $2-3 \times 10^5$  parásitos de *L. major* en 0.1 de sobrenadante de cultivo) es inyectado intradérmicamente y desarrolla pequeñas lesiones cutáneas que sanan rápidamente sin presentar complicaciones. De esta forma, en los últimos años han sido protegidos más de 200, 000 civiles y 1.25 millones de soldados (Modabber, 1989). Aún cuando no protege en 100 % de los casos y pueden producir efectos colaterales que requieren tratamiento por años, su uso es aceptable en situaciones extremadamente críticas en las cuales la incidencia de la parasitosis es muy alta y no existen métodos alternativos.

También se han probado en humanos parásitos muertos, obteniéndose protección desde el 33 % al 84-90 % en diferentes estudios donde se evaluó el efecto de la vacuna através de pruebas cutáneas de conversión (Modabber, 1989), prueba que en humanos parece funcionar indicadora de respuesta inmune asociada a protección.

Otro intento para controlar la leishmaniasis cutánea localizada es a través del uso de parásitos muertos de *L. mexicana* en BCG. Los resultados indican, en sus primeros intentos, que tres inmunizaciones a lo largo de 32 semanas son suficientes para obtener niveles de cura similares a los obtenidos por quimioterapia, y con menos efectos colaterales (Modabber, 1989). Aún se está investigando este tipo de vacunación y la respuesta inmune generada por quimioterapia a fin de identificar los mecanismos protectores involucrados.

En cuanto a los modelos experimentales, en los cuales la susceptibilidad varía dependiendo de la especie parasitaria y que está controlada genéticamente, se han probado promastigotes vivos e irradiados, clonas no patógenas y macrófagos infectados muertos. El aspecto más sobresaliente de estos estudios es la caracterización de las células T involucradas en protección *in vivo*, que funcionan directamente o por transferencia pasiva. Así, las células T cooperadoras Th-1 son protectoras y las Th-2 inhiben la protección (Liew *et al.*, 1985a, b; Liew *et al.*, 1987; Scott *et al.*, 1987, 1988). Esta información permite delimitar las características que debe cumplir una vacuna para funcionar adecuadamente contra la leishmaniasis.

En cuanto a productos moleculares, la glucoproteína de membrana del promastigote, gP63 (Russell & Wilhelm, 1986) y el glicoconjugado mayor de superficie del factor de excreción, están involucrados en la unión de esta forma parasitaria al macrófago, e inducen protección que puede ser transferida por células T (Russell & Alexander, 1988).

## CONCLUSIONES

El principal desafío para el desarrollo de vacunas parasitarias es la elección del antígeno relevante y la presentación de éste para que el sistema inmune responda pronto y de manera efectiva y duradera. Para lograr este propósito, la inmunidad deberá estar dirigida contra todas las cepas del parásito en cuestión, debe inducirse con pocas dosis y ser reforzada por las infecciones naturales. La inclusión de epitopos para células T, no sólo para inducir respuestas citotóxicas sino también de memoria, podrá también

favorecer los resultados esperados. Sin embargo, los mayores obstáculos para el desarrollo de vacunas antiparasitarias están dados por las interacciones hospedero-parásito sobre las cuales falta aún mucho por conocer.

## REFERENCIAS

Aley S.B., Sherwood J.A., Howard R.J. (1984). Knob-positive and knob-negative *Plasmodium falciparum* differ in expression of a strain-specific malaria antigen on the surface of infected erythrocytes. *Journal of Experimental Medicine* 160: 1585-1590.

Aluja (1989). La histopatología de la cisticercosis porcina. En a. Flisser & Malagón F. (Eds.). Cisticercosis humana y porcina. Su conocimiento e Investigación en México. Limusa-Noriega, México D.F., p. 147-156.

Auriault C., Gras-Nassem H., Wolowczuki C., Pierce R.J., Ballou J.M., Neyrinh J.L., Drobecq H., Tartar A. & Capron A. (1988). A analysis of T and B cell epitopes of the *Schistosoma mansoni* p28 antigen in the rat model by using synthetic peptides. *Journal of Immunology* 141: 1687-1694.

Ayuya J.M. & Williams J.F. (1979). The immunological response of the rat to infection with *Taenia taeniaeformis*. VII. Immunization by oral and parental administration of antigens. *Immunology* 36: 825-834.

Ballou W.P., Hoffman S.L., Sherwood J.A., Holligdale M.R., Neva F.A., Hockmeyer W.T., Gordon D.M., Schneider I., Wirtz R.A., Young J.F., Wasserman G.F., Reeve P. & Chulay J.D. (1987). Safety and efficacy of a recombinant DNA *Plasmodium falciparum* vaccine. *Lancet* 1: 1277-1281.

Ballou M., Grzych J.M., Pierce R.J. & Capron A. (1976). A purified 28,000 dalton protein from *Schistosoma mansoni* adult worms protects rats and mice against experimental schistosomiasis. *Journal of Immunology* 138: 3448-3451.

Basombrio M.A. (1990). *Trypanosoma cruzi*: partial prevention of the natural infection of guinea pigs with a killed parasite vaccine. *Experimental Parasitology* 71: 1-8.

Bogh H., Lightowlers M.W., Sullivan N., Mitchell G. & Rickard M. (1990). Stage-specific immunity to *Taenia taeniaeformis* infection in mice. A histological study of the course of infection in mice vaccinated with either oncosphere or metacystode antigens. *Parasite Immunology* 12: 153-162.



Brener Z. (1986). Why vaccines do not work in chagas disease. *Parasitology Today* 2(7): 196-197.

Bulow R. & Boothroyd J. (1991). Protection of mice from fatal *Toxoplasma gondii* infections by immunization with p38 antigen in liposomes. *The Journal of Immunology* 147: 3496-3500.

Capron A., Dessaint J.P., Capron M., Ouma J.H. & Butterworth A.E. (1987). Immunity to schistosomes: progress toward a vaccine. *Science* 238: 1065-1072.

Certa U., Ghersa P., Dobeli H., Matile H., Kocher H.P., Shrivastava I.K., Shaw A.R. & Perrin L.H. (1988). Aldolase activity of a *Plasmodium falciparum* protein with protective properties. *Science* 240: 1036-1038.

Collins W.E., Anders R.F., Pappaioanou M., Campbell R.L., Skinner J.C., Andrysiak P.M., Favoloro J.M., Concoran L.M., Broderick J.R., Mitchell G.F. & Campbell C. (1986). Immunization of *Aotus* monkeys with recombinant proteins of an erythrocyte surface antigen of *Plasmodium falciparum*. *Nature* 323: 259-262.

Cooper J.A., Atkins A. & Saul A. (1989). N-terminal amino acid sequencing of the 105 kilodalton rhoptry antigen of *Plasmodium falciparum*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 33: 203-204.

Correa D., Dalma D., Espinoza B., Plancarte A., Rabiela M.T., Madrazo I., Gorodezky C. & Flisser A. (1985). Heterogeneity of humoral immune components in human cysticercosis. *Journal of Parasitology* 71: 535-541.

Darcy F., Deslee D., Santoro F., Charif H., Aurialt C., Decoster A., Duquesne V. & Capron A. (1988). Induction of a protective antibody-dependent response against toxoplasmosis by *in vitro* excreted/secreted antigens from tachyzoites of *Toxoplasma gondii*. *Parasite Immunology* 10: 553-567.

Deans J.A., Knight A.M., Jean W.C., Waters A.P., Cohen S. & Mitchell G.H. (1988). Vaccination trials in rhesus monkeys with a minor,

invariant, *Plasmodium knowlesi* protein. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 30: 535-552.

Garange-Mendis A.C., Rajakaruna J., Carter R. & Mendis K. (1992). Transmission blocking immunity to human *Plasmodium vivax* malaria in an endemic population in Kataragama, Sri Lanka. *Parasite Immunology* 14: 385-396.

Gazzinelli R.T., Hakim F.T., Hieny S., Shearer G.M. & Sher A. (1991). Synergistic role of CD4<sup>+</sup> and Cd8<sup>+</sup> T lymphocytes in IFN- $\gamma$  production and protective immunity induced by an attenuated *Toxoplasma gondii* vaccine. *The Journal of Immunology* 146: 286-289.

Good M.F., Maloy W.L., Lunde M.N., Margalit H., Cornette J.L., Smith G.L., Moss B., Miller L.H. & Berzofsky J.A. (1987). Construction of synthetic immunogen: use of a new T-Helper epitope on malaria circumsporozoite protein. *Science* 235: 1059-1062.

Good M.F., Quakyi I., Saul A., carter R. & Miller L.H. (1987). Human T clones reactive to the sexual stages of *Plasmodium falciparum* malaria. High frequency of gamete-reactive T cells in peripheral blood from non-exposed donors. *The Journal of Immunology* 138: 306-311.

Graves P.M., Carter R., Burkot T.R., Quakyi I.A. & Kumar N. (1988). Antibodies to *Plasmodium falciparum* gamete surface antigens in Papua New Guinea sera. *Parasite Immunology* 10: 209-212.

Grzych J.M., Capron M., Dissous C. & Capron A. (1984). Blocking activity of rat monoclonal antibodies in experimental schistosomiasis. *The Journal of Immunology* 133: 998-1004.

Grzych J.M., Capron M., Lambert P.H., Dissous C., Torres S. & Capron A. (1985). An anti-idiotypic vaccine against experimental schistosomiasis. *Nature* 316: 74-76.

Hauser W.E. & Tsai V. (1986). Acute toxoplasma infection of mice induces spleen NK cells that are cytotoxic for *Toxoplasma gondii* in vitro. *The Journal of Immunology* 136: 313-317.

Harrison L.J. & Parkhouse R.M. (1986). Passive protection against *Taenia saginata* infection in cattle by a mouse monoclonal antibody reactive with the surface of the invasive oncosphere. *Parasite Immunology* 8: 319-332.

Heinzel F.P., Sadick M.D., Holaday B.J., Coffman R.L. & Locksley R.M. (1989). Reciprocal expression of interferon gamma or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets. *Journal of Experimental Medicine* 169: 59-72.

Herrington D.A., Clyde D.F., Losonsky G., Cortesia M., Murphy J.R., Davis J., Baqar S., Felis A.M., Heimer E., Gillessen D., Nardin E., Nussenzweig V., Nussenzweig R.S., Holligdale M.R. & Levine M.M. (1987). Safety and immunogenicity in man of a synthetic vaccine against *Plasmodium falciparum* sporozoites. *Science* 238: 257-259.

Holaday B., Sadick M.D. & Pearson R. (1988). Isolation of protective T cells from BALB/cJ mice chronically infected with *Leishmania donovani*. *The Journal of Immunology* 141: 2132-2137.

Holder A.A. & Freeman R.R. (1984). The three major antigens of the surface of *Plasmodium falciparum* merozoites are derived from a single high molecular weight precursor. *Journal Of experimental Medicine* 160: 624-629.

Holder A.A., Freeman R.R., Uni S. & Aikawa M. (1985). Isolation of a *Plasmodium falciparum* rhoptry protein. *Molecular and Biochemical Parasitology* 14: 293-303.

Holder A.A., Lockyer M.J., Odink K.G., Sandhu J.S., Riveros-Moreno V., Nicholls S.C., Hillman Y., Darey L.S., Tizard M.L.V., Schwarz R.T. & Freeman R.R. (1985). Primary structure of the precursors to the three major surface antigens of *Plasmodium falciparum* merozoites. *Nature* 317: 270-273.

Israelski D.M., Araujo F.G., Conley F.K., Suzuki Y., Sharma S. & Remington J.S. (1989). Treatment with anti-L3T4 (CD4) monoclonal

antibody reduces the inflammatory response in toxoplasmic encephalitis. *Journal of Immunology* 142: 954-958.

Ito A., Takami T. & Itoh M. (1991). Vaccine effect of intact metacestodes of *Taenia crassiceps* against *T. taeniaeformis* infection in rats. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 44(6): 696-701.

James S. & Cheever A.W. (1985). Comparison of immune responses between high and low responder strains of mice in the concomitant immunity and vaccine models of resistance to *Schistosoma mansoni*. *Parasitology* 91: 301-315.

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

Johnson A.M., McDonald P.J. & Neoh S.H. (1983). Monoclonal antibodies to *Toxoplasma* cell membrane surface antigens protect mice from toxoplasmosis. *Journal of Protozoology* 30: 351-359.

Kasper L.H. (1987). Isolation and characterization of a monoclonal anti-P30 antibody resistant mutant of *Toxoplasma gondii*. *Parasite Immunology* 9: 433-436.

Kasper L.H., Crabb J.H. & Pfefferkorn E.R. (1983). Purification of a major membrane protein of *Toxoplasma gondii* by immunoabsorption with a monoclonal antibody. *The Journal of Immunology* 130: 2407-2412.

Kasper L.H., Currie K. & Bradley. (1985). An unexpected response to vaccination with a purified major membrane tachyzoite antigen (p30) of *Toxoplasma gondii*. *The Journal of Immunology* 134: 3426-3431.

Kelli C.K., Simpson A.J.G., Fox E., Phillips S.M. & Smithers S.R. (1986). The identification of *Schistosoma mansoni* surface antigens recognized by protective monoclonal antibodies. *Parasite Immunology* 8: 193-198.

Khan I.A., Ely K. & Kasper L.H. (1991). Purified parasite antigen (p30) mediates CD8+ cell immunity against fatal *Toxoplasma gondii* infection in mice. *The Journal of Immunology* 147: 3501-3506.

Khan I.A., Smith A. & Kasper L.H. (1988). Induction of antigen-specific parasiticidal cytotoxic T cell splenocytes by a major membrane protein (p30) of *Toxoplasma gondii*. *The Journal of Immunology* 141: 3600-3605.

Khusmith S., Charoenvit Y., Kumar S., Sedegah M., Beaudoin R.L. & Hoffman S.L. (1991). Protection against malaria by vaccination with sporozoites surface protein 2 plus CS protein. *Science* 252: 715-718.

Klotz F., Hudson D., Coon H. & Miller L.H. (1987). Vaccination-induced variation in the 140kD merozoite surface antigen of *Plasmodium knowlesi* malaria. *Journal of Experimental Medicine* 165: 359-367.

Knight M., Kelly C., Rodríguez V., Yi X., Wamachi A., Smithers S.R. & Simpson A.J.G. (1989). A cDNA clone encoding part of the major 25000-dalton surface membrane antigen of adult *Schistosoma mansoni*. *Parasitology Research* 75: 280-286.

Kumar S., Miller L.H., Quaky I., Keister D.B., Houghton R.A., Maloy W.L., Moss B., Berzofsky J.A. & Good M.F. (1988). Induction of circumsporozoite protein specific CTL by malaria sporozoites and epitope identification. *Nature* 334: 258-260.

Lanar D., Pearce E.J., James S.L. & Sher A. (1986). Identification of paramyosin as the schistosome antigen recognized by intradermally vaccinated mice. *Science* 234: 593-596.

Leech J.H., Barwell J.W., Miller L.H. & Howard R.J. (1984). Identification of a strain-specific malaria antigen exposed on the surface of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Journal Of Experimental Medicine* 159: 1567-1575.

Lewis f., Winestock J. & James S. (1987). Macrophages activation as an immune correlate to protective immunity against schistosomiasis in mice

immunized with an irradiated, cryopreserved live vaccine. *Infection and Immunity* 55(6): 1339-13245.

Liew F.Y., Hale C. & Howard J.G. (1985a). Prophylactic immunization against experimental leishmaniasis. IV subcutaneous immunization prevents the induction of protective immunity against fatal *Leishmania major* infection. *The Journal of Immunology* 135(3): 2095-2101.

Liew F.Y., Singleton A., Cillari E. & Howard J.G. (1985b). Prophylactic immunization against experimental leishmaniasis. V. Mechanism of the anti-protective blocking effect induced by subcutaneous immunization against *Leishmania major* infection. *The Journal of Immunology* 135(3): 2102-2107.

Liew F.Y., Hodson K. & Leitch R. (1987). Prophylactic immunization against experimental leishmaniasis. VI. Comparison of protective and disease-promoting cells. *The Journal of Immunology* 139(9): 3112- 3117.

Lightowers M. (1989). Recent advances in vaccination against cysticercosis. *Acta Leidensia* 57 (2): 135-142.

Marsh K. & Howard R.J. (1986). Antigens induced on erythrocytes by *Plasmodium falciparum*: expression of diverse and conserved determinants. *Science* 231: 150-153.

Marsh K., Sherwood J.A. & Howard R.J. (1986). Parasite-infected-cell-agglutination and indirect immunofluorescence assays for detection of human serum antibodies bound to antigens on *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Journal Of Immunological Methods* 91: 107-115.

McLeod R., Frenkel J.K., Estes R. G., Mack D.G., Eisenhauer P. & Gibori G. (1988). Subcutaneous and intestinal vaccination with tachyzoites of *Toxoplasma gondii* and acquisition of immunity to peroral and congenital toxoplasma challenge. *The Journal Of Immunology* 140: 1632-1637.

Meeusen E., Barcham G.J., Gorrell M.D., Rickard M. & Brandon M.R. (1990). Cysticercosis: cellular immune responses during primary and secondary infection. *Parasite Immunology* 12: 403- 418.

Miller L.H., Howard R.J., Carter R., Good M.F. Nussenzweig V. & Nussenzweig R. (1986). Research toward malaria vaccines. *Science* 234: 1349-1356.

Minato N.L., Reid P., Cantor P., Lengyze P. & Bloom B.R. (1980). Mode of regulation of natural killer cell activity by interferon. *Journal of Experimental Medicine* 152: 124-128.

Mitchell G.F. (1982). Genetic variation in resistance of mice to *Taenia taeniaeformis*: analysis of host protective immunity and immune evasion. In Cysticercosis: presents state of knowledge and perspectives. A. Flisser, K. Willms, J.P. Lacleste, C. Larralde, C. Ridaura & F. Beltran (Eds.) Academic Press, London. p 647-660.

Mitchell G.F. (1989). Problems specific to parasite vaccines. *Parasitology* 98: S19-S28.

Mitchell G.H. (1989). An update on candidate malaria vaccines. *Parasitology* 98: S28-S47.

Modabber F. (1989). Experiences with vaccines against cutaneous leishmaniasis of men and mice. *Parasitology* 98: S49-S60.

Molinari J.L., Meza R., Suárez B., Palacios S. & Tato P. (1983). *Taenia solium*: immunity in hogs to the cysticercus. *Experimental Parasitology* 55: 340-357.

Molinari J.L., Soto R., Tato P., Rodríguez D., Retana A., Sepúlveda J. & Palet A. Immunization against porcine cysticercosis in an endemic area in Mexico: a field and laboratory study. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 49(4): 502-512.

Murray H.W., Berman J.D. & Writh S.D. (1988). Immunotherapy for intracellular *Leishmania donovani* infection:  $\gamma$ -interferon plus pentavalent antimony. *Journal of Infectious Diseases* 157: 973-978.

Nardin E.H., Nussenzweig V., Nussenzweig R.S., Collins W.E., Harinasuta K.T., Tapchaisri P. & Chomcham Y. (1982). Circumsporozoite

proteins of human malaria parasites *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*. *Journal Of Experimental Medicine* 156: 2030.

Nathan C., Nogueira N., Ellis J. & Cohn Z.A. (1979). Activation of macrophages *in vivo* and *in vitro*. Correlation between hydrogen peroxidase release and killing of *Trypanosoma cruzi*. *Journal Of Experimental Medicine* 149: 1056-1059.

Nogueira N., Ellis J., Chaplan S. & Cohn Z. (1986). *Trypanosoma cruzi*: *in vivo* and *in vitro* correlation between T-cell activation and susceptibility in inbred strains of mice. *Experimental Parasitology* 51: 325-329.

Nogueira N. & Cohn Z.A. (1978). *Trypanosoma cruzi*: *in vitro* induction of macrophages microbicidal activity. *Journal Of experimental Medicine* 148: 288-293.

Nickell, S.P., Gebremichael R., Hoff R. & Boyer M.H. (1987). Isolation and functional characterization of murine T-cell lines and clones specific for the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. *The Journal of Immunology* 138: 914-918.

Omer-Ali P., Smithers R., Bickle Q., Phillips M., Harn D. & Simpson A. (1988). Analysis of the anti-*Schistosoma mansoni* surface antibody response during murine infection and its potential contribution to protective immunity. *The Journal of Immunology* 140: 258-264.

Ong C.S.L., Zhang K.Y., Eida S.J., Graves P.M., Dow C., Looker M., Rogers N.C., Chiodini P.L. & Targett G.A.T. (1990). The primary antibody response of malaria patients to *Plasmodium falciparum* sexual stage antigens which are potential transmission blocking vaccine candidates. *Parasite Immunology* 12: 447-456.

Patarroyo M., Amador R., Clavijo P., Moreno A., Guzmán F., Romero P., Tascon R., Franco A., Murillo L.A., Ponton G. & Trujillo G. (1988). A synthetic vaccine protects humans against challenge with asexual blood stages of *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature* 332: 158-161.



Patarroyo M., Romero P., Torres M.L., Clavijo P., Moreno A., Martínez A., Rodríguez R., Guzmán F. & Cabezas E. (1987). Induction of protective immunity against experimental infection with malaria using synthetic peptides. *Nature* 328: 629-632.

Pearce E.J., James S.L., Dalton J.P., Barral A., Ramos C., Strand M. & Sher A. (1986). Immunochemical characterization and purification of Sm-97, a *Schistosoma mansoni* antigen monospecifically recognized by antibodies from mice protectively immunized with a non-living vaccine. *Journal of Immunology* 137: 3593-3600.

Peiris J.S.M., Premawansa S., Ranakawa M., Udagama P., Muneshinge Y., Nanayakkara M., Gamage P., Carter R., David P.H. & Mendis K.N. (1988). Monoclonal and polyclonal antibodies can both block and enhance transmission of human *Plasmodium vivax* malaria. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 39: 26-32.

Perkins M.E. (1984). Surface proteins of *Plasmodium falciparum* merozoites binding to the erythrocyte receptor glycoporphin. *Journal of Experimental Medicine* 160: 788-798.

Perkins M.E. (1989). Erythrocyte invasion by malaria merozoite. *Experimental Parasitology* 69: 94-99.

Perrin L.H., Merkli B., Loch M.E., Chizzolini C., Mart J. & Riehl R. (1985). Antimalaria immunity in Saimiri monkeys. Immunization with surface components of asexual blood stages. *Journal of Experimental Medicine* 160: 441-451.

Quaki I.A., Carter R., Rener J., Kumar N., Good M.F. & Miller L.H. (1987). The 23 kDa gamete protein of *Plasmodium falciparum* is also target for transmission-blocking antibodies. *Journal of Immunology* 139: 4213-4217.

Rajasekariah G.R., Rickard M.D. & O'Donnell I.J. (1985). *Taenia pisiformis*: Protective immunization of rabbits with solubilized oncospherical antigens. *Experimental Parasitology* 59: 321-327.

Rickard M.D., Immunization against infection with larval taeniid cestodes using oncospherical antigens. In *Cysticercosis: presents state of knowledge and perspectives*. A. Flisser, K. Willms, J.P. Lacleite, C. Larralde, C. Ridaura & F. Beltran (Eds.). Academic Press, London 575.

Reed S.G. (1988). *In vivo* administration of recombinant IFN- $\gamma$  induces macrophages activation, and prevents acute disease, immune suppression, and death in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. *The Journal of Immunology* 140: 4342-4347.

Reed S.G., Nathan C.F., Pihl D.L., rodricks P., Shanebeck K., Conlon P.J. & Grabstein K.H. (1987). Recombinant granulocyte/macrophages colony-stimulating factors activates macrophages to inhibit *Trypanosoma cruzi* and release hydrogen peroxide. Comparison with interferon- $\gamma$ . *Journal of Experimental Medicine* 166: 1734-1238.

Rener J., Graves P.M., Carter R., Williams J.L. & Burtok T.R. (1983). Target antigens of transmission-blocking immunity on gametes of *Plasmodium falciparum*. *Journal of Experimental Medicine* 158: 976-981.

Rodríguez R., Moreno A., Guzmán F., Calvo M. & Patarroyo M.E. (1990). studies in owl monkeys leading to the development of a synthetic vaccine against the asexual blood stages of *Plasmodium falciparum*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 43: 333-338.

Rodríguez M.H. (1992). Vacunas contra el paludismo. En. Vacunas, Ciencia y Salud. Escobar A., Valdespino J.L. y Sepúlveda J. (Eds). Secretaria de Salud, México. p. 529-542.

Ruangjirachuporn W., Wahlin B., Perlmann H., Carlsson J., Berzins K., Wahlgren M., Udomsangpetch R., Wigzell H. & Perlmann P. (1988). Monoclonal antibodies to a synthetic peptide corresponding to a repeated sequence in the *Plasmodium falciparum* antigen Pf155. *Molecular and Biochemical Parasitology* 29: 19-28.

Rusell D.G. & Alexander J. (1988). Effective immunizations against cutaneous leishmaniasis with a defined membrane antigens reconstituted into liposomes. *The Journal of Immunology* 140: 1274-1279.

Rusell D.F. & Wilhelm H. (1986). The involvement of the major surface glycoprotein (gp63) of leishmania promastigotes in attachment to macrophages. *The Journal of Immunology* 136: 2613-2620.

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

Sciutto E., Aluja S.A., Fragoso G., Rodarte L.F., Hernández M., Villalobos M.N., Padilla A., Keilbach N., Baca M., Govezensky T., Díaz M.L. & Larralde E. (1994). Vaccination of pigs against *Taenia solium* cysticercosis: factors related to the induction of host protection or parasite facilitation. *En preparación*.

Scott P., Natovitz P., Coffman R.L., Pearce E.J. & Sher A. (1988). Immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. T cell lines that transfer protective immunity or exacerbation belong to different T helper subsets and respond to distinct parasite antigens. *Journal Of experimental Medicine* 168: 1675-1684.

Scott P., Pearce E., Natovitz P. & Sher A. (1987). Vaccination against leishmaniasis in a murine model. II. Immunologic properties of Protective and nonprotective subfractions of a soluble promastigote extract. *The Journal of Immunology* 139: 3118-3125.

Sharma S.D., Araujo F.G. & Remington J.S. (1984). Toxoplasma antigen isolated by affinity chromatography with monoclonal antibody protect mice against lethal infection with *Toxoplasma gondii*. *The Journal of Immunology* 133: 2818-2822.

Sharma S.D., Hofflin J.M. & Remington J.S. (1985). *In vivo* recombinant interleukin 2 administration enhances survival against a lethal challenge with *Toxoplasma gondii*. *The Journal of Immunology* 135: 4160-4164.

Sher A., Stephannie L., James R., Correa-Oliveira R., Hieny S. & Pearce E. (1989). Schistosoma vaccines: current progress and future prospects. *Parasitology* 98: S61-S68.

Sibley L.D. & Sharma S.D. (1987). Ultrastructural localization of an intracellular *Toxoplasma* protein that induces protection in mice. *Infection and Immunity* 55: 2137-2141.

Siebert A.E. & Good A.H. (1980). *Taenia crassiceps*: Immunity to metacestodes in BALB/c and BDF1 mice. *Experimental Parasitology* 50: 437-446.

Smithers S.R., Hackett F., Omer-Ali P. & Simpson A.J.G. (1989). Protective immunization of mice against *Schistosoma mansoni* with purified adult worm surface membranes. *Parasite Immunology* 11: 310-318.

Soulsby E.J.L. & Lloyd S. (1982). Passive immunization in cysticercosis: characterization of antibodies concerned. In *Cysticercosis: presents state of knowledge and perspectives*. A. Flisser, K. Willms, J.P. Lacleste, C. Larralde, C. Ridaura & F. Beltran (Eds.). Academic Press, London 539-545 .

Suzuki Y., Conley F.K. & Remington J.S. (1989). Importance of endogenous IFN- $\gamma$  for prevention of toxoplasmic encephalitis in mice. *The Journal of Immunology* 143: 2045-2050.

Suzuki Y., Orellana M.A., Schreiber R.D. & Remington J.S. (1988). Interferon- $\gamma$ : the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. *Science* 240: 516-519.

Suzuki Y. & Remington J.S. (1988). Dual recognition of resistance against *Toxoplasma gondii* infection by Lyt-2+ and Lyt-1+ L3T4+ T cells in mice. *Immunology* 140: 3943-3946.

Tanabe K., MacKay M., Goman M. & Scaife J.G. (1987). Allelic dimorphism in a surface antigen gene of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Journal Of Molecular Biology* 195: 273-287.

Thomas A.W., Deans J.A., Mitchell G.H., Alderson T. & Cohen S. (1984). The Fab fragments of monoclonal IgG to merozoite surface antigen inhibit *Plasmodium knowlesi* invasion of erythrocytes. *Molecular and Biochemical Parasitology* 13: 187-199.

Udomsangpetch R., Lundgren K., Berzins K., Perlmann H., Troye-Blomberg M., Carlsson J., Perlmann P. & Bjorkmann A. (1986). Human monoclonal antibodies to Pf155, a major antigen of malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Science* 231: 57-59.

Valdez F., Fragoso G., Hernández M., Govezensky T. & Sciutto E. (1994). Cysticercosis vaccine: identification of the most promising antigens involved in protection. Enviado a revisión a *The Journal of Parasitology*.

Vermeulen A.N., Ponnudurai T., Beckers P.J., Verhave P.J., Smits M.A. & Meuwissen J.H.E. (1985). Sequential expression of antigens on sexual stages of *Plasmodium falciparum* accessible to transmission-blocking antibodies in the mosquito. *Journal Of experimental Medicine* 162: 1460-1476.

Vollmer T.L., Waldor M.K., Steinman L., & Conley F.K. (1987). Depletion of T4+ lymphocytes with monoclonal antibody reactivates toxoplasmosis in the central nervous system: a model of superinfection in AIDS. *Journal of Immunology* 138: 3737-3741.

Willms K. & Mercatant M.T. (1980). The inflammatory reaction surrounding *Taenia solium* larvae in pig muscle: ultrastructural and light microscopic observation. *Parasite Immunology* 2: 261-268.

Wolowczuki C., Auriault A., Gras-Masse H., Vendeville C., Ballou J.M., Tartar A. & Capron A. (1989a). Protective immunity in mice vaccinated with the *Schistosoma mansoni* P-28-1 antigen. *The Journal of Immunology* 142: 1342-1350.

Wolowczuki C., Gras-Masse H., Vendeville C., Ballou J.M., Tartar A. & Capron A. (1989b). Protective immunity in mice vaccinated with the *Schistosoma mansoni* P28-1 antigen. *Journal of Immunology* 142: 1342-1350.

Yano S., Aosai F., ohta M., Hasekura A., Sugane K. & Hayashi S. (1989). Antigen presentation by *Toxoplasma gondii* infected cells to CD4+ proliferative T cells and CD8+ cytotoxic cells. *Journal of Parasitology* 75: 411-416.

Zavala F., Cochrane A.H., Nardin E.H., Nussenzweig R.S. & Nussenzweig V. (1983). Circumsporozoite proteins of malaria parasites contain a single immunodominant region with two or more identical epitopes. *Journal Of Experimental Medicine* 157: 1947-1957.

Zavala F., Tam J.P., Hollingdale M.R., Cochrane A.H., Quakyi I., Nussenzweig R.S. & Nussenzweig V. (1985). Rationale for the development of a synthetic vaccine against *Plasmodium falciparum* sporozoites. *Science* 228: 1436-1440.