

00346  
Lef



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

EVALUACION DE LAS POSIBILIDADES DE LA  
INMUNIZACION CON DNA EN LA CISTICERCOSIS  
EXPERIMENTAL MURINA

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE  
MAESTRIA EN CIENCIAS (BIOLOGIA CELULAR)

P R E S E N T A

**BIOLOGA CARMEN LETICIA CRUZ REVILLA**

DIRECTORA DE TESIS: DRA. EDDA L. SCIUTTO CONDE

1999

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

274565



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

EVALUACION DE LAS POSIBILIDADES DE LA INMUNIZACION CON DNA EN LA  
CISTICERCOSIS EXPERIMENTAL MURINA

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRIA EN CIENCIAS  
(BIOLOGÍA CELULAR)

PRESENTA

**Biol. Carmen Leticia Cruz Revilla**

México, D.F.

C.U., 1999

“No temais. La isla está llena de ruidos, de sonidos  
y de suaves melodías que deleitan y no hacen daño”

Shakespeare  
(La Tempestad)

A mis papás, Manolo y Magos; gracias por toda su comprensión, apoyo, confianza y amor.

“Al hombre, a la mujer  
que consumaron  
acciones, bondad, fuerza  
cólera, amor, ternura  
a los que verdaderamente  
vivos  
florecieron  
y en su naturaleza maduraron”

Pablo Neruda

A Juan Carlos, pues soy muy afortunada de haber encontrado una persona que admiro, que me hace sentir confiada y feliz, y que además es el amor de mi vida.

“A nadie te pareces desde que yo te amo.  
Déjame tenderte entre guirnaldas amarillas  
¿Quién escribe tu nombre con letras de humo  
entre las estrellas del sur?  
Ah déjame recordarte como eras entonces,  
cuando aún no existías”

Pablo Neruda

A mi tía Lupe y Ximena, para que sigan adelante en todo lo que se propongan.

Gracias Edda, por todo el apoyo y confianza que he recibido de tí. Eres una gran persona y excelente tutora.

A todos mis compañeros y amigos del Laboratorio, del Instituto y de la Facultad de Ciencias, por todo su apoyo y amistad.

A todos mis amigos, que son parte de mí y que gracias a ustedes la vida es mejor.

“El espacio tiene maravillas suficientes sin tener que inventarlas”

“Para encontrar una brizna de verdad ocasional flotando en un gran océano de confusión y engaño se necesita atención, dedicación y valentía”

“La llama de la vela parpadea. Tiembla su pequeña fuente de luz. Aumenta la oscuridad. Los demonios empiezan a agitarse”

Carl Sagan  
(El mundo y sus demonios)

El trabajo de esta tesis fue realizado en el Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, bajo la dirección de la Dra. Edda Sciutto Conde.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a la M. en C. Marisela Hernández y la Q.F.B. Mercedes Baca, quienes nos han asesorado y provisto del material adecuado para el desarrollo de este trabajo de tesis. Al personal del Bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM; especialmente a Gerardo Arrellín y Georgina Díaz, quienes nos han provisto de la ayuda técnica y los animales necesarios para este trabajo, y al departamento de Dibujo y Fotografía, principalmente a Enrique Vázquez y José Aviléz Garduño por toda su ayuda prestada para la realización de las figuras.

# INDICE

1. RESUMEN.....	8
2. GLOSARIO.....	10
3. INTRODUCCIÓN.....	11
3.I Ciclo de vida de <i>Taenia solium</i> .....	13
3.II Fases del ciclo de vida de <i>Taenia solium</i>	
3.II.a. Huevos.....	13
3.II.b. Cisticerco.....	15
3.II.c. Tenia.....	15
3.III La enfermedad.....	16
3.IV Control sanitario.....	17
3.V Ciclo de vida de <i>Taenia crassiceps</i> .....	17
4. ANTECEDENTES.....	19
5. OBJETIVOS.....	22
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
7. RESULTADOS.....	25
8. DISCUSIÓN.....	28
9. CONCLUSIONES.....	34
10. REFERENCIAS.....	36
11. APÉNDICE I. Vacunación con ADN.....	51
Tabla 1.....	53
Tabla 2.....	54
Tabla 3.....	56



12. APÉNDICE II. Características de los plásmidos para inmunización génica.....69

13. APÉNDICE III. Bupivacaina.....70

Tabla 5.....71

Tabla 6.....72

14. APÉNDICE IV. Artículos producidos durante la maestría.....73

1. Rosas, G., **Cruz-Revilla, C.**, Fragoso, G., López-Casillas, F., Pérez, A., Bonilla, M. A, Rosales, R. and E. Sciutto. 1998. *Taenia crassiceps* cysticercosis: humoral immune response and protection elicited by DNA immunization. *Journal of Parasitology* **84(3)**: 516 -523.

2. **Cruz-Revilla, C.**, Rosas, G., Fragoso, G., López-Casillas, F., Toledo, A. and E. Sciutto. 1999. *Taenia crassiceps* cysticercosis: protective effect and immune response elicited by DNA immunization. (Aceptado para su publicación al *Journal of Parasitology*).

## 1. RESUMEN

En este trabajo se evalúan las posibilidades de la vacunación con ADN en la cisticercosis experimental murina. Este tipo de vacunación se basa en la inoculación directa del ADN en el huésped, con el fin de lograr su entrada a las células, y la expresión por el propio huésped de las proteínas de interés. Se analizó la capacidad protectora de las construcciones realizadas en un vector de expresión para células eucariontes (pcDNA3), usando el ADNc del antígeno recombinante KETc7 del cisticerco de *Taenia crassiceps*, el cual ha sido reportado previamente como protector contra la cisticercosis murina. Las construcciones evaluadas incluyeron: la secuencia del antígeno KETc7 (pTc-7) o la secuencia para el péptido señal del receptor del betaglicano con la secuencia KETc7 (pTc-sp7). Se confirmó la capacidad de expresión de ambas construcciones transfectando los plásmidos a células eucariontes, y posteriormente realizando inmunofluorescencia indirecta. Se evaluaron diferentes protocolos, con el propósito de encontrar las mejores condiciones de inmunización. Se observó que la inmunización intramuscular con 3 inyecciones de pTc-sp7 en la dosis de 200 µg, con un intervalo de 15 días entre cada una de ellas, con o sin previa inyección de bupivacaina, fue la más efectiva para inducir anticuerpos, obteniendo un 85% de seroconversión. En estas condiciones de inmunización, pTc-sp7 indujo una protección en contra de la cisticercosis murina del 58.63%. Los anticuerpos inducidos por la inmunización con pTc-sp7 reaccionaron específicamente con la proteína nativa de 56 kDa, reportada previamente, la cual fue localizada por inmunofluorescencia en el tegumento de los cisticercos de *T. crassiceps*, al igual que en la oncosfera, cisticerco y tejido adulto de *T. solium*. Para confirmar la seguridad de este tipo de inmunización se corroboró que la construcción se mantenía extracromosomal (episomal) en las células musculares.

Siguiendo las mejores condiciones de inmunización previamente encontradas, se inmunizaron los ratones intramuscular o intradérmicamente. Se observó que con ambas vías de inmunización se inducen niveles similares de protección en contra de la infección con *T. crassiceps* (63% y 79%, respectivamente).

Los esplenocitos de los ratones inmunizados intramuscular o intradérmicamente con ADN inducen una proliferación específica de células T cuando se estimulan con antígenos totales de *T. crassiceps* o con un epítipo sintético del propio antígeno KETc7 (GK-1). Los estudios de citometría de la población celular proliferada, demuestran que esta población está enriquecida en linfocitos T CD8<sup>+</sup> CD4<sup>-</sup>. Un incremento claro en el porcentaje de células

CD3<sup>+</sup> que producen IFN- $\gamma$  e IL-2 fue detectado midiendo la producción de citocinas intracelulares, e indicando la capacidad de pTc-sp7 de inducir una respuesta celular efectiva.

Los resultados obtenidos en esta tesis sugieren que la inmunización con ADN puede ser considerada en la prevención de la cisticercosis, y señalan la relevancia de la respuesta inmune celular en el control de esta parasitosis.

## 2. GLOSARIO

ADN	Ácido desoxirribonucleico
APCs	Células presentadoras de antígeno
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
BPH	Bupivacaina, anestésico local
bp	Pares de bases
BSA	Albúmina sérica bovina
cADN	ADN complementario
C	Grados centígrados
CHCL <sub>3</sub>	Triclorometano (Cloroformo)
CH <sub>3</sub> OH	Metanol
CMV	Citomegalovirus
Con A	Concanavalina A (mitógeno)
CTLs	Linfocitos T citotóxicos
DMEM	Medio de cultivo
IFN- $\gamma$	Interferón Gamma
IL-12	Interleucina 12
i.p.	Intraperitoneal
KDa	Kilo Dalton
$\mu$ g	Microgramos
$\mu$ l	Microlitros
$\mu$ m	Micrómetros

Min	Minutos
MHC	Complejo Principal de Histocompatibilidad
mm	Milímetro
mM	Milimolar
mo	Mes
NaCl	Cloruro de sodio
NaOH	Hidróxido de amonio
OD	Densidad óptica
PBS	Amortiguador de fosfatos/salina (0.01M, NaCl 0.15) pH 7.2
PBS-T	PBS - tween 20 al 0.5%
pH	Potencial de Hidrógeno
PM	Peso molecular
RPMI 1640	Medio de cultivo para células eucariontas
SD	Desviación estándar del promedio
SS o SSI	Solución salina isotónica
TGF	Factor de crecimiento transformante
Tris-HCL	Trizma hydrochloride
Tritón x-100	t-Octylphenoxy polyethoxy-ethanol
v/v	Volúmen/volúmen
wk	Semana
w/v	Peso/volúmen

### 3. INTRODUCCION

La cisticercosis causada por *Taenia solium* es una enfermedad parasitaria que afecta al hombre y al cerdo, produciendo serios problemas de salud y socioeconómicos en países en desarrollo, siendo las zonas de alta prevalencia Asia, Africa y Latinoamérica (Gemmel et al., 1982, 1989; Sotelo et al., 1996; Larralde et al., 1992). Aunque la cisticercosis se encuentra parcialmente erradicada en países desarrollados e involucra principalmente a países en desarrollo, se ha observado un resurgimiento en países desarrollados debido a los inmigrantes de las zonas endémicas a Estados Unidos (Richards and Schantz, 1991; Loo and Braude, 1982; McCormick, 1982, 1985; Grisolia and Wiederholt, 1982). En el hombre, la presencia de la larva en el sistema nervioso central (neurocisticercosis), representa un problema de salud frecuente en México (Del Brutto and Sotelo, 1988), con importantes implicaciones sociales y económicas.

La transmisión de esta parasitosis se encuentra claramente relacionada con las condiciones sanitarias que prevalecen en las áreas endémicas y con la crianza rústica de los cerdos que se practica extensamente en los sectores pobres de la población. La factibilidad del control de la transmisión mediante el mejoramiento de la calidad de vida a nivel social, económico y educativo, no se contempla como una alternativa factible a corto plazo (Keilbach et al., 1989). La porcicultura se ve afectada de manera importante, en especial la que se practica de manera rústica, ocasionando no sólo importantes pérdidas económicas por decomiso de carne infectada, cuando ocasionalmente llega a inspección sanitaria, sino también permitiendo la persistencia del ciclo de esta parasitosis, cuando se consume carne de cerdo sin previa inspección o no es detectada la infección durante la inspección sanitaria (Aluja et al., 1982).

La elevada frecuencia con la que se presenta esta parasitosis así como los daños que ocasiona, justifican los intentos para prevenirla. Debido a las limitaciones para controlar la transmisión mejorando el nivel de vida de la población en los países subdesarrollados, y tomando en cuenta el papel esencial del cerdo como huésped intermediario en el ciclo de vida de *T. solium*, el desarrollo de una vacuna efectiva en el cerdo ofrece la posibilidad realista para el control de esta parasitosis, interfiriendo la transmisión mediante la modificación de la prevalencia de la cisticercosis porcina. Así, diferentes grupos de investigación han comenzado a identificar antígenos de interés para el desarrollo de una vacuna contra la cisticercosis porcina (Molinari et al., 1983, 1993, 1997; Sciutto et al., 1990a, 1995; Nascimento et al., 1995; Manoutcharian, et al., 1995, 1996; Evans et al., 1997).

## 2. GLOSARIO

ADN	Ácido desoxirribonucleico
APCs	Células presentadoras de antígeno
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
BPH	Bupivacaina, anestésico local
bp	Pares de bases
BSA	Albúmina sérica bovina
cADN	ADN complementario
C	Grados centígrados
CHCl <sub>3</sub>	Triclorometano (Cloroformo)
CH <sub>3</sub> OH	Metanol
CMV	Citomegalovirus
Con A	Concanavalina A (mitógeno)
CTLs	Linfocitos T citotóxicos
DMEM	Medio de cultivo
IFN- $\gamma$	Interferón Gamma
IL-12	Interleucina 12
i.p.	Intraperitoneal
KDa	Kilo Dalton
$\mu$ g	Microgramos
$\mu$ l	Microlitros
$\mu$ m	Micrómetros

Min	Minutos
MHC	Complejo Principal de Histocompatibilidad
mm	Milímetro
mM	Milimolar
mo	Mes
NaCl	Cloruro de sodio
NaOH	Hidróxido de amonio
OD	Densidad óptica
PBS	Amortiguador de fosatos/salina (0.01M, NaCl 0.15) pH 7.2
PBS-T	PBS - tween 20 al 0.5%
pH	Potencial de Hidrógeno
PM	Peso molecular
RPMI 1640	Medio de cultivo para células eucariontas
SD	Desviación estándar del promedio
SS o SSI	Solución salina isotónica
TGF	Factor de crecimiento transformante
Tris-HCL	Trizma hydrochloride
Tritón x-100	t-Octylphenoxy polyethoxy-ethanol
v/v	Volúmen/volúmen
wk	Semana
w/v	Peso/volúmen

La experimentación con cerdos involucra dificultades económicas y experimentales. Un análisis sistemático de los factores biológicos que participan en la susceptibilidad del huésped al parásito requiere de la instalación de un modelo experimental de cisticercosis por *T. solium*, que no ha sido factible desarrollar. Con el fin de disponer de un modelo experimental de cisticercosis, se comenzó a estudiar un modelo experimental de cisticercosis murina causado por *Taenia crassiceps* (Larralde et al., 1990; Sciutto et al., 1995a).

Según las observaciones realizadas, la cisticercosis por *T. crassiceps* presenta características atractivas para ser considerada como un buen modelo experimental, entre las que se puede mencionar:

- a. Su capacidad de infectar ratones, especie muy estudiada tanto genética como fisiológicamente, lo que facilita el estudio de los mecanismos de protección asociados a esta parasitosis, y la posibilidad de extrapolarlos al hombre y al cerdo.
- b. Se reproduce por gemación en la cavidad peritoneal de los ratones, propiedad que le permite mantenerse fácilmente en ratones de laboratorio por pases intraperitoneales sucesivos (Freeman, 1962; Dorais and Esch, 1969), además de ser un compartimento muy accesible de estudiar y de ser modificado, dando la oportunidad de evaluar los procesos de vacunación de forma sistemática y controlada.
- c. Existe una extensa similitud antigénica entre *T. solium* y *T. crassiceps* (Larralde et al., 1989), por lo que estos antígenos compartidos pueden ser importantes tanto para el diagnóstico como para la vacunación.
- d. El ciclo de vida de *T. solium* y *T. crassiceps* es muy semejante, aunque *T. crassiceps* presenta la característica adicional y diferencial de reproducirse por gemación
- e. Prácticamente no ofrece riesgos potenciales de infección para el humano.

Estas características han alentado la utilización de este modelo experimental, y han permitido orientar la investigación en cisticercosis en base a las observaciones realizadas en él.

### **3.1 Ciclo de vida de *Taenia solium***

El ciclo de vida de la *T. solium* incluye una fase larvaria (cisticerco), que afecta tanto al hombre (huésped definitivo) como al cerdo (huésped intermediario) y se adquiere por la ingesta de huevos presentes en alimentos contaminados con heces humanas (Fig. 1). Cuando el hombre consume carne de cerdo mal cocida e infectada, los cisticercos pueden desarrollarse en el intestino al estado adulto del parásito, la tenia, la cual puede producir cientos de miles de huevos capaces de transformarse en cisticercos cuando son ingeridos por el hombre o el cerdo, completándose así el ciclo de vida del parásito.

### **3.II Fases del ciclo de vida de *T. solium***

#### **3.II.a Huevos**

Los huevos son excretados en las heces de los portadores del parásito adulto, y es la única fase del parásito que se puede encontrar en el medio ambiente, por lo que presentan una serie de envolturas protectoras. En el huevo maduro, la envoltura más externa se le denomina vitelo o cápsula externa; la cual se forma a partir de la envoltura externa, de la cual solo se observan remanentes o desaparece por completo en el huevo maduro. La cápsula externa rodea una estructura llamada embrióforo. Este consiste en una serie de tabiques proteicos (bloques embriofóricos), unidos mediante una proteína cementante. El embrióforo se forma en el interior de la envoltura interna, la cual desaparece en el huevo maduro. La capa más interna (membrana oncosferal), envuelve directamente al embrión hexacanto (el cual cuenta con tres pares de ganchos) maduro, llamado también oncosfera. Cuando el huevo es ingerido por el hombre o su huésped intermediario (el cerdo), el vitelo o cápsula es removido mecánicamente, estimulando la actividad de los ganchos de la oncosfera. Posteriormente, las enzimas proteolíticas del huésped actúan directamente sobre el embrióforo, provocando la liberación de los bloques embriofóricos. La oncosfera liberada penetra la pared intestinal, alcanza vasos sanguíneos o linfáticos, por cuya corriente es transportada a cualquier tejido (músculo, tejido intradérmico, sistema nervioso, ojos), en donde se desarrolla a cisticerco (Coil, W. H., 1991).



# TAENIA SOLIUM

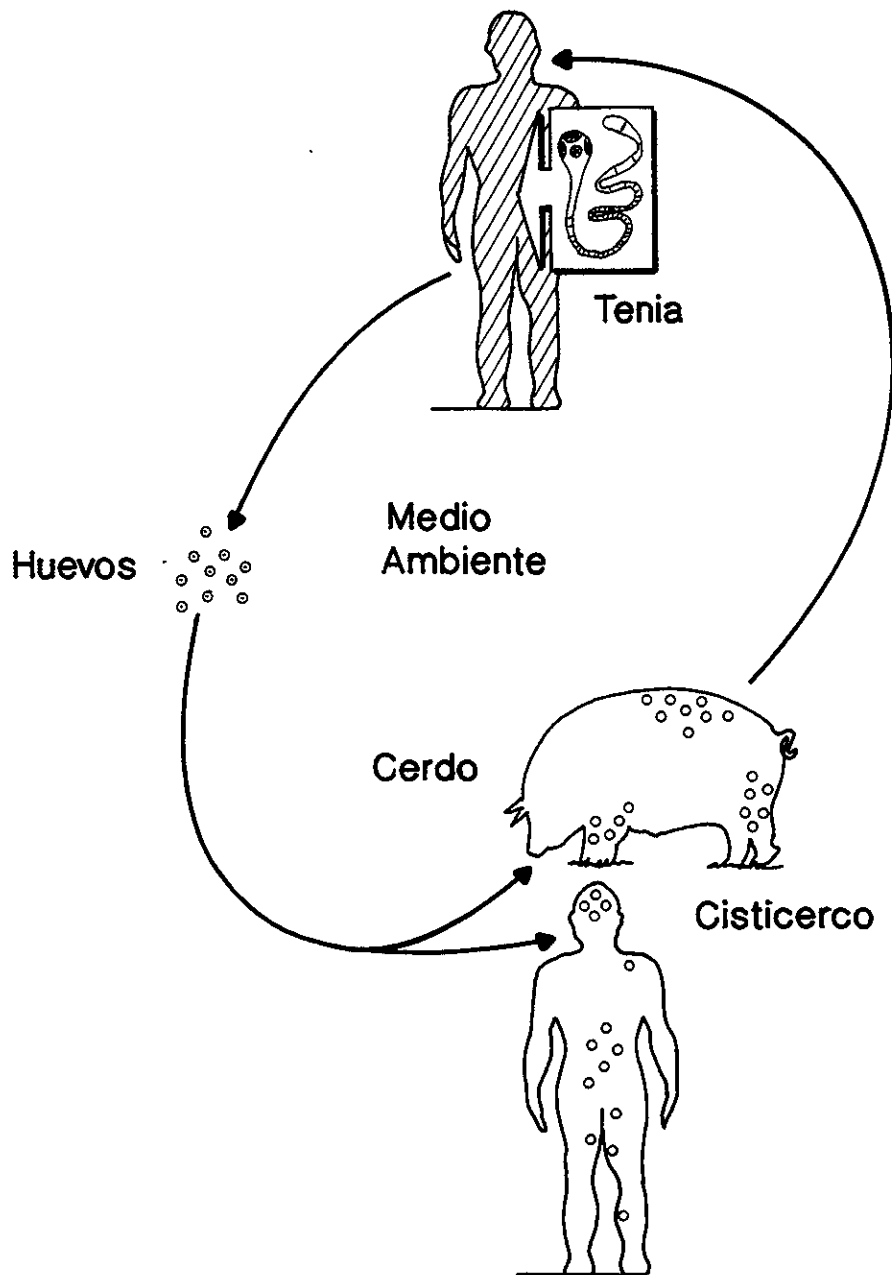


Figura 1. Ciclo de vida de *Taenia solium*

### 3.II.b Cisticerco

El estadio larvario (metacéstodo o cisticerco) se encuentra constituido por una vesícula o bolsa que contiene fluido vesicular, en la cual se encuentra el vestíbulo, que contiene un protoescolex invaginado (algunas veces indistinguibles del escolex adulto), al final del canal en espiral. La pared de la bolsa consta de tegumento, subtegumento, y parénquima. La superficie de la pared vesicular representa la superficie más expuesta al huésped, y a través de la cual se relaciona con él, metabólicamente e inmunológicamente. Cabe señalar que el cisticerco carece de sistema digestivo (tiene un sistema de nutrición por difusión), posee una inervación extensa (placas neuromusculares), y en el parénquima pueden observarse corpúsculos calcáreos, los cuales almacenan material orgánico como glicógeno y proteínas, y material inorgánico como calcio y fósforo. El sistema excretor se encuentra compuesto por ductos con túbulos, que terminan en células en flama (Coil, W. H., 1991).

### 3.II.c La Tenia

Cuando el hombre ingiere al cisticerco en carne de cerdo cruda o mal cocida, las enzimas y sales biliares del aparato digestivo inducen la activación del parásito, el cual evagina, y se ancla en la pared del intestino delgado para desarrollarse en un gusano adulto.

La *T. solium* es un helminto hermafrodita, de cuerpo aplanado y alargado. Se fija al intestino por el escólex, que presenta un ganglio nervioso, una doble corona de ganchos (rostelo), y cuatro ventosas. Posteriormente al cuello, continúa el estróbilo, que se conforma por cientos de segmentos (proglótidos), llegando a medir hasta 9 metros. Cada proglótido maduro es un órgano de reproducción independiente, en donde se lleva a cabo la fecundación y la producción de miles de huevos. Los proglótidos se producen inmediatamente detrás del cuello (área de estrobilación), por lo que los proglótidos más viejos y maduros se desprenden continuamente del extremo posterior de la tenia, siendo eliminados por el intestino.

La *T. solium* posee una cubierta externa llamada tegumento (antes llamada cutícula), que tiene funciones de absorción, digestión y protección. El tegumento envuelve a todo el gusano, actuando como interfase entre el gusano, y el contenido del intestino delgado. El tegumento está conformado por un epitelio, donde la parte más externa es anucleada, denominándosele citoplasma distal. Por debajo se encuentra la lámina basal, que contiene proteínas similares al colágeno y fibras estriadas. Posteriormente se encuentran capas

musculares subtegumentarias, y justo por debajo se encuentra el citoplasma proximal nucleado. El citoplasma proximal se conecta con el citoplasma distal por finas protuberancias celulares (extensiones protoplásmicas), que cruzan las finas capas musculares, y la lámina basal (Coil, W. H., 1991).

### 3.III La enfermedad

La alta frecuencia de infecciones humanas ocasionadas por el metacéstodo de *T. solium* resulta probablemente a consecuencia de la ingestión de huevos de *T. solium* a través de:

- a. Ingestión de los huevos en alimentos o agua contaminados (heteroinfección).
- b. Autocontaminación por personas que tienen un gusano adulto en el intestino.
- c. Posiblemente por autoinfección interna producida por un peristaltismo inverso, que

hace retroceder los huevos al duodeno o el estómago para que eclosionen, y tras la migración al interior de tejidos somáticos o viscerales, produzcan cisticercosis (Gemmell et al., 1985).

El estadio larvario de este gusano se ha encontrado prácticamente en todos los órganos y tejidos del cuerpo humano. Así, se le ha encontrado en tejidos intradérmicos e intramusculares, en ojo y también en el cerebro, donde se puede desarrollar en los ventrículos del tejido cerebral o en cápsulas quísticas superficiales (McCormick et al., 1982; Rabiela-Cervantes et al., 1982). Los síntomas que producen varían de acuerdo al número de parásitos y del tejido invadido. Por ejemplo, la presencia de la larva en crecimiento, provoca una secuencia típica de reacciones celulares locales, incluida infiltración de neutrófilos, eosinófilos, linfocitos, células plasmáticas, y a veces células gigantes. Las alteraciones histopatológicas son muy variables en tipo, severidad, y localización topográfica. Los signos y síntomas causados son rara vez diagnósticos, excepto cuando la cisticercosis es cutánea, intradérmica u ocular, en donde el parásito es fácilmente identificable. En zonas de alta prevalencia, en un adulto que presente epilepsia, se debe descartar la probabilidad de que sea causada por neurocisticercosis.

El tiempo entre la infección inicial y la aparición de los síntomas es también muy variable, y puede ser de algunos meses o hasta de años (Aluja et al., 1986).

### **3.IV Control sanitario**

El cerdo, huésped intermediario de este parásito, desempeña un papel fundamental en la transmisión de la teniasis-cisticercosis por *T. solium*. La porcicultura rústica constituye un factor de suma importancia en la transmisión de la cisticercosis, ya que la crianza de cerdos mantenidos en libertad facilita que los animales tengan una mayor oportunidad de consumir heces de humano contaminadas, mientras que en la porcicultura altamente tecnificada la posibilidad de infección es muy baja. Una forma de evitar la transmisión de teniasis es la inspección sanitaria para evitar el consumo de carne de cerdo parasitada. De acuerdo al código sanitario, las canales afectadas por cisticercosis deben ser decomisadas. Numerosos estudios demuestran la elevada frecuencia de decomiso de canales de cerdo en México, lo que representa pérdidas económicas importantes (Aluja et al., 1986).

Son varios los factores responsables del control ineficiente del consumo de cerdos criados rústicamente, como el consumo directo, la falta de rastros suficientes, la corrupción que frecuentemente se presenta en los mismos, la evasión de rastros premeditada, la poca efectividad de las formas de identificación de canales infectados, etc (Aluja, 1982). Dada la importancia de la cisticercosis en la salud humana y en la porcicultura en México, ha sido objeto de numerosos estudios relacionados con aspectos clínicos y patológicos, así como con su diagnóstico, tratamiento y prevención.

### **3.V Ciclo de vida de *Taenia crassiceps***

*T. crassiceps* (Zeder, 1800; Rudolphi, 1810) es un gusano platelminto de la clase cestoda, que se encuentra comúnmente en el intestino de los zorros rojos de Europa y Norteamérica. El estado larvario de *T. crassiceps* es el *Cysticercus longicollis*, sus huéspedes naturales son roedores pequeños de Europa y Norteamérica, los cuales adquieren la infección al ingerir los huevos presentes en las heces de cánidos infectados. Dentro del roedor, los huevos se transforman en cisticercos que pueden además reproducirse por gemación polar múltiple. La forma adulta de *T. crassiceps* se desarrolla cuando un roedor con cisticercos es ingerido por un predador cánido. La tenia alcanza la edad madura después de 6 semanas de haber ingresado los cisticercos en el intestino de zorros y perros (Freeman, 1962), completándose de esta forma el ciclo de vida de *T. crassiceps*. (Fig. 2).

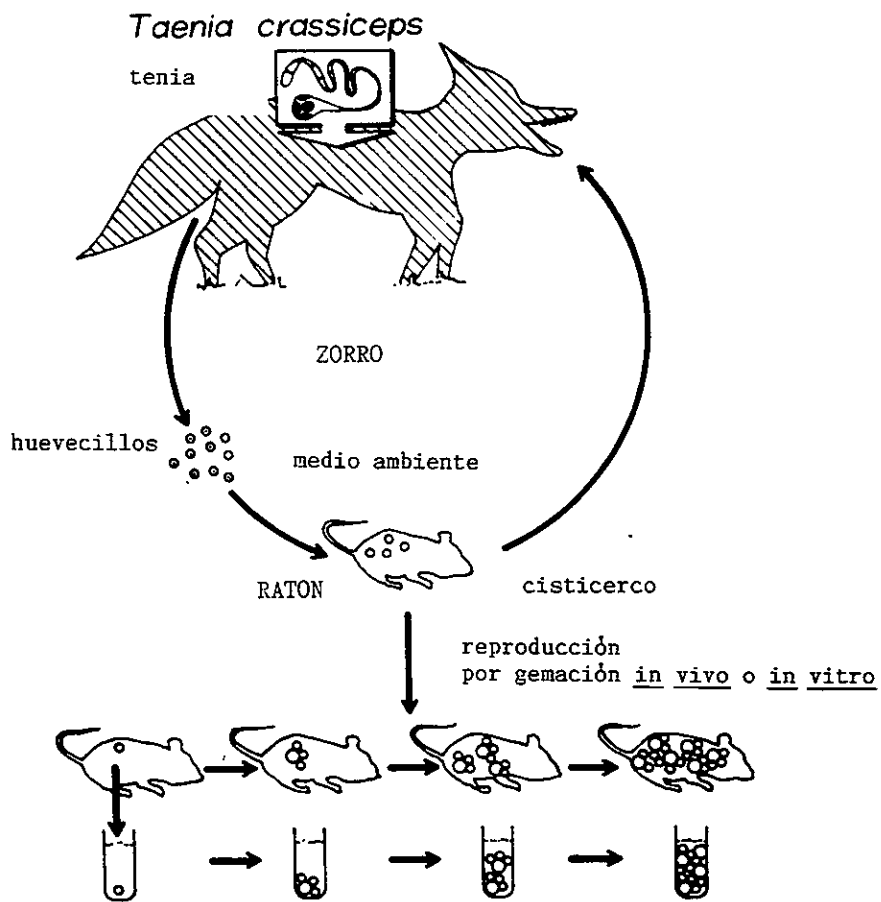


Figura 2. Ciclo de vida de *Taenia crassiceps*

#### 4. ANTECEDENTES

Para tratar de controlar esta enfermedad, se han contemplado diferentes alternativas de prevención, como son:

1. Campañas de educación y mejoramiento sanitario, pues la cisticercosis es frecuente en países en desarrollo, donde prevalecen condiciones inadecuadas de vivienda e higiene que favorecen la transmisión (Gemmell et al., 1982).
2. El desarrollo de vacunas contra la cisticercosis porcina (Molinari et al., 1983, 1993, 1997; Sciutto et al., 1990a, 1995; Nascimento et al., 1995). Considerando que el cerdo es el huésped intermediario en el ciclo de vida de éste parásito, resulta el candidato ideal para controlar esta enfermedad.
3. Modificación genética de huéspedes naturalmente susceptibles, mediante transferencia de genes de resistencia por transgénesis (Fragoso et al., 1996).

En el grupo de investigación de la Dra. Edda Sciutto (Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM), se están explorando las dos últimas estrategias, las cuales pueden eventualmente ser complementarias. Respecto al desarrollo de una vacuna eficiente para la protección del huésped, en los últimos años se ha encontrado que los antígenos del cisticerco de *T. crassiceps* son capaces de proteger en contra de la infección experimental murina (Sciutto et al., 1990a), así como a los cerdos desafiados con huevos de *T. solium* (Sciutto et al., 1995b).

En el avance del desarrollo de una vacuna, se comenzó con la evaluación de la capacidad de protección de antígenos totales del cisticerco de *T. crassiceps*, en contra de la cisticercosis murina y porcina. Se encontró que se podía inducir protección en contra de ambas parasitosis en la dosis apropiada (90% de protección en contra de la cisticercosis murina y 50% en contra de la cisticercosis porcina) (Valdez et al., 1994; Manoutcharian et al., 1995), aunque esta dependía de la dosis empleada (Sciutto et al., 1995b). En dosis altas se podía inducir facilitación a la parasitosis. Este resultado sugirió la presencia de proteínas que pudieran inducir facilitación y no-protección en el extracto total. Para poder identificar a los antígenos protectores presentes en este extracto antigénico total, éste fue separado electroforéticamente, obteniéndose 12 fracciones antigénicas (8 kDa-220 kDa), las cuales fueron utilizadas para evaluar su capacidad protectora en ratones. De estas 12 fracciones antigénicas, se seleccionaron 3 fracciones (56, 66 y 74 kDa), que indujeron protección en contra de la cisticercosis murina y porcina (Valdez et al., 1994; Manoutcharian et al., 1995). También se observó que estos antígenos fueran capaces de ser reconocidos

por sueros de cerdos infectados con cisticercos de *T. solium* (Valdez et al., 1994). Con base en estos resultados y con el fin de contar con cantidades adecuadas de estas fracciones para vacunación, se construyó una biblioteca de cADN en el vector Uni-ZapXR, partiendo del ARNm del cisticerco de *T. crassiceps*. Por procesos de inmunodetección con sueros hiperinmunes de conejo, que fueron inmunizados con las fracciones antigénicas protectoras previamente mencionadas, y con sueros tanto de ratones como de cerdos infectados, se identificaron y seleccionaron cinco clonas que codificaban para proteínas recombinantes de *T. crassiceps* (KETc1, KETc4, KETc7, KETc11, y KETc12), las cuales fueron evaluadas tanto contra la cisticercosis murina como porcina, resultando tres clonas (KETc4, KETc7 y KETc12) protectoras (Manoutcharian et al., 1995; 1996). La vacunación en contra de la cisticercosis porcina requiere proteger al cerdo durante su corta expectativa de vida (aproximadamente de 1 año), por lo que la respuesta inmune protectora inducida por vacunación solo tendría que proteger al cerdo durante este período de tiempo.

Para el desarrollo de una vacuna existen diferentes posibilidades:

- 1) Inmunización con el propio patógeno atenuado o muerto.
- 2) Inmunización con componentes aislados del patógeno, contra el que se pretende vacunar.
- 3) Inmunización con proteínas o péptidos producidos por métodos de ADN recombinantes o sintéticos.
- 4) Inmunización con ADN.

Al respecto de esta última alternativa, en 1989 Felgner y Wolff (Wolff et al., 1990), comprobaron accidentalmente que el ADN por si solo, podía entrar y expresarse en células *in vivo*, pues observaron la expresión de genes reporteros en músculos cuádriceps de ratones. Posteriormente observaron que se podía generar una respuesta inmune en contra de una proteína antigénica. Liu y colaboradores (Ulmer et al., 1993) fueron los primeros en demostrar la efectiva protección de la inmunización con ADN en un modelo animal. Estas observaciones provocaron una muy activa investigación dirigida a conocer las posibilidades de esta nueva forma de inmunización (Robinson, 1995; Fynan et al., 1993a, 1993b; Wang et al., 1993) (Apéndice I).

La vacunación con ADN consiste en un plásmido con un promotor fuerte, el gen de interés y una secuencia de terminación de la transcripción poliadenilacional. El plásmido se transforma en bacterias, se amplifica, se purifica, se disuelve en solución salina, y se inyecta directamente en el huésped. El ADN plasmídico es captado por las células del huésped y la proteína de interés es sintetizada.

Este procedimiento presenta *a priori* algunas ventajas, entre las que figuran:

- El ADN es capturado y expresado por las células del huésped *in vivo*.
- Presenta gran estabilidad con respecto a proteínas u otros polímeros biológicos.
- El ADN plasmídico puede expresarse por períodos de tiempos prolongados en las células del huésped, y con ello inducir una respuesta inmune protectora por tiempo prolongado.
- El ADN plasmídico puede ser producido en gran escala con una gran pureza.

Por otra parte, se necesita saber el riesgo o consecuencias de la persistencia del ADN plasmídico durante un largo período de tiempo, y su expresión en el huésped. Estas consecuencias podrían incluir la posibilidad de inducir tolerancia, autoinmunidad o la posibilidad de inducir anticuerpos anti-ADN (Waine and McManus, 1995). Otra consideración es la posibilidad de la integración del ADN plasmídico al huésped, resultando en la inserción en un oncogen, una inserción que active un proto-oncogen del huésped o una inserción que desactive a un gen supresor del huésped (Waine and McManus, 1995). Aunque esto se ha estudiado extensivamente en los modelos animales de experimentación utilizados, sin encontrar evidencias en contra de este tipo de vacunación (Waine and McManus, 1995), habría que explorar extensamente todas estas posibilidades, si se quiere realizar una vacuna con ADN en humanos.

En este trabajo de tesis se evalúan las posibilidades de la inmunización con ADN en la cisticercosis experimental murina (Rosas et al., 1998; Cruz-Revilla et al., 1999)



## 5. OBJETIVOS

### **Generales**

◆ Evaluar la capacidad de inducir protección contra la cisticercosis experimental murina, mediante la inmunización con ADN, y estudiar la respuesta inmune asociada.

### **Particulares**

◆ Reclonar el gen de la clona recombinante KETc7 en el vector de expresión pcDNA3, y evaluar su capacidad de expresión en cultivos de células eucariontes.

◆ Identificar en el modelo murino la capacidad protectora de la inmunización con ADN, utilizando diferentes protocolos y vías de inmunización.

◆ Evaluar la respuesta inmune celular y humoral asociada a la inmunización.

◆ Determinar las posibilidades de integración del plásmido vacunal, al genoma del miocito del huésped.

◆ Identificar la forma nativa de la proteína (KETc7) en huevos, cisticercos y tejido adulto de *Taenia solium*, y en cisticercos de *Taenia crassiceps*.

## 6. MATERIALES Y METODOS

Se anexan dos artículos, en los que se describen las metodologías realizadas en este trabajo de tesis (APENDICE IV).

Brevemente, se realizó lo siguiente:

Los cisticercos de *T. crassiceps* de la cepa ORF, utilizados para la infección, se obtuvieron de la cavidad peritoneal de ratones hembras de la cepa BALB/cAnN, con una parasitosis de 1 a 3 meses, después de haber sido inoculados con 10 cisticercos (2-3 mm de diámetro), por ratón. Los cisticercos han sido mantenidos por pases intraperitoneales sucesivos, durante 10 años en el Bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

Para las inmunizaciones génicas, se utilizaron ratones machos y hembras de la cepa BALB/cAnN, de 4 a 6 semanas de edad. A los 30 días de la tercera inmunización, los ratones se parasitaron intraperitonealmente con 10 cisticercos (2 mm de diámetro) en PBS 1x, para ser sacrificados por dislocación cervical 30 días después, realizando el conteo de la carga parasitaria de la cavidad peritoneal de cada uno de los ratones.

Para la inmunización génica se realizó una primera construcción con la clonación del ADNc de la secuencia KETc7 previamente reportada (Manoutcharian et al., 1996), en el vector de clonación pcDNA3 a la que se le denominó pTc-7. El plásmido pTc-sp7 se construyó agregando la secuencia para el péptido señal del receptor de superficie celular del betaglicano (receptor tipo III del TGF- $\beta$ ) a la secuencia KETc7. Los plásmidos fueron purificados mediante el Kit de purificación de Promega o mediante columnas de purificación de Qiagen, y llevado a una concentración final de 1 $\mu$ g/ $\mu$ l en SS. Se verificó la expresión de las construcciones realizadas, transfectando *in vitro* células C33, mediante precipitación por calcio, para la realización posterior de la inmunofluorescencia indirecta.

Las inmunizaciones génicas se realizaron utilizando agujas de insulina, con grupos de 10 ratones, los cuales fueron inmunizados en cada músculo cuádriceps del ratón, con pcDNA3 vacío, pTc-7 o pTc-sp7, en diferentes dosis (60 o 100  $\mu$ g de ADN en SS), tres veces, cada dos semanas. Para aumentar la captación del ADN por las células del huésped, otros grupos de ratones fueron inyectados 24 horas antes de la inmunización, en el mismo músculo con BPH

Por otra parte se inmunizaron tres veces, cada dos semanas, grupos de 10 ratones de forma intradérmica (6 inyecciones ventrales), con 200  $\mu$ g de pcDNA3 vacío o pTc-sp7.

Los grupos controles de todos los experimentos (o ratones no inmunizados) se realizaron inyectando intramuscularmente 100  $\mu$ l de SS en cada cuádriceps, o en forma intradérmica (6 inyecciones ventrales) con 200  $\mu$ l de SS, tres veces, cada dos semanas.

Se obtuvo el suero individual de los ratones antes de comenzar las inmunizaciones, y después de 30 días de la última inmunización con ADN (antes de realizar la infección de los ratones). El nivel de anticuerpos fue medido por ELISA .

Para comprobar si el antígeno nativo de *T. crassiceps* y *T. solium* era reconocido por los sueros de los ratones inmunizados, se realizó una inmunoelectrotransferencia, utilizando antígenos de *T. crassiceps* y *T. solium*, y el suero de los ratones inmunizados y no inmunizados, y como control positivo suero de ratones infectados con *T. crassiceps*.

Para la localización del antígeno nativo en ambos parásitos, se utilizaron los anticuerpos que presentaban los títulos mas altos, para la realización de inmunofluorescencia de cortes de cisticercos de *T. crassiceps* y *T. solium*, y de huevos y tegumento del adulto de *T. solium*.

Para comprobar que no se presentaba incorporación de los plásmidos al genoma de las células musculares del huésped, se aisló el ADN cromosomal y extracromosomal por el método de Hirt, para la posterior detección de los plásmidos mediante PCR.

Para observar los niveles de proliferación celular, se realizó un ensayo de proliferación celular de células obtenidas del bazo de ratones inmunizados con pcDNA3 o pTc-sp7, ya sea inmunizados por vía intramuscular o intradérmica, utilizando como inmunógenos antígenos totales de *T. crassiceps*, un péptido sintético de la secuencia KETc7 (GK-1) y como mitógeno con A.

Para observar la composición de las células proliferadas, se realizó una citometría de flujo, midiendo los niveles de los marcadores celulares CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup>, después de 72 hr de cultivo *in vitro* con el mitógeno, los antígenos totales o el péptido sintético.

Para determinar CD3<sup>+</sup> y la expresión de interleucinas intracelulares, se realizó un FACS de las células de bazo en medio solo, con los antígenos totales o con GK-1, después de marcar las citocinas intracelulares con los anticuerpos monoclonales adecuados y utilizando el Kit CytoStain TM de Pharmingen

## 7. RESULTADOS

Se anexan dos artículos, en los que se describen los resultados obtenidos en este trabajo de tesis (APENDICE IV).

Brevemente, se presenta un resumen de los resultados: El cADN de la secuencia del antígeno KETc7 del cisticerco de *T. crassiceps* fue insertado en el plásmido pcDNA3 con y sin la secuencia del péptido señal del receptor del betaglicano, a las que se denominaron pTc-7 o pTc-sp7. Se transfectaron *in vitro* los plásmidos pcDNA3 vacío, pTc-7 o pTc-sp7 a células eucariontes (línea celular C33), por el método de precipitación por calcio. La expresión de la proteína se confirmó por inmunofluorescencia indirecta, utilizando suero de ratón parasitado por *T. crassiceps* como primer anticuerpo. Se observó una clara diferencia entre las células transfectadas con pTc-7 o pTc-sp7. Las células transfectadas con pTc-sp7 mostraron una expresión superior a las células transfectadas con pTc-7. Las células transfectadas con la construcción pTc-7, fueron poco fluorescentes con pequeños gránulos distribuidos al azar en el citoplasma, mientras que la secuencia del péptido señal (pTc-sp7), no solo modificó el patrón de distribución del péptido, sino que también incrementó de manera efectiva su nivel de expresión.

Se evaluaron diferentes protocolos, con el propósito de encontrar las mejores condiciones de inmunización. Se determinaron los niveles de anticuerpos inducidos por inmunización con ADN, mediante ELISA. El ADN se purificó mediante el Kit de Promega, según las instrucciones del fabricante. Los sueros de los ratones control inoculados intramuscularmente con 100  $\mu$ l de SS o diferentes concentraciones de pcDNA3 (120 o 200  $\mu$ g por ratón), ya sea con la previa o no inyección de BPH (0.5% en NaCl isotónica), no indujeron anticuerpos en contra de los antígenos del cisticerco de *T. crassiceps*. Los ratones inmunizados con pTc-7 o pTc-sp7 sí indujeron una respuesta de anticuerpos. En los ratones inmunizados con pTc-7, en las dosis de 120  $\mu$ g o 200  $\mu$ g de ADN, solo se observó una pobre respuesta de anticuerpos en los ratones pre-tratados 24 horas antes con BPH. Con la inmunización de pTc-sp7 en las dosis de 120 o 200  $\mu$ g, se observó un incremento en los ratones seroconvertidos (68 y 86% respectivamente), sin la necesidad de la inyección previa con BPH. El nivel de anticuerpos generado fue muy variable para cada ratón, y no se encontró correlación entre la respuesta de anticuerpos y la protección individual observada.

Los anticuerpos inducidos por la inmunización con pTc-sp7 reaccionaron

específicamente con la proteína nativa de 56 kDa de *T. crassiceps*, reportada previamente (Manoutcharian et al., 1996), que corresponde al peso molecular esperado para la proteína KETc7, y un antígeno de peso molecular similar en *T. solium*.

Los anticuerpos específicos inducidos mediante la inmunización con pTc-sp7 fueron utilizados para localizar la proteína nativa en el tegumento de los cisticercos de *T. crassiceps*, al igual que en la oncosfera, cisticerco y tejido adulto de *T. solium*, mediante inmunofluorescencia indirecta. Considerando que estos anticuerpos detectan específicamente el antígeno esperado, fueron utilizados para localizar el antígeno nativo en ambos parásitos. Encontramos que los anticuerpos reconocieron un antígeno presente de manera muy extensa en el cisticerco de *T. crassiceps*, además de una fuerte presencia del antígeno en la oncosfera, y en el cisticerco y el tegumento de *T. solium*.

Para confirmar la seguridad de este tipo de inmunización se corroboró que la construcción se mantenía episomal en las células musculares. Se examinó la localización del plásmido en las células musculares, 2 semanas después de la última inmunización. Para ello se obtuvo el ADN genómico y episomal de los músculos de los ratones inmunizados, para detectar la secuencia plasmídica por procedimientos de PCR, el cual se encontró en forma episomal sin ser detectado en la fracción genómica.

El efecto de protección inducido por inmunización intramuscular con ADN purificado mediante el Kit de Promega (Rosas et al., 1998), se realizó contando el número de parásitos 30 días después del desafío. En los ratones hembras inmunizadas con pTc-sp7 se reduce el número de cisticercos de forma significativa (58.63%) comparado al grupo control (33.37%). En los ratones machos inmunizados con pTc-sp7 se encontró un 100% de protección, frente al grupo control (34.4%).

Siguiendo las mejores condiciones de inmunización previamente encontradas, se inmunizaron los ratones intramuscular o intradérmicamente (200 µg por ratón, tres veces cada 2 semanas), con ADN purificado mediante columnas de Qiagen (y soluciones preparadas en el laboratorio de acuerdo a las instrucciones del fabricante) (Cruz-Revilla et al., 1999). Se observó que con ambos esquemas se inducen niveles similares de protección en contra de la infección con *T. crassiceps* (63% y 79%, respectivamente). En ambas vías de inmunización (intramuscular o intradérmico), inmunizando con pcDNA3 se disminuyó significativamente la carga parasitaria esperada (34 y 36% respectivamente).

Se observó la inducción de anticuerpos en ratones inmunizados intradérmicamente. Los anticuerpos que reconocen a los antígenos totales de *T. crassiceps* por ELISA fueron detectados en 5 de 9 ratones inmunizados con pTc-sp7 (62%), mientras que no se

detectaron anticuerpos en los ratones control o inmunizados con pcDNA3. Inesperadamente, no se observó seroconversión en los ratones inmunizados intramuscularmente con pTc-sp7. Estos resultados no son consistentes con lo observado previamente (Rosas et al., 1998), y la única diferencia entre ambos experimentos fue que los plásmidos fueron purificados usando columnas de Qiagen y reactivos preparados en el laboratorio (Cruz-Revilla et al., 1999), en lugar de utilizar el Kit de Promega (Rosas et al., 1998).

Se obtuvieron los niveles de proliferación de células de bazo de ratones control, inmunizados con pcDNA3 vacío o con pTc-sp7, ya sea por vía intramuscular o intradérmica. Las células de bazo obtenidas fueron estimuladas *in vitro*, y se observó un nivel significativo de proliferación inducida por los antígenos totales de *T. crassiceps* o GK-1, en ratones inmunizados tanto intramuscular como intradérmicamente con pTc-sp7, mientras que no se observó proliferación en los ratones inmunizados con pcDNA3 vacío o en los ratones control.

Los estudios de citometría de la población celular proliferada provenientes de ratones inmunizados intramuscular o intradérmicamente, demuestran que aunque existe un incremento en las células T CD4<sup>+</sup>, el incremento en linfocitos T CD8<sup>+</sup> fue mayor, ya sea utilizando los antígenos totales de *T. crassiceps* o el péptido GK-1 como mitógeno. Aunque en menor magnitud, se observó un incremento en las poblaciones CD4<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup> y CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> en los ratones inmunizados intramuscularmente con pcDNA3 con o sin estimulación *in vitro*.

La capacidad de las células de producir IL-4, IFN- $\gamma$ , IL-2 e IL-10 fue determinada por FACS después de marcar las citocinas intracelulares. Se observó que las células estimuladas con antígenos totales de *T. crassiceps* o GK-1 de ratones inmunizados presentaron una frecuencia de células que producían IFN- $\gamma$  e IL-2 significativamente mayor que los ratones no inmunizados. Aunque en menor magnitud, las células de los ratones inmunizados con pTc-sp7 también produjeron IL-4 e IL-10.

## 8. DISCUSIÓN

En esta tesis demostramos la inducción de una respuesta inmune protectora en ratones mediante inmunización con ADN, utilizando el vector de expresión para células eucariontes (pcDNA3), con el cADN que codifica para el antígeno recombinante KETc7 (pTc-7) en ratones (Fig. 1, artículo 1). Este antígeno había sido previamente reportado como protector contra la cisticercosis murina causada por *T. crassiceps*, y ha sido considerado como un posible candidato para vacuna en contra de la cisticercosis por *T. solium* (Manoutcharian et al., 1996). Con la administración de la construcción pTc-7 intramuscular, solo se indujo la seroconversión de ratones cuando fue administrado con bupivacaina. La bupivacaina ha sido extensamente utilizada con el propósito de aumentar la eficiencia de transfección de las células musculares. Ha sido reportado que la bupivacaina ayuda a la captación del ADN por parte de las células (Thomason and Booth, 1990; Danko et al., 1994) (Apéndice II, Tablas 5 y 6), especialmente al inyectar el ADN en el músculo en regeneración (Davis et al., 1995). Además, produce una rápida destrucción de las fibras musculares estriadas seguida de fagocitosis (Benoit and Belt, 1970). Mientras tanto, claros niveles de anticuerpos se obtuvieron cuando se le agregó a la construcción (pTc-7) la secuencia del péptido señal del betaglicano (López-Casillas et al., 1991) (Fig. 3, artículo 1), a la cual se le denominó pTc-sp7. El incremento en el nivel de anticuerpos, así como el alto número de ratones seroconvertidos inmunizando con pTc-sp7, podría deberse al incremento en la expresión de la proteína, así como su localización en la superficie de la célula, resultando más accesible al sistema inmune. En este sentido, es interesante señalar que las células transfectadas *in vitro* con pTc-sp7, mostraron una expresión superior a aquellas células transfectadas con pTc-7 (Fig. 2, artículo 1). Las células transfectadas con la construcción pTc-7, fueron poco fluorescentes con pequeños gránulos distribuidos al azar en el citoplasma (Fig. 2b, artículo 1). La secuencia del péptido señal (pTc-sp7), no solo modificó el patrón de distribución del péptido, sino que también incrementó de manera efectiva su nivel de expresión (Fig. 2c, artículo 1). Resulta de interés que la adición del péptido señal a la construcción (pTc-sp7) incrementó el número de ratones seroconvertidos, y no requirió de la previa inmunización con bupivacaina (Fig. 3, artículo 1). Este resultado es de interés considerando lo traumático y poco realista para usos prácticos de la aplicación de la bupivacaina. Cabe agregar que la inmunización intramuscular se realizó directamente a través de la piel hasta el músculo cuádriceps, y Donelly y colaboradores (1997), han observado que la inyección intramuscular realizada en el músculo cuádriceps expuesto

quirúrgicamente (como se ha realizado ampliamente), produce una respuesta inmune protectora menor que la realizada por medio de la inyección intramuscular a través de la piel intacta.

Al respecto de la respuesta humoral, otro aspecto que resulta de interés es la heterogeneidad de la respuesta inducida. En la Figura 3 (artículo 1), se ilustra el nivel de anticuerpos detectado en cada ratón inoculado. Como puede observarse, los niveles detectados resultan bajos y muy variables entre un ratón y otro. Diferencias individuales importantes se han reportado previamente con esta forma de inmunización. Así, Rothel y colaboradores (1997), reportan que solo una de 15 ovejas inyectadas con pcDNA3-45W produce anticuerpos en suero, en niveles que son considerados como protectores. En este sentido, mientras que en la cisticercosis causada por *Taenia ovis*, los niveles de anticuerpos en suero correlacionan claramente con la protección, en la cisticercosis por *T. crassiceps*, la participación de los anticuerpos es aún cuestionable (Sciutto et al., 1995b). En este trabajo no se encontró correlación entre los niveles de anticuerpos inducidos por cada ratón y la protección individual observada (datos no mostrados).

Al respecto de la protección inducida por inmunización con pTc-sp7, encontramos niveles significativos de protección (58.63% en hembras y 100% en machos) (Rosas et al., 1998), similares a los inducidos con la correspondiente proteína recombinante (30.5% en hembras y 73% en machos) (Manoutcharian et al., 1996). Curiosamente, la inmunización con pcDNA3 reduce de un 33.37% en hembras y un 34.4% en machos el número de parásitos esperados (Tabla 1, artículo 1). Efectos similares se han observado por Lin y colaboradores (1998), probablemente debido al efecto adyuvante no específico del ADN plasmídico (Roman et al., 1997). En este sentido, se ha observado que incluidas en el promotor del citomegalovirus así como en el gen de resistencia a ampicilina, existen pequeñas secuencias de ADN inmunoestimuladoras, que contienen dinucleótidos CpG en un contexto de bases particular, flanqueadas por dos purinas en el extremo 5' y dos pirimidinas en el extremo 3', que son capaces de inducir células T y "Natural Killers", a secretar citocinas que favorecen una respuesta inmune de tipo Th1 policlonal y también la inducción de células B (Klinman et al., 1996, 1997a; Sato et al., 1996; Roman et al., 1997; Kline et al., 1998; Krieg et al., 1995, 1998) (Apéndice 1).

Los resultados reportados en este trabajo indican que la inmunización con ADN es al menos tan eficiente como los procedimientos convencionales de vacunación, usando la proteína recombinante KETc7 para inmunizar (Manoutcharian et al., 1996).

La especificidad de los anticuerpos inducida con pTc-sp7 se evaluó por



inmunoelectrotransferencia. Como se muestra en la Figura 4 (artículo 1), los anticuerpos reconocen el antígeno nativo de *T. crassiceps* de 56-kDa, como se ha reportado previamente (Manoutcharian et al., 1996), y un antígeno de peso molecular similar en *T. solium*. Considerando que estos anticuerpos detectan específicamente el antígeno esperado, fueron utilizados para localizar el antígeno nativo en ambos parásitos. Encontramos que los anticuerpos reconocieron un antígeno presente de manera muy extensa en el cisticerco de *T. crassiceps*, además de una fuerte presencia del antígeno en la oncosfera de *T. solium*. Esta observación es importante considerando la posible susceptibilidad de esta fase del parásito al ataque inmune (Rajasekariah et al., 1982). Aunque se ha reportado que varios antígenos son específicos a los diferentes estadios (Harrison and Parkhouse, 1986), no parece ser el caso del antígeno KETc7, pues encontramos que esta proteína se encuentra muy conservada en los diferentes estadios de *T. solium*, desde el tegumento del cisticerco y la tenia, hasta en el estado oncosferral. Su presencia en el cisticerco implica su accesibilidad al sistema inmune, sobre todo en los estadios tempranos del metacéstodo.

La protección inducida por la inmunización con ADN, utilizando la construcción pTc-sp7 y la presencia del plásmido en el nucleoplasma y no integrado en el genoma de la célula huésped (Fig. 6, artículo 1), nos alentó en continuar estudiando la respuesta inmune celular relacionada a esta protección.

Utilizando las mejores condiciones de inmunización encontradas para inducir protección (inmunización intramuscular, con 100 µg de ADN por cuadriceps, tres inoculaciones, con intervalos de 15 días), confirmamos la capacidad protectora de la construcción pTc-sp7 en ratones hembras (63%), mientras que en los ratones inmunizados con pcDNA3 se observó un 34% (Tabla 1, artículo 2). Estos plásmidos fueron purificados mediante columnas de purificación de Qiagen (Qiagen Inc. Santa Clarita, California), y soluciones preparadas en nuestro laboratorio de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Cruz-Revilla et al., 1999).

Simultáneamente, y con el propósito de evaluar la eficiencia de otras vías de inmunización, se inmunizaron ratones hembras por vía intradérmica, utilizando las mejores condiciones identificadas para la inmunización intramuscular. Encontramos que tres inmunizaciones de pTc-sp7 de forma intradérmica, indujeron un 79% de protección, mientras que en los ratones inmunizados tres veces con pcDNA3, un 36%. Como se puede observar en la Tabla I (artículo 2), se observaron niveles similares de protección inmunizando tanto intramuscular como intradérmicamente, bajo las mismas condiciones de

inmunización. Así se confirmó que pcDNA3 vacío induce protección tanto por vía intramuscular como por vía intradérmica en ratones hembras.

La mayor eficiencia de la vía intradérmica, inmunizando directamente con jeringa hipodérmica, ha sido previamente reportada por Raz y colaboradores (1994). Por otro lado, el método de administración del ADN, usando una aguja convencional e inyectando intradérmicamente, ha sido investigada por Donnelly y colaboradores (1994), Hoffman y colaboradores (1995) y Ertl y colaboradores (1995). En el caso de la inmunización con el vector que expresa la nucleoproteína NP para el virus de la influenza, aunque se induce una respuesta de CTLs, la protección estudiada comparando ratones inmunizados intramuscularmente o intradérmicamente con ADN-NP, sugiere que el método intradérmico es menos efectivo (Donnelly et al., 1994). Estas divergencias en los resultados reportados por los distintos autores, apoyan el hecho de que esto puede reflejar las diferentes capacidades de los plásmidos para expresar el antígeno.

Un aspecto de interés a resaltar, son las diferencias encontradas utilizando ADN purificado por diferentes procedimientos, en ratones inmunizados intramuscularmente. Mientras que el ADN purificado con las columnas y el Kit de Promega indujo una seroconversión del 85% (Rosas et al., 1998), en los experimentos utilizando ADN purificado con las columnas de Qiagen, en las mismas condiciones de inmunización, no detectamos la producción de anticuerpos (Cruz-Revilla et al., 1999). Sin embargo, este último ADN indujo el 62% de seroconversión en los ratones inmunizados intradérmicamente (Fig. 1, artículo 2). Estos resultados podrían deberse a diferencias en el estado conformacional y/o cantidades relativas de ADN superenrollado, así como al grado de purificación (cantidad de endotoxinas presentes). Sin embargo, ya sea en presencia (Rosas et al., 1998) o en ausencia de anticuerpos (Cruz-Revilla et al., 1999), encontramos que no se ve afectado el nivel de protección en ratones hembras (58.6% y 63% respectivamente), por lo que la respuesta de anticuerpos no parece ser trascendental para el desarrollo y reproducción del parásito, como se ha sugerido en trabajos previos (Sciutto et al., 1990b; Bojalil et al., 1993). Las variaciones en la efectividad en la inducción de anticuerpos usando ADN obtenido por diversos procedimientos, podría explicar resultados conflictivos que han sido reportados a este respecto en la inmunización con ADN (Yang et al., 1995; Waine et al., 1997). Adicionalmente, estos resultados indican una mayor eficiencia en la producción de anticuerpos a través de la vacunación intradérmica, aspecto que ha sido reportado por otros autores (Boyle et al., 1997; Gramzinski et al., 1998).

Todos estos resultados apuntan a la participación importante de mecanismos

dependientes de células para conferir inmunidad hacia la cisticercosis por *T. crassiceps*, por lo que comenzamos a explorar la respuesta inmune celular inducida tanto por inmunización intramuscular como intradérmica. En la Figura 2 (artículo 2) se observó un alto nivel de proliferación específica inducida por los antígenos totales y por GK-1 en las células de bazo provenientes de ratones inmunizados con pTc-sp7. Se observaron niveles similares de proliferación en células de bazo de ratones inmunizados por vía intramuscular o intradérmica.

En la inmunización intramuscular, aunque el porcentaje de células  $CD4^+CD8^-$  se incrementó en las células T proliferadas, el mayor incremento se observó en el porcentaje de células  $CD4^-CD8^+$  (Tabla II, artículo 2). El incremento del porcentaje de células  $CD3^+$  que producen citocinas inflamatorias (IFN- $\gamma$  e IL-2) (Fig. 3 artículo 2) puede resultar en la activación de macrófagos cercanos a los parásitos, la cual puede estar involucrada en la resistencia inducida. Tal vez el mayor número de células  $CD4^-CD8^+$  pueda ser consecuencia de las características propias de KETc7 mas que la forma de inmunización. Esto es probable considerando que la inmunización con el epítipo GK-1 de este antígeno induce una respuesta inmune muy similar (Toledo et al., 1999). La respuesta de células T citotóxicas se ha encontrado asociada a la protección inducida por vacunación contra otros parásitos (Kayes et al., 1998). La resistencia o susceptibilidad a diferentes enfermedades han sido asociadas a una respuesta inmune predominante ya sea de tipo Th1 o Th2. En el caso de la resistencia a la cisticercosis murina causada por *T. crassiceps*, Terrazas y colaboradores (1998) han reportado que en fases tempranas de la parasitosis, se observa una respuesta inmune de tipo Th1, asociada a una baja reproducción del parásito. Conforme avanza la infección, se observa una respuesta de tipo Th2 mas fuerte y permanente, asociada con el incremento en la reproducción parasitaria. Así, la respuesta de tipo Th1 se encuentra involucrada en la resistencia a la parasitosis, mientras que la respuesta de tipo Th2 se encuentra asociada a una mayor carga parasitaria (Terrazas et al., 1999). Una conclusión conciliatoria, aunque no trivial, con respecto a los mecanismos inmunes involucrados en la cisticercosis por *T. crassiceps*, podría implicar que los anticuerpos y los eventos mediados por células son ambos efectivos y suficientes contra el parásito, aunque no sean igualmente detectables en todos los protocolos de experimentación, en diferentes momentos de infección.

Por último, un aspecto importante a considerar es la factibilidad de la utilización de las vacunas génicas en términos de salud pública. En este sentido, los procedimientos que implican formas sencillas de inmunización, requieren de la obtención de ADN de alta calidad

y cantidad, lo cual puede implicar altos costos. Mientras tanto, otros procedimientos de inmunización que reducen de forma considerable la cantidad de ADN empleado, como la administración por gene gun (Fynan et al., 1993b) (Apéndice 1), no están aún diseñados para una administración en forma sencilla y se ha reportado que podrían modificar la calidad de la respuesta inmune inducida (Felquate et al., 1997).

Teniendo en cuenta estas consideraciones, aunque los resultados son muy prometedores, falta aún explorar procedimientos de administración más simples y menos costosos, para que esta forma de inmunización resulte de interés para su aplicación en cerdos. Este trabajo señala además el interés del uso del antígeno KETc7 en el desarrollo de una vacuna multivalente, establece las condiciones de inmunización con ADN y describe la respuesta inmune asociada a la resistencia obtenida, que ofrecen una alternativa para evaluar posibles candidatos para el desarrollo de vacunas.

## 9. CONCLUSIONES

- La inmunización génica con pTc-sp7 es capaz de inducir una respuesta inmune protectora en contra de la cisticercosis experimental murina, con una baja respuesta humoral y una importante respuesta celular, principalmente de células T CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, y niveles superiores de IFN- $\gamma$  e IL-2 que de IL-4 o IL-10.

### CONCLUSIONES PARTICULARES

1. Las construcciones pTc-sp7 y pTc-7 se expresan en células eucariontes *in vitro*.
2. Inmunizando intramuscularmente, el mayor índice de seroconversión (85%) y de protección (58.63% en hembras y 100% en machos) se obtuvo con 200  $\mu$ g de pTc-sp7 por ratón, mientras que la inmunización con pcDNA3 disminuyó el número de parásitos esperado en un 33% en hembras, y 34% en machos (purificación del ADN con el Kit de Promega).
3. Los anticuerpos inducidos por la inmunización con pTc-sp7 reconocieron el antígeno nativo KETc7 de *T. crassiceps* de 56-kDa esperado, así como un antígeno de peso molecular similar en *T. solium*.
4. Los anticuerpos reconocieron un antígeno presente de manera muy extensa en el cisticerco de *T. crassiceps*. La proteína nativa se encontró conservada en los diferentes estadios de *T. solium*, desde el tegumento del cisticerco y la tenia, hasta en el estado oncosferral.
5. El plásmido se localizó en el nucleoplasma, y no se encontró integrado en el genoma de la célula huésped, al menos hasta 30 días después de la última inmunización.
6. Se confirmó la capacidad protectora de la construcción pTc-sp7 (purificación del ADN por Qiagen), inmunizando intramuscularmente con 200  $\mu$ g de ADN por ratón. Se encontraron niveles de protección del 63% en ratones hembras inmunizadas con pTc-sp7, mientras que con la inmunización del plásmido vacío (pcDNA3) se obtuvo un 34% de protección.
7. Inmunizando por vía intradérmica, con las mejores condiciones identificadas para la inmunización intramuscular, se obtuvo una seroconversión del 62%, y una protección del 79% inmunizando con pTc-sp7, frente a los ratones inmunizados con el plásmido pcDNA3 vacío (36% de protección).
8. Los esplenocitos de los ratones inmunizados intramuscular o intradérmicamente con

ADN inducen una proliferación específica de células T cuando se estimulan con antígenos totales de *T. crassiceps* o con un epítoto sintético del propio antígeno KETc7 (GK-1). Los estudios de citometría de la población celular proliferada, demuestran que esta población está enriquecida en linfocitos T CD8<sup>+</sup> CD4<sup>-</sup>. Un incremento claro en el porcentaje de células CD3<sup>+</sup> que producen IFN- $\gamma$  e IL-2 fue detectado midiendo la producción de citocinas intracelulares, indicando la capacidad de pTc-sp7 de inducir una respuesta celular efectiva.

## 10. REFERENCIAS

1. Aluja A. (1982). Frequency of porcine cysticercosis in Mexico. In: Cysticercosis: Present State of knowledge and perspectives. Flisser, A., Willms, K., Lacleste, J. P., Larralde, C., Ridaura, C. and F. Beltrán, (eds). Academic Press, New York, p. 53-62.
2. Aluja A. S., Villalobos, A. N., Plancarte, A., Rodarte, L. F., Hernandez, M. and E. Sciutto. (1986). Experimental *Taenia solium* cysticercosis in pigs: characteristics of the infection and antibody response. *Vet Parasitol* **61(1-2)**: 259.
3. Anderson, R., Gao, X. M., Papakonstantinou, A., Roberts, M. and G. Dougan. 1996. Immune response in mice following immunization with DNA encoding fragment C of tetanus toxin. *Infect Immun* **64**: 3169-3173.
4. Barry, M. A., Barry, M. E. and S. A. Johnston. (1994). Production of monoclonal antibodies by genetic immunization. *BioTechniques* **16(4)**: 616-620.
5. Barry, M. A., Lay, W. C. and S. A. Johnston. (1995). Protection against mycoplasma infection using expression library immunization. *Nature* **377**: 632-635.
6. Benoit, P. W. and W. D. Belt. (1970). Destruction and regeneration of skeletal muscle after treatment with a local anaesthetic, bupivacaine (Marcaine). *J Anat* **107(3)**: 547-556.
7. Berglund, P., Smerdou, C., Fleeton, M. N., Tubulekas, I. and P. Liljestrum. 1998. Enhancing immune responses using suicidal DNA vaccines. *Nat Biotechnol* **16(6)**: 562-565.
8. Bojalil, R., Terrazas, L. I., Govezensky, T., Sciutto, E. and C. Larralde. (1993). Thymus-related cellular immune mechanisms in sex-associated resistance to experimental murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). *J Parasitol* **79(3)**: 384-389.
9. Boyer, J. D., Ugen, K. E., Wang, B., Agadjanyan, M., Gilbert, L., Bagarazzi, M. L., Chatergoon, M., Frost, P., Javadion, A., Williams, W. V., Rafraeli, Y., Ciccarelli, R. B., McCallus, D., Coney, L and D. B. Weiner. (1997). Protection of chimpanzees from high-dose heterologous HIV-1 challenge by DNA vaccination. *Nat Med* **3(5)**: 526-532.
10. Boyle, J. S., Silva, A., Brady, J. L. and A. M. Lew. (1997). DNA immunization: induction of higher avidity antibody and effect of route on T cell cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* **94(26)**: 14626-14631.
11. Broide, D., Schwarze, J., Tighe, H., Gifford, T., Nguyen, M. D., Malek, S., Van Uden, J., Martin-Orozco, E., Gelfand, E. W. and E. Raz. (1998). Immunostimulatory DNA sequences inhibit IL-5, eosinophilic inflammation, and airway hyperresponsiveness in mice. *J Immunol* **161(12)**: 7054-7062.

12. Cantini, M., Massimino, M. L., Catani, C., Rizzuto, R., Brini, M. and U. Carraro. (1994). Gene transfer into satellite cell from regenerating muscle: bupivacaine allows beta-Gal transfection and expression in vitro and in vivo. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* **30A(2)**: 131-133.
13. Calarota, S., Brutt, G., Nordlund, S., Hinkula, J., Leandersson, A. C. and E. Sandstrom. (1998). Cellular cytotoxic response induced by DNA vaccination in HIV-1 infected patients. *Lancet* **351**: 1320-1325.
14. Coil, W. H. (1991). *Microscopic Anatomy of Invertebrates, Vol 3: Platyhelminthes and Nemertinea*. Frederick W. Harrison Editors, p 211-283.
15. Condon, C., Watkins, S. C., Celluzzi, C. M., Thompson, K. and L. D. Jr. Falb. (1996). DNA-based immunization by in vivo transfection of dendritic cells. *Nat Med* **2(10)**: 1122-1128.
16. Conry, R. M., Widera, G., LoBuglio, A. F., Fuller, J. T., Moore, S. E., Barlow, D. L., Turner, J., Yang, N.S. and D. T. Curiel. (1996). Selected strategies to augment polynucleotide immunization. *Gene Ther* **3(1)**: 67-74.
17. Cox, G. J. M., Zamb, T. J., and L. A. Babiuk. (1993). Bovine herpesvirus 1: Immune responses in mice and cattle injected with plasmid DNA. *J Virol* **67**: 5664-5667.
18. Cruz-Revilla, C., Rosas, G., Fragoso, G., Lopez-Casillas, F., Toledo, A. and E. Sciutto. (1999). *Taenia crassiceps* cysticercosis: protective effect and immune response elicited by DNA immunization. (Aceptado para su publicación en el Journal of Parasitology).
19. Danko, Y. and J. A. Wolff. (1994). Direct transfer into muscle. *Vaccine* **12**: 1499-1502.
20. Davis, H. L., Michel, M. L. and R. G. Whalen. (1993). DNA-based immunization induces continuous secretion of hepatitis B surface antigen and high level of circulating antibody. *Hum Mol Genet* **2**: 1847-1851.
21. Davis, H. L., Michel, M. L. and R. G. Whalen (1995). Use of plasmid DNA for direct gene transfer and immunization. *Ann N Y Acad Sci* **772**: 21-29.
22. Davis, H. L., Mancini, M., Michel, M. L. and R. G. Whalen. (1996). DNA-mediated immunization to hepatitis B surface antigen: longevity of primary response and effect of boost. *Vaccine* **14(5)**: 910-915.
23. Davis, H. L., Brazolot Millan, C. L., Mancini, M., McCluskie, M. J., Hadchouel, M., Comanita, L., Tiollais, P., Whalen, R. G. and M. L. Michel. (1997). DNA-based immunization against hepatitis B surface antigen (HBsAg) in normal and HBsAg-transgenic mice. *Vaccine* **15(8)**: 849-852.
24. Deck, R. R., DeWitt, C. M., Donnelly, J. J., Liu, M. A. and J. B. Ulmer. (1997).



- Characterization of humoral immune responses induced by influenza hemagglutinin DNA vaccine. *Vaccine* **15(1)**: 71-78.
25. Del Brutto , O. H. and J. Sotelo. (1988). Neurocysticercosis: an update. *Rev Infect Dis* **10**: 1075-1087.
26. Doe, B., Selby, M., Barnett, S., Baenziger, J. and C. M. Walker. (1996). Induction of cytotoxic T lymphocytes by intramuscular immunization with plasmid DNA is facilitated by bone marrow-derived cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **93(16)**: 8578-8583.
27. Donnelly, J., Ulmer, J. B., and M. A. Liu. (1994). Immunization with DNA. *J Immunol Meth* **176**: 145-152.
28. Donnelly, J., Ulmer, J. B., and M. A. Liu. (1995a). Protective efficacy of intramuscular Immunization with naked DNA. *Ann New York Aca Sci* **772(27)**: 41-46.
29. Donnelly, J. J., Friedman, A., Martinez, D., Montgomery, D. H., Shiver, J. W., Motzel, S. L., Ulmer, J. B. and M. A. Liu. (1995b). Preclinical efficacy of a prototype DNA vaccine-enhanced protection against antigenic drift in influenza-virus. *Nature Med* **1**: 583-587.
30. Donnelly, J. J., Ulmer, J. B., Shiver, J. W. and M. A. Liu. (1997). DNA vaccines. *Annu Rev Immunol* **15**: 617-648.
31. Dorais, F. J. and G. W. Esch. (1969). Growth rates of two *Taenia crassiceps* strains. *Exp parasitol* **25(1)**: 395-398.
32. Doolan, D. L., Sedegah, M., Hedstrom, R. C., Hobart, P., Charoenvit, Y. and S. L. Hoffman. (1996). Circumventing genetic restriction of protection against malaria with multigene DNA immunization: CD8<sup>+</sup> cell-, interferon gamma- and nitric oxide- dependt immunity. *J Exp Med* **183(4)**: 1739-1746.
33. Eisenbraun, M. D., Fuller, D. H. and J. R. Haynes. (1993). Examination of parameters affecting the elicitation of humoral immune responses by particle bombardment-mediated genetic immunization. *DNA Cell Biol* **12**: 791-797.
34. Ertl, H. C. J., Verma, P. He, Z. and Z. Q. Xiang. (1995). Plasmid vectors as anti-viral vacines. *Ann New York Acad Sci* **772**: 77-87.
35. Evans, C. A., Gonzalez, A. E., Gilman, R. H., Verasteghi, M., Garcia, H. H., Chavera, A., Pilcher, J. B. and V. C. Tsang. (1997). Immunotherapy for porcine cysticercosis: implications for prevention of human disease. *Am J Trop Med Hyg* **56(1)**: 33-37.
36. Feltquate, D. M., Heaney, S., Webster, R. G. and H. L. Robinson. (1997). Different T helper cell types and antibody isotypes generated by saline and gene gun DNA immunization. *J Immunol* **158(5)**: 2278-2284.

37. Fragoso, G., Lamoyi, E., Mellor, A., Lomeli, C., Govezensky, T. and E. Sciutto. (1996). Genetic control of susceptibility to *Taenia crassiceps* cysticercosis. *Parasitology* **112(Pt 1)**: 119-124.
38. Freeman, R. S. (1962) Studies on the biology of *Taenia crassiceps* (Zeder, 1800), (Rudolphi, 1810). *Can J Zool* **40**: 969-990.
39. Fu, T. M., Friedmann, A., Ulmer, J. B., Liu, L. A. and J. J. Donnelly. (1997a). Protective cellular immunity: cytotoxic T-lymphocyte responses against dominant and recessive epitopes of influenza virus nucleoprotein induced by DNA immunizations. *J Virol* **71(4)**: 2715-2721.
40. Fu, T. M., Ulmer, J. B., Caulfield, M. J., Deck, R. R., Friedman, A., Wang, S., Liu, X., Donnelly, J. J. and M. A. Liu. (1997b). Priming of cytotoxic T lymphocytes by DNA vaccines: requirement for professional antigen presenting cells and evidence for antigen transfer from myocytes. *Mol Med* **3(6)**: 362-371.
41. Fuller, D. H., Simpson, L., Cole, K. S., Clements, J. C., Panicali, D. L., Montelaro, R. C., Murphey-Corb, M. and J. R. Haynes. (1997). Gene gun-based nucleic acid immunization alone or in combination with recombinant vaccinia vectors suppresses virus burden in rhesus macaques challenged with a heterologous SIV. *Immunol Cell Biol* **75(4)**: 389-396.
42. Fynan, E. F., Robinson, H. L. and R. G. Webster. (1993a). Use of DNA encoding influenza hemagglutinin as an avian influenza vaccine. *DNA Cell Biol*. **12**: 785-789.
43. Fynan, E. F., Webster, R. G., Fuller, D. H., Haynes, J. R., Santoro, J. C. and H. L. Robinson. (1993b). DNA vaccines: protective immunizations by parental, mucosal, and gene-gun inoculations. *Proc Natl Acad Sci USA* **90(24)**: 11478-11482.
44. Gardner, M. J., Doolan, D. L., Hedstrom, R. C., Wang, R., Sedegah, M., Gramzinski, R. A., Aguiar, J. C., Wang, H., Margalith, M., Hobart, P. and S. L. Hoffman. (1996). DNA vaccines against malaria: immunogenicity and protection in a rodent model. *J Pharm Sci* **85(12)**: 1294-1300.
45. Gemmel, 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.* (Flisser, A., Willms, K., Lacleste, J.P., Larralde, C., Ridaura, C. and Beltrán, F. eds.) Academic Press, New York. pp 700.
46. Gemmel, M., Matyas, Z., Pawlowski, Z., Soulsby, E. J. L., Larralde, C., Nelson, G. S. and B. Rosicky, (eds.) (1985). Guidelines for Surveillance, Prevention and Control of Teniasis/Cysticercosis, WHO Document VPH/83. 49, pp.1-207.

47. Gemmel M. A. and J. R. Lawson. (1989). The ovine cysticercosis as models for research into the epidemiology and control of the human and porcine cysticercosis *Taenia solium*: I, Epidemiological considerations. *Acta Leiden* **57(2)**: 165-172.
48. Ghiasi, H., Cai, S., Slanin, S., Nesburn, A. B. and S. L. Wechsler. (1995). Vaccination of mice with simple herpes virus type-1 glycoprotein D DNA produces low-levels of protection against lethal HSV-1 challenge. *Antiviral Res* **28**: 147-157.
49. Goebels, N., Michaelis, D., Wekerle, H. and R. Hohlfeld. (1992). Human myoblast as antigens-presenting cells. *J Immunol* **149(2)**: 661-667.
50. Gramzinski, R. A., Millan, C. L., Obaldia, N., Hoffman, S. L. and H. L. Davis. (1998). Immune response to a hepatitis B DNA vaccine in Aotus monkeys: a comparison of vaccine formulation, route and method of administration. *Mol Med* **4(2)**: 109-118.
51. Grisolia, J. S. and W. C. Wiederholt (1982). CNS cysticercosis. *Arch Neurol* **39(9)**: 540-544.
52. Hall-Craggs, E. C. (1974). Rapid degeneration and regeneration of a whole skeletal muscle following treatment with bupivacaine (Marcain). *Exp Neurol* **43(2)**: 349-358.
53. Hengge, U. R., Walker, P. S. and J. C. Vogel. (1996). Expression of naked DNA in human, pig, and mouse skin. *J Clin Invest* **97(12)**: 2911-2916.
54. Hoffman, S. L., Doolan, D. L., Sedegah, M., Gramzinski, R., Wang, H., Gowda, K., Hobart, P., Margalith, M., Norman, J. and R. C. Hedstrom (1995). Nucleic acid malaria vaccines: current status and potential. *Ann New York Acad Sci* **772**: 88-94.
55. Hohfeld, R. and A. G. Engel. (1990). Induction of HLA-DR expression on human myoblast with interferon-gamma. *Am J Pathol* **136(3)**: 503-508.
56. Hohfeld, R., Goebels, N. and A. G. Engel. (1993). Cellular mechanisms in inflammatory myopathies. *Bailliers Clin Neurol* **2(3)**: 617-667.
57. Hohfeld, R. and A. Engel. (1994). The immunobiology of muscle. *Immunol Today* **15(6)**: 269-274.
58. Huang, A. Y. C., Golumbek, P., Ahmandzadeh, M., Jafee, E., Pardoll, D. M. and H. Levitsky. (1994). Role of bone marrow-derived cells in presenting MHC class-I restricted tumor antigens. *Science* **264**: 961-965.
59. Huygen, K., Content, J., Denis, O., Montgomery, D. L., Yawman, A. M., Deck, R. R., DeWitt, C.M., Orme, I. M., Baldwin, S., D'souza, C., Drowart, A., Lozes, E., Vandebussche, P., Van Vooren, J. P., Liu, M. A. and J. B. Ulmer. (1996). Immunogenicity and protective efficacy of a tuberculosis DNA vaccine. *Nat Med* **2(8)**: 893-898.

60. Iwasaki, A., Stiernhold, B. J. N., Chan, A. K., Berinstein, N. L. and B. H. Barber. (1997a). Enhanced CTL responses mediated by plasmid DNA immunogens encoding costimulatory molecules and cytokines. *J Immunol* **158(10)**: 4591-4601.
61. Iwasaki, A., Torres, C. A., Ohashi, P., Robinson, H. L. and B. H. Barber. (1997b). The dominant role of bone marrow-derived cells in CTL induction following plasmid DNA immunization at different sites. *J Immunol* **159(1)**: 11-14.
62. Kayes, S. G., Shaneyfelt, R. C., Monteiro, C. and J. J. O'Brien. (1998). Overproduction of SM28GST in a baculovirus expression vector and its use to evaluate the in vivo immune responses of mice vaccinated against *Schistosoma mansoni* with naked DNA encoding the SM28GST gene. *J Parasitol* **84(4)**: 764-770.
63. Keilbach, N. M., de Aluja, A. S. and E. Sarti-Gutierrez. (1989). A programme to control taeniasis-cysticercosis (*Taenia solium*): experiences in a Mexican Village. *Acta Leiden* **57(2)**: 181-189.
64. Kline, J. N., Waldschmidt, I. J., Busingra, J. R., Lemish, J. E., Weinstock, J. V., Thorne, P. S. and A. M. Krieg. (1998). Modulation of airway inflammation by CpG oligodeoxynucleotides in a murine model of asthma. *J Immunol* **160(6)**: 2555-2559.
65. Klinman, D. M., Yi, A. K., Beaucage, S. L., Conover, J. and A. M. Krieg. (1996). CpG motifs present in bacteria DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12, and interferon gamma. *Proc Natl Acad Sci USA* **93 (7)**: 2879-2883.
66. Klinman, D. M., Yamshchikov, G. and Y. Ishigatsubo. (1997a). Contribution of CpG motifs to the immunogenicity of DNA vaccines. *J Immunol* **158(8)**: 3635-3639.
67. Klinman, D.M., Takeno, M., Ichino, M., Gu, M., Yamshchikov, G., Mor, G. and J. Conover. (1997b). DNA vaccines: safety and efficacy issues. *Springer Semin Immunopathol* **19(2)**: 245-256.
68. Kodihalli, S., Haynes, J. R., Robinson, H. L. and R. G. Webster. (1997). Cross-Protection among lethal H5N2. Influenza viruses induced by DNA vaccine to the hemagglutinin. *J Virol* **71(5)**: 3391-3396.
69. Krieg, A. M., Yi, A. K., Schorr, J. and H. L. Davis. (1998). The role of CpG dinucleotides in DNA vaccines. *Trends microbiol* **6(1)**: 23-27.
70. Krieg, A. M., Yi, A. K., Matson, S., Waldschmidt, T. J., Bishop, G. A., Teasdale, R., Koretzky, G. A. and D. M. Klinman. (1995). CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* **374(6522)**: 546-549.
71. Kuhrober, A., Wild, J., Pudollek, H. P., Chisari, F. V. and J. Reimann. (1997). DNA

- vaccination with plasmids encoding the intracellular (HBcAg) or secreted (HBeAg) form of the core protein of hepatitis B virus primes T cell responses to two overlapping Kb- and Kd- restricted epitopes. *Int Immunol* **9(8)**: 1203-1212.
72. Kuklin, N., Daheshia, M., Karem, K., Manickan, E. and B. T. Rouse. (1997). Induction of mucosal immunity against herpes simplex virus by plasmid DNA immunization. *J Virol* **71(4)**: 3138-3145.
73. Lai, W. C., Pakes, S. P., Ren, K., Lu, Y. S. and M. Benett. (1997). Therapeutic effect of DNA immunization of genetically susceptible mice infected with virulent *Mycoplasma pulmonis*. *J Immunol* **158(6)**: 2513-2516.
74. Larralde, C., Montoya, R. M., Sciutto, E., Díaz, M. V., Govezensky, T. and E. Coltorti. (1989). Deciphering western blots of tapeworm antigens (*Taenia solium*, *Echinococcus granulosus* and *Taenia crassiceps*) reacting with sera from neurocysticercosis and hydatid disease patients. *Am J Trop Med Hyg* **40(3)**: 282-290.
75. Larralde, C., Montoya, R. M., Sotelo, J., Hayunga, J., Sciutto, E., Palencia, G., Padilla, A., Govezensky, T. and L. Díaz. (1990). Murine *T. crassiceps* antigens in immunodiagnosis of *T. solium* human neurocysticercosis, *T. saginata* bovine cysticercosis and human *E. granulosus* hydatidosis. *Bull Soc Fr Parasitol* **8**:S 8B.
76. Larralde, C., Padilla, A., Hernández, M., Govezensky, T., Sciutto, E., Gutiérrez, G., Tapia-Conyer, R., Salvatierra, B. y J. Sepúlveda. (1992). Seroepidemiología de la cisticercosis en México. *Salud Pública de México*. pp 345.
77. Leitner, W. W., Seguin, M. C., Ballou, W. R. Seltz, J. P. Schultz, A. M., Sheehy, M. J. and J. A. Lyon. (1997). Immune responses induced by intramuscular or gene gun injection of protective deoxyribonucleic acid vaccines that express the circumsporozoite protein form *Plasmodium berghei* malaria parasites. *J Immunol* **159(12)**: 6112-6119.
78. Lin, Y. L., Chen, L. K., Liao, C. L. Yeh, C. L., Ma, S. H., Chen, J. L., Huang, Y. L., Chen, S. S. and H. Y. Chiang. (1998). DNA immunization with Japanese encephalitis virus nonstructural protein NS1 elicits protective immunity in mice. *J Virol* **72(1)**: 191-200.
79. Lopez-Casillas, F., Cheifetz, S., Doody, J., Andres, J. L., Lane, W. S. and J. Mazzagué. (1991). Structure and expression of the Membrane Proteoglycan Betaglycan, a component of the TGF- $\beta$  receptor system. *Cell* **67**: 785-795.
80. López-Macías, C., López-Hernández, M. A., Gonzalez, C. R., Isibasi, A. and V. Ortiz-Navarrete. (1995). Induction of antibodies against *Salmonella typhi* ompC porin by naked DNS immunization. *Ann N Y Acad Sci* **772**: 285-288.

81. Loo, L. and A. Braude. (1982). Cerebral cysticercosis in San Diego. A report of 23 cases and a review of the literature. *Medicine (Baltimore)* **61(6)**: 1537-1540.
82. Lowrie, D. B., Tascon, R. E. Colston, J. M. and C. L. Silva. (1994). Towards a DNA vaccine against tuberculosis. *Vaccine* **12(16)**: 1537-1540.
83. Lu, S. Arthos, J., Montefiori, D. C., Yasutomi, Y., Manson, K., Mustafa, F., Johnson, E., Santoro, J. C. Wissink, J., Mullins, J. L. Haynes, J. R., Letvin, N. L. Wynand, M. and H. L. J. Robinson. (1996). Simian Immunodeficiency virus DNA vaccine trial in macaques. *J Virol* **70(6)**: 3978-3991.
84. Manickan, E., Rouse, R., Yu, Z. Y. Wire, W. S. and B. T. Rouse. (1995). Genetic immunization against herpes-simplex-virus protection is mediated by CD4(+) T-lymphocytes. *J Immunol* **155**: 259-265.
85. Manickan, E., Karem, K. L. and B. T. Rouse (1997) DNA Vaccines: A modern gimmick or a boom to Vaccinology? *Crit Rev Immunol* **17(2)**: 139-154.
86. Manoutcharian, K., Larralde, C., Fragoso, G., Rosas, G., Hernández, M., Govezensky, T., Baca, M., Aluja, A., Villalobos, N., Rodarte, L. and E. Sciutto. (1995). Advances in the development of a recombinant vaccine against *Taenia solium* pig cisticercosis. In: *Vaccine* **95**. Cold Spring Harbord. pp 63-68.
87. Manoutcharian, K., Rosas, G., Hernandez, M., Fragoso, G., Aluja, A., Villalobos, N., Rodarte, L. F. and E. Sciutto. (1996). Cysticercosis: identification and cloning of protective recombinant antigens. *J Parasitol* **82(2)**: 250-254.
88. McClements, W. L., Armstrong, M. E., Keys, R. D. and M. A. Liu. (1996). Immunization with DNA vaccines encoding glycoprotein D or glycoprotein B, alone or in combination, induces protective immunity in animal models of herpes simplex virus-2 disease. *Proc Natl Acad Sci USA* **93(21)**: 11414-11420.
89. McCormick, G. F., Zee, C. S. and J. Heiden. (1982). Cysticercosis cerebri: review of 127 cases. *Arch Neurol* **39(9)**: 534-539.
90. McCormick, G. F. (1985). Cysticercosis, review of 230 patients. *Bull Clin Neurosci* **50**: 76-101.
91. Michaelis, D., Goebels, N. and R. Hohlfeld. (1993). Constitutive and cytokine-induced expression of human leukocyte antigens and cell adhesion molecules by human myotubes. *Am J Pathol* **143(4)**: 1142-1149.
92. Molinari, J. L., Meza, R. and P. Tato (1983). *Taenia solium*: cell reactions to the larva (*cysticercosis cellulosae*) in naturally parasitized, immunized hogs. *Exp Parasitol* **56(3)**: 327-

93. Molinari, J. L., Soto, R., Tato, P., Rodriguez, D., Retana, A., Sepulveda, J. and A. Palet. (1993). Immunization against porcine cysticercosis in an endemic area in Mexico: a field and laboratory study. *Am J Trop Med Hyg* **49(4)**: 502-512.
94. Molinari, J. L., Rodriguez, D., Tato, P., Soto, R., Arechavaleta, F. and S. Solano. (1997). Field trial for reducing porcine *Taenia solium* cysticercosis in Mexico by systematic vaccination of pigs. *Vet Parasitol* **69(1-2)**: 55-63.
95. Mor, G., Klinman, D. M., Shapiro, S., Hagiwara, E., Sedegah, M., Norman, J. A., Hoffman, S. L. and A. D. Steinberg. (1995). Complexity of the cytokine and antibody response elicited by immunizing mice with *Plasmodium yoelii* circumsporozoite protein plasmid DNA. *J Immunol* **155(4)**: 2039-2046.
96. Mor, G., Singla, M., Steinberg, A. D., Hoffman, S. L. Okuda, K. and D. M. Klinman. (1997). Do DNA vaccines induce autoimmune disease?. *Hum Gene Ther* **8(3)**: 293-300.
97. Nascimento, E., Costa, J. O. Guimaraes, M. P. and C. A. Tavares. (1995). Effective immune protection of pigs against cysticercosis. *Vet Immunol Immunopathol* **45(1-2)**: 127-137.
98. Nichols, W. W., Ledwith, B. J., Manam, S. V. and P. J. Troi. (1995). Potential DNA vaccine integration into host cell genome. *Ann NY Acad Sci* **772**: 30-39.
99. Peet, N. M., McKeating, J. A., Ramos, B., Klonisch, T., DeSouza, J. B., Delves, P. J. and T. Lund. (1997). Comparison of nucleic acid and protein immunization for induction of antibodies specific for HIV-1 gp120. *Clin Exp Immunol* **109(2)**: 226-232.
100. Pertmer, T. M., Eisenbraun, M. D., McCabe, D., Prayaga, S. K., Fuller, D. H. and J. R. Haynes. (1995). Gene gun-based nucleic acid immunization: elicitation of humoral and cytotoxic T lymphocyte responses following epidermal delivery of nanogram quantities of DNA. *Vaccine* **13(15)**: 1427-1430.
101. Pertmer, T. M., Roberts, T. R. and J. R. Haynes. (1996). Influenza virus nucleoprotein-specific immunoglobulin G subclass and cytokine responses elicited by DNA vaccination are dependent on the route of vector DNA delivery. *J Virol* **70**: 6119-6125.
102. Pimorady-Esfahani, A., Ground, M. D. and P. G. McMenamin. (1997). Macrophages and dendritic cells in normal and regenerating murine skeletal muscle. *Muscle Nerve* **20(2)**: 158-166.
103. Rabiela-Cervantes, M. T., Rivas-Hernández, A., Rodriguez-Ibarra, J., Castillo-Medina, S. and F. de M. Cancino. (1982). Anatomopathological aspects of human brain cysticercosis.

In: Cysticercosis: Present State of Knowledge and Perspectives (Flisser, A., Willms, K., Lacleste, J. P., Larralde, C., Ridaura, C. and F. Beltran, eds., ), pp 179-200, Academic Press, New York.

104. Rajasekariah, G. R., Richard, M. D., Mitchell, G. F. and R. F. Anders. (1982). Immunization of mice against *Taenia Taeniaeformis* using solubilized onconpheral antigens. *Int J Parasitol* **12(2-3)**: 111-6.
105. Raz, E., Carson, D. A., Parker, S. E., Parr, T. B., Abai, A. M., Aichinger, G., Gromkowski, S. H., Singh, M., Lew, D., Yankauckas, M. A., Baird, S. M. and G. H. Rhodes. (1994). Intradermal gene immunization: the possible role of DNA uptake in the induction of cellular immunity to viruses. *Proc Natl Acad Sci USA* **91(20)**: 9519-9523.
106. Rhodes, G. H., Abai, A. M., Margalith, M., Kuwahora-Rundell, A., Marrow, J., Parker, S. E. and V. J. Dwarki. (1994). Characterization of humoral immunity after DNA injection. *Dev Biol Stand* **82**: 229-236.
107. Richards, F. Jr. and P. M. Shantz. (1991). Laboratory diagnosis of cysticercosis. *Clin Lab Med* **11(4)**: 1011-1028.
108. Robinson, H. L., Hunt, L. A., and R. G. Webster. Protection against a lethal influenza virus challenge by immunization with haemagglutinin-expressing plasmid DNA. (1993) *Vaccine* **11**: 957-960.
109. Robinson, A. (1995). DNA-based vaccines: new possibilities for disease prevention and treatment. *CMAJ* **152(10)**: 1629-1632.
110. Robinson, H. L. and C. A. Torres. (1997). DNA vaccines. *Semin Immunol* **9(5)**: 271-283.
111. Robinson, H. L., Boyle, C. A., Feltquate, D. M., Morin, M.J., Santoro, J. C., and R. G. Webster (1997). DNA immunization for influenza virus: studies using hemagglutinin-and nucleoprotein-expressing DNAs. *J Infect Dis* **176 Suppl 1**: S50-S55.
112. Roman, M., Martin-Orozco, E., Goodman, J. S., Nguyen, M. D., Sato, Y., Ronaghy, A., Kornblith, R. S., Richman, D. D., Carson, D. A. and E. Raz. (1997). Immunostimulatory DNA sequences functions as T helper promoting adjuvants. *Nat Med* **3(8)**: 849-854.
113. Rosas, G., Cruz-Revilla, C., Fragoso, G., Lopez-Casillas, F., Perez, A., Bonilla, M. A., Rosales, R. and E. Sciutto. (1998). *Taenia crassiceps* cysticercosis: humoral immune response and protection elicited by DNA immunization. *J Parasitol* **84(3)**: 516-523.
114. Rothel, J. S., Waterkeyn, J. G., Strugnelli, R. A., Wood, P. R., Seow, H. F., Vadolas, J. and M. W. Lightowlers. (1997). Nucleic acid vaccination of sheep: use in combination with a conventional adjuvant vaccine against *Taenia ovis*. *Immunol Cell Biol* **75(1)**: 41-46.



115. Salmon, J. K., Armstrong, C. A. and J. C. Ansel. (1994). The skin as an immune organ. *West J Med* **160(2)**: 146-152.
116. Saito, Y. and I. Nonaka. (1994). Initiation of satellite cell replication in bupivacaine-induced myonecrosis. *Acta Neuropathol (Berl)* **88(3)**: 252-257.
117. Sato, Y., Roman, M., Tighe, H., Lee, D., Curr, M., Nguyen, M. D., Silverman, G. J., Lutz, M., Carson, D. A. and E. Raz. (1996). Immunostimulatory DNA sequences necessary for effective intradermal gene immunization. *Science* **273(5273)**: 352-354.
118. Sedegah, M., Hedstrom, R., Hobart, P. and S. L. Hoffman. (1994). Protection against malaria by immunization with plasmid DNA encoding circumsporozoite protein. *Proc Natl Acad Sci USA* **91(21)**: 9866-9870.
119. Sciutto, E., Fragoso, G., Trueba, L., Lemus, D., Montoya, R. M., Díaz, M. L., Govezensky, T., Iomelí, C., Tapia, G. and C. Larralde. (1990a) Cysticercosis vaccine: cross protecting immunity with *Taenia solium* antigens against experimental murine *Taenia crassiceps* cysticercosis. *Parasite Immunol* **12(6)**: 687-696.
120. Sciutto, E. (1990b). Aportaciones de la cisticercosis murina experimental por *Taenia crassiceps* al conocimiento de los factores biológicos que participan en la susceptibilidad a la infección por metacestodos y al diagnóstico y prevención de la cisticercosis por *Taenia solium*. Tesis de Doctorado en Investigación Biomédica Básica. Instituto de Investigaciones Biomédicas, U.N.A.M. México, D. F.
121. Sciutto, E., Fragoso, G., Baca, M., De la Cruz, V., Lemus, L. and E. Lamoyi. (1995a). Depressed T-cell proliferation associated with susceptibility to experimental infection with *Taenia crassiceps* infection. *Infect Immun* **63**: 2277-2281.
122. Sciutto, E., Aluja, A., Fragoso, G., Rodarte, L. F., Hernandez, M., Villalobos, M. N., Padilla, A., Keilbach, N., Baca, M., Govezensky, T. and C. Larralde. (1995b). Immunization of pigs against *Taenia solium* cysticercosis: factors related to effective protection. *Vet Parasitol* **60(1-2)**: 53-67.
123. Sotelo, J., DelBrutto, O. H. and G. C. Roman. (1996). Cysticercosis. *Curr Clin Top Infect Dis* **16**: 240-259.
124. Swain, W. F. Macklin, M. D., Newmann, G., McCabe, D. E., Drape, R., Fuller, J. T., Widera, G., McGregor, M., Callan, R. J. and V. Hinshaw. (1997). Manipulation of immune responses via particle-mediated polynucleotide vaccines. *Behring Inst Mitt* **98**: 73-78.
125. Tang, D., Devit, M. and S. A. Johnson. (1992). Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature* **356**: 125-155.

126. Tascon, R. E., Stavropoulos, E., Colston, M. J. and D. B. Lowrie. (1996). Polynucleotide vaccination induces a significant protective immune response against Mycobacteria. In *Vaccines 96*, ed. F. Brown, R. M. Chanock, M. S. Ginsberg, R. A. Lerner, pp. 45-49. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Lab. Press.
127. Terrazas, L. I., Bojalil, R., Govezensky, T. and C. Larralde. (1998). Shift from an early protective Th1-type immune response to a late permissive TH2-type response in murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). *J Parasitol* **84(1)**: 74-81.
128. Terrazas, L. I., Cruz, M., Rodriguez-Sosa, M., Bojalil, R., García-Tamayo, F. and C. Larralde. (1999). Th1-type cytokines improve resistance to murine cysticercosis caused by *Taenia crassiceps*. *Parasitol Res* **85(2)**: 135-141.
129. Thomason, D. B. and F. W. Booth. (1990). Stable incorporation of a bacterial gene into adult rat skeletal muscle in vivo. *Am J Physiol* **258(3 pt 1)**: C578-C581.
130. Tobery, T. W. And R. F. Siliciano. (1997). Targeting of HIV-1 antigens for rapid intracellular degradation enhances cytotoxic T lymphocytes (CTL) recognition and the induction of the novo CTL responses in vivo after immunization. *J Exp Med* **185(5)**: 909-920.
131. Torres, C. A., Iwasaki, A., Barber, B. H. and H. L. Robinson. (1997). Differential dependence on target site tissue for gene gun and intramuscular DNA immunizations. *J Immunol* **158(10)**: 4529-4532.
132. Toledo, A., Larralde, C., Gevorkian, G., Fragoso, G., Manoutcharian, K., Acero, G., Rosas, G., Lopez-Casillas, F., Kubli, C., Vazquez, R., Terrazas, I. and E. Sciutto. (1999). Towards a *Taenia solium* cysticercosis vaccine: An epitope shared by *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* protects mice against experimental cysticercosis. (En prensa).
133. Tuting, T., Storkus, W. J. and L. D. Jr Faló. (1998). DNA immunization targeting the skin: molecular control of adaptive immunity. *J Invest Dermatol* **111(2)**: 183-188.
134. Ulmer, J. B., Donnelly, J. J., Parker, S. E., Rhodes, G. H., Felgner, P. L., Dwarki, V. J., Gromkowski, S. H., Deck, R. R., DeWitt, C. M., Friedman, A., Hawe, L. A., Leander, K. R., Martínez, D., Perry, H. C., Shiver, J. W., Montgomery, D. L. and M. A. Liu. (1993). Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding viral protein. *Science* **259(5102)**: 1745-1749.
135. Ulmer, J. B., Deck, R. R., Dewitt, C. M., Friedman, A., Donnelly, J. J. and M. A. Liu. (1994). Protective immunity by intramuscular injection of low-doses of influenza-virus DNA vaccines. *Vaccine* **12**: 1541-1544.
136. Ulmer, J. B., Donnelly, J. J. and M. A. Liu. (1996). Toward the development of DNA vaccines. *Curr Opin Biotechnol* **7(6)**: 653-658.

- 137.Valdez, F., Hernandez, M., Govezensky, T., Fragoso, G. and E, Sciutto. (1994). Immunization against *Taenia crassiceps* cysticercosis: identification of the most promising antigens in the induction of protective immunity. *J Parasitol* **80(6)**: 931-936.
- 138.Yang, W., Waine, G. L: and D. P. McManus. (1995). Antibodies to *Schistosoma japonicum* (Asian Bloodfluke) paramyosin induced by nucleic acid vaccination. *Biochem Biophys Res Commun* **212(3)**: 1029-1039.
- 139.Waine, G. J. and D. P. McManus. (1995). Vaccines of the Future. *Parasitol Today* **11(3)**: 113-116.
- 140.Waine, G. J., Yang, W., Scott, J. C., McManus ,D. P. and B. H. Kalinna. (1997). DNA-based vaccination using *Schistosoma japonicum* (Asian blood-fluke) genes. *Vaccine* **15(8)**: 846-848.
- 141.Wang, B., Ugen, K. E., Srikantan, V., Agadjanyan, M. G., Dang, K., Refaeli, Y., Sato, A. I., Boyer, J., William, W. V. and D. B. Weiner. (1993). Gene inoculation generates immune responses against human immunodeficiency virus type I. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 4156-4160.
- 142.Wang, B., Boyer, J. D., Ugen, K. E., Srikanten, V., Ayyarro, V., Agadjanyan, M. G., William, W. V., Newman, M., Coney, L. and R. Carrano. (1995). Nucleic acid-based immunization against HIV-1: Induction of protective in vivo immune responses. *AIDS* **9: Suppl A**: S159-S170.
- 143.Webster, R. G., Fynan, E. F., Santoro, J. C. and H. Robinson (1994). Protection of ferrets against influenza challenge with a DNA vaccine to the haemagglutinin. *Vaccine* **12(6)**: 1495-1498.
- 144.Weiner, G. J., Liu, H. M., Wooldridge, J. E., Dahle, C. E. and A. M. Krieg. (1997). Immunostimulatory oligodeoxynucleotides containing the CpG motif are effective as immune adjuvant in tumor antigen immunization. *Proc Natl Acad Sci USA* **94(29)**: 10833-10837.
- 145.Whalen, R. G. and H. L. Davis. (1995). DNA-mediated immunization and the energetic immune response to hepatitis B surface antigen. *Clin Immunol Immunopathol* **75(1)**: 1-12.
- 146.Williams, R. S., Johnston, S. A., Riedy, M., DeVit, M. J., McElligott, S. G. and J. C. Sanford. (1991). Introduction of foreign genes into tissues of living mice by DNA-coated microprojectiles. *Proc Natl Acad Sci USA* **88(7)**: 2726-2730.
- 147.Wolff, J. A., Malone, R. W., Williams, P., Chong, W., Acsadi, G., Jani, A. and P. A. Felgner (1990). Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* **247**: 1465-1466.
- 148.Wolff, J. A., Williams, P., Acsadi, G., Jiao, S., Jani, A. and W. Chong. (1991). Conditions

- affecting direct gene transfer into rodent muscle *in vivo*. *Biotechniques* **11(4)**: 474-485.
149. Wolff, J. A., Ludtke, J. L., Assadi, G., Williams, P. and A. Jani. (1992). Long-term persistence of plasmid DNA and foreign gene expression in mouse muscle. *Hum Mol Genet* **1(6)**: 363-369.
150. Xiang, Z. Q. and H. Ertl. (1995b). Manipulation of the immune-response to a plasmid-encoded viral-antigen by coinoculation with plasmids expressing cytokines. *Immunity* **2**: 129-135.
151. Xiang, Z. Q., Spitalnik, S. L., Cheng, J., Erikson, J., Wojczyk, B. and H. C. J. Ertl. (1995a). Immune responses to nucleic acid vaccines to rabies virus. *Virology* **209**: 569-579.
152. Xu, D. and F. Y. Liew. (1994). Genetic vaccination against leishmaniasis. *Vaccine* **12(16)**: 1534-1536.
153. Xu, D. and F. Y. Liew. (1995). Protection against leishmaniasis by injection of DNA encoding a major surface glycoprotein, gp63, of *Leishmania major*. (1995). **84(2)**: 173-176.
154. Yang, W., Waite, G. J. and D. P. McManus. (1995). Antibodies to *Schistosoma japonicum* (Asian bloodfluke) paramyosin induced by nucleic acid vaccination *Biochem Biophys Res Commun* **212(3)**: 1029-1039.
155. Yankauckas, M. A., Morrow, J. E., Parker, S. E., Abai, A., Rhodes, G. H., Dwarki, V. J. and S. H. Gromkowski. (1993). Long-term anti-nucleoprotein cellular and humoral immunity is induced by intramuscular injection of plasmid DNA containing NP gene. *DNA Cell Biol* **12(9)**: 771-776.
156. Yang, W., Waite, G. J. and D. P. McManus. (1995). Antibodies to *Schistosoma japonicum* (Asian blood fluke) paramyosin induced by nucleic acid vaccination. *Biochem Biophys Res Commun* **212(3)**: 1029-1039.
157. Yokoyama, M., Zhang, J. and J. L. Whitton. (1995). DNA immunization confers protection against lethal lymphocytic choriomeningitis virus infection. *J Virol* **69(4)**: 2684-2688
158. Yi, A. K., Chace, J. H., Cowdery, J. S. and A. M. Krieg. (1996a). IFN-gamma promotes IL-6 and IgM secretion in response to CpG motifs in bacterial DNA and oligodeoxynucleotides. *J Immunol* **156(2)**: 558-564.
159. Yi, A. K., Klinman, D. M., Martin, T. C., Matson, S. and A. M. Krieg. (1996b). Rapid immune activation by CpG motifs in bacterial DNA systemic induction of IL-6 transcription through an antioxidant sensitive pathway.
160. Yi, A. K., Chang, M., Peckman, D. W., Krieg, A. M. and R. F. Ashman. (1998a). CpG oligodeoxyribonucleotides rescue mature spleen B cells from spontaneous apoptosis and

- promote cell cycle entry. *J Immunol* **160(12)**: 5898-5906.
161. Yi, A. R., Tuetken, R., Redford, T., Waldschmidt, M., Kirsch, J. and A. M. Krieg. (1998b). CpG motifs in bacterial DNA activate leukocytes through the pH-dependent generation of reactive oxygen species. *J Immunol* **160(10)**: 4755-4761.
162. Zarozinski, C. C., Fynan, E. F., Selin, L. K., Robinson, H. L. and R. M. Welsh. (1995). Protective CTL-dependent immunity and enhanced immunopathology in mice immunized by particle bombardment with DNA encoding an internal virion protein. *J Immunol* **154(8)**: 4010-4017.

## 11. APENDICE I

### Vacunación con ADN o vacunación génica

La observación de que el ADN purificado inyectado directamente en ratones podía expresarse, fue realizada por Atanasiu en 1961 (Manickan et al., 1997). No fue sino hasta varios años después que estas observaciones se confirmaron. Felgner y Wolf (Wolff et al., 1990), trabajaban en el diseño de un sistema de expresión de genes para terapia génica, empacando el ADN plasmídico en liposomas catiónicos, con el propósito de fusionar estos liposomas con las membranas celulares. Lograron muy exitosamente que el plásmido se liberara dentro de las células *in vivo*, y la expresión de la proteína codificada por el gen incorporado en el plásmido. Curiosamente observaron que el ADN inoculado también se expresaba. A la luz de las observaciones disponibles hasta entonces, esto no tenía sentido. Felgner repitió muchas veces el experimento, obteniendo el mismo resultado, hasta que se convenció de que el ADN por sí solo, podía entrar y expresarse en las células *in vivo*, observando la expresión de genes reporteros en músculos cuádriceps de ratones. Tang y colaboradores (1992), probaron por primera vez que la administración por gene gun del ADN plasmídico en ratones, era una manera efectiva de generar una respuesta de anticuerpos en contra de la hormona de crecimiento humano y la  $\alpha$ -1 anti-tripsina humana. Posteriormente, Liu y colaboradores (Ulmer et al., 1993), demostraron inicialmente la efectiva protección de la inmunización con ADN en contra de una proteína viral, inyectado directamente en los músculos cuádriceps de los ratones, produciendo una respuesta tanto celular como humoral, utilizando una construcción que expresaba la nucleoproteína (NP) del virus de la influenza A, protegiendo en un 90% contra los retos letales del virus, en donde solo el 20% de los controles sobrevivía, lo que fue confirmado por Yankauckas y colaboradores (1993).

Estas observaciones generaron grandes expectativas y provocaron un incremento impresionante de trabajos en esta área de investigación, que reportaron tanto protección como la generación de respuesta inmune humoral, células Th y CTLs contra los correspondientes antígenos (Tang et al., 1992; Fynan et al., 1993a,1993b; Robinson et al., 1993; Ulmer et al., 1993; Raz et al., 1994; Rhodes et al., 1994; Webster et al., 1994).

La vacunación génica se ha aplicado en diferentes modelos animales: ratón, ratas, hurones, conejos, gatos, pollos, cerdos, primates no humanos, humanos (Hengge et al., 1996; Yang et al., 1995; Donnelly et al., 1997; Swain et al., 1997), aplicada por diferentes métodos: inyección con jeringa hipodérmica de ADN en solución salina (Tabla 1), o por la

técnica de liberación de ADN llamada gene gun (Tabla 2), que se basa en el bombardeo de los tejidos con partículas de oro cubiertas con ADN o ARNm (Williams et al., 1991; Eisenbraun et al., 1993; Fynan et al., 1993b; Feltquate et al., 1997; Torres et al., 1997). Recientemente, se ha propuesto por el Dr. Rod Ruoff en 1998 (Department of Physics at Washington University; St Louis, MO.) un nuevo tipo de partículas para gene gun llamadas Magnetic Designer Particles (DP), que pueden tener diferentes formas (aún para la aplicación de líquidos), o ser de diferentes materiales como cerámica, metal o vidrio. También se ha propuesto por la compañía Vaxin Pharmaceuticals INC, dirigido por el Dr. De-Chu Tang en septiembre de 1998, una tecnología de liberación del ADN en la piel a través de un parche adhesivo (libre de agujas), lo cual reduciría el costo de la vacunación en personas, además de ser aplicada sin dolor. Todos los métodos que se han aplicado tienen el fin de lograr la incorporación del ADN en las células, con la mayor eficiencia posible para expresar las respectivas proteínas vacunales, e inducir una respuesta inmune que confiera protección. También se han evaluado diferentes rutas de inmunización como el músculo (en quadiceps o tibialis), en piel, de forma intravenosa o en mucosas (como de forma intranasal o intratraqueal), aunque el método por gene gun se ha aplicado generalmente en piel (Wolf et al., 1991; Davis et al., 1993; Fynan et al., 1993b; Robinson et al., 1995; Felquate et al., 1997).

La inmunización intramuscular con jeringa hipodérmica es el método de inmunización más comúnmente utilizado, y las células musculares han sido muy estudiadas en cuanto a su capacidad de presentar antígenos y despertar una respuesta inmune (Hohlfeld and Engel, 1994). El hecho de la popularidad de la inmunización intramuscular del ADN en solución salina con jeringa hipodérmica, se debe tanto a su bajo costo, como a la facilidad de inmunizar por este método, y aunque en menor medida, también se ha utilizado gene gun. Utilizando gene gun, Tang y colaboradores (1992), demostraron por primera vez la obtención de una respuesta inmune humoral vacunando con ADN, y junto con Williams y colaboradores (1991), fueron los primeros reportes del uso de gene gun en un sistema animal para generar una respuesta inmune, pues anteriormente solo se utilizaba para la transfección de células de plantas. Esta técnica resulta actualmente más costosa y menos accesible, pero tiene la ventaja de que requiere cantidades muy inferiores de ADN. Utilizando las mismas construcciones, se ha comparado la inyección salina y la técnica de gene gun (Webster et al., 1994; Pertmer et al., 1995, 1996; Robinson et al., 1995).

# Tabla 1. Inmunización Intramuscular

Autor	Inmunización	Localización de la inoculación y dosis	Inmunidad/Protección
Ulmer et al., 1993	Nucleoproteína NP de la influenza.	Tres dosis de 100 µg de ADN en cada cuadriceps (semanas 0, 3 y 6) en ratones.	Inducción de una respuesta celular y humoral, y protección a desafíos subsecuentes.
Lowrie et al., 1994	Proteína de choque térmico (hsp65) de <i>Mycobacterium leprae</i> .	Cinco dosis de 50 µg de ADN en cada cuadriceps, en ratones.	Alta protección por CTLs.
Xu and Liew, 1994	Glicoproteína de superficie (gp63) de <i>Leishmania major</i> .	Una dosis de 100 µg en 3 lugares distintos del cuadriceps, en ratón.	Protección por medio de una respuesta de tipo Th1.
Xiang et al., 1995a	Glicoproteína G del virus de la rabia	Una dosis con 50 µg en el cuadriceps izquierdo en ratones.	Respuesta inmune: Th1(CD4+), anticuerpos neutralizantes, CTLs. Protección en contra de retos subsecuentes con el virus.
Yang et al., 1995	Paramiosina (SJ97) de <i>Schistosoma japonicum</i> .	Tres dosis de 50 µg en cada cuadriceps (semanas 0, 3 y 6).	Primer reporte de vacunación en parásitos multicelulares, generación de anticuerpos específicos.
Kayes et al., 1998	Sm28GST de <i>Schistosoma mansoni</i> .	Una dosis con 100 µg/µl	Respuesta tanto humoral como mediada por células (CTLs).
Rosas et al., 1998	KETc7 del cisticerco de <i>Taenia crassiceps</i> .	Tres dosis con 100 µg por cuadriceps (semanas 0, 2 y 4).	Inducción de anticuerpos específicos y significativos niveles de protección.
Cruz-Revilla et al., 1999	KETc7 del cisticerco de <i>Taenia crassiceps</i> .	Una o tres dosis con 100 µg por cuadriceps.	Respuesta celular y niveles significativos de protección.



# Tabla 2. Inoculación en piel

Autor	Enfermedad (inmunización)	Localización de la inoculación	Dosis	Inmunidad
Tang et al., 1992	Gen que codifica para la hormona del crecimiento humano (hGH).	Inoculación con gene gun en la piel de orejas de ratones.	Varias descargas, inmunizaciones subsecuentes aumentan la respuesta humoral.	Respuesta de anticuerpos. Las subsecuentes inmunizaciones incrementan la respuesta.
Fynan et al., 1993b	Virus de la influenza, Gen que codifica para la proteína hemaglutinina HA.	Inoculación con gene gun en piel abdominal de ratones.	2 descargas de 0.4 µg cada una.	Respuesta de anticuerpos, 95% de protección con dos inmunizaciones.
Raz et al., 1994	Virus de la influenza, Gen que codifica para una nucleoproteína.	Inyección en piel en ratones.	Una sola inoculación 0.3-15 µg ADN.	Inducción de respuesta celular y humoral específicos a la nucleoproteína.
Webster et al., 1994	Virus de la influenza, Gen que codifica para la glicoproteína hemaglutinina HA.	Inoculación con gene gun en piel abdominal de hurones.	Se probaron: 2 descargas (0.4 µg ADN) y 10 descargas (0.2 µg ADN).	Inducción de anticuerpos antes y después del reto. Protección completa frente a la infección.
Zarozinski et al., 1995	Gen que codifica para una nucleoproteína del virus de la cariomeningitis linfocítica (LCMV),	Inoculación con gene gun en piel abdominal de ratones.	2 descargas (0.2 µg de ADN) para un total de 0.4 µg.	Respuesta de células T antivirales, observan protección.

En la Tabla 3 se ilustra la cantidad de ADN requerida por gene gun para obtener los resultados equivalentes a los obtenidos con la liberación del ADN, usando jeringa hipodérmica. Webster y colaboradores (1994), demostraron que las bolitas de oro cubiertas con el ADN administrado en la piel de hurones con gene gun (de 0.8 a 2  $\mu\text{g}$  de ADN por hurón), es mas eficiente (protección completa frente al reto), que la inmunidad inducida con la inyección intramuscular en ambos cuádriceps (500  $\mu\text{g}$  por hurón), la cual no previno la infección. El menor requerimiento de ADN por gene gun, se debe a que por este procedimiento, el ADN que cubre las bolitas de oro tiene una alta eficiencia para introducirse directamente a través de las membranas plasmáticas de las células (Williams et al., 1991; Tang et al., 1992; Eisenbraun et al., 1993), mientras que con inyección intramuscular (con jeringa de insulina), el ADN inyectado queda en el espacio extracelular (Wolff et al., 1992; Davis et al., 1993), seguido por la internalización del ADN por un mecanismo aún desconocido (Wolff et al., 1992; Davis et al., 1993; Ulmer et al., 1994), lo cual pueda implicar un distinto proceso de transfección de las células, que resulte en una inducción de distintos tipos de células Th (Feltquate et al., 1997). Aunque en términos generales se ha encontrado que se necesita de 100 a 1000 veces mas de ADN inmunizando con jeringa que con gene gun, para generar la misma respuesta de anticuerpos (Pertmer et al., 1995; Robinson et al., 1995), el grupo de Liu (Ulmer et al., 1994), encontró que vacunando con plásmidos que expresaban la hemaglutinina (HA) o la nucleoproteína (NP) del virus de la influenza, generaban anticuerpos o linfocitos T-citotóxicos específicos respectivamente, y en ambos casos observaron protección completa, inmunizando intramuscularmente en cuádriceps de ratones con solo 1  $\mu\text{g}$  de ADN, por lo que bajas dosis de ADN administrado por inyección intramuscular provee de una protección eficiente contra el virus de la influenza. También encontraron una correlación entre la dosis de ADN inyectado, y la magnitud de la respuesta inmune generada. Deck y colaboradores (1997), reportaron que vacunando intramuscularmente con el plásmido que expresaba la hemaglutinina (HA) del virus de la influenza, encontraban un 100% de protección por anticuerpos en ratones, después de un reto letal, inmunizando con tan solo 1  $\mu\text{g}$  de ADN (dos veces). Dosis de 10 a 100  $\mu\text{g}$ , con el subsecuente desafío, no incrementó los títulos de anticuerpos observados previamente. El título alto de anticuerpos fue mantenido por lo menos durante 1.5 años.

**Tabla 3. Comparación de la inyección del ADN en solución salina (intramuscular o intradérmica), y gene gun**

Autor (Inmunización)	Inyección intramuscular	inyección intradérmica	Gene gun	Ventajas y diferencias
Webster et al., 1994 Hemaglutinina (HA) del virus de la influenza, en hurones.	500 µg (tres dosis)	-----	2 µg (10 shot en piel abdominal)	La administración del ADN con gene gun es mas eficiente (protección completa frente al reto), que la inmunidad inducida con la inyección intramuscular en ambos cuadriceps.
Robinson et al., 1995 Virus de la Influenza, en ratones.	100 µg (50µg en cada cuadriceps)	100 µg (en cojinete plantar)	0.04 a 0.4 µg	Con estas dosis se obtuvo la misma respuesta de anticuerpos, por lo que con gene gun se necesita menor cantidad de ADN.
Pertmer et al., 1996 Nucleoproteína A del virus de la influenza, en ratones.	100 µg (intramuscular)	-----	1 µg (en piel)	La inyección intramuscular produce una respuesta predominantemente de IgG2a y altos niveles de IFN. Después de la inyección por gene gun, aunque encuentran altos niveles de IFN, decaen después de la tercera inmunización, y aumenta entonces IL-4.
Feltquate et al., 1997 Hemaglutinina (HA) del virus de la influenza, en ratones.	100 µg (50 µg en el cuadriceps derecho) .	100 µg (arriba de la cola) o 25µg (en cojinete plantar)	0.4 µg (en piel o cuadriceps expuesto)	La inyección induce una respuesta predominante tipo Th1, mientras que con gene gun se induce una respuesta tipo Th2, por lo que la respuesta inmune se induce por el método y no por la ruta de inmunización.
Rosas et al., 1998 Cruz-Revilla et al., 1999 KETc7 de <i>Taenia crassiceps</i> , en ratones.	100 µg por cuadriceps	200 µg (6 inyecciones abdominales)	-----	Nivel de protección mas alto inmunizando tres veces intradérmicamente (80%) que intramuscularmente (62%).

La mayor eficiencia de la inmunización intradérmica frente a la inmunización intramuscular, inyectando directamente con jeringa hipodérmica, ha sido previamente reportada por Raz y colaboradores (1994), y confirmado por Cruz-Revilla y colaboradores (1999), los cuales reportaron que la inmunización con pTc-sp7 de forma intradérmica, indujo un nivel de protección del 80% frente a un 63% por la ruta intramuscular. Por otro lado, el método de administración del ADN, usando una aguja convencional e inyectando intradérmicamente, también ha sido investigada por Donnelly y colaboradores (1994), Hoffman y colaboradores (1995) y Ertl y colaboradores (1995). En el caso de la inmunización con el vector que expresa la nucleoproteína NP para el virus de la influenza, aunque se induce una respuesta de CTLs, la protección estudiada comparando ratones inmunizados intramuscularmente o intradérmicamente con ADN NP, sugiere que el método intradérmico es menos efectivo (Donnelly et al., 1994). Estas divergencias en los resultados reportados por los distintos autores, apoyan el hecho de que esto puede reflejar las diferentes capacidades de los plásmidos para expresar el antígeno.

La inmunización en piel (ya sea por inyección con aguja o por gene gun), implica que las células transfectadas *in vivo* sean células epidermales. El tejido linfoide asociado a la piel provee de un alto grado de vigilancia inmune activa y es rico en células que fagocitan, como las células de Langerhans y/o las células dendríticas de la dermis, las cuales pueden presentar los antígenos a los componentes ayudadores del sistema inmune celular (Webster et al., 1994). Las células de Langerhans son células dendríticas, que cuentan con Aparato de Golgi, retículo endoplásmico, lisosomas, mitocondrias y gránulos de Birbeck. Son células presentadoras de antígenos, las cuales llegan hasta la piel por los vasos sanguíneos de la dermis y luego invaden la epidermis. La mayoría se sitúa en el estrato germinativo e inician reacciones de hipersensibilidad. Presentan receptores de Fc (IgG) y C3, para macrófagos y monocitos, y MHC de clase II.

Por otra parte, se observó el efecto inmunoestimulador del ADN en bacterias, el cual es capaz de inducir esplenocitos así como células B, T y "Natural Killer", para que produzcan citocinas de tipo Th1 como IL-12, IFN- $\gamma$  e IFN- $\alpha\beta$ , a lo que se le ha denominado efecto adyuvante no específico del ADN plasmídico (Feltquate et al., 1997; Roman et al., 1997). Se ha observado que incluídas en el promotor del citomegalovirus, así como en el gen de resistencia a ampicilina, existen pequeñas secuencias de ADN inmunoestimuladoras (ISS-DNA), que contienen dinucleótidos CpG, flanqueadas por dos purinas en el extremo 5' y dos pirimidinas en el extremo 3', con la fórmula general 5'-PurPurCGPyrPyr-3' (Krieg et al., 1995, 1998; Klinman et al., 1996, 1997a; Sato et al., 1996; Roman et al., 1997; Kline et al., 1998;

Yi et al., 1998a). Estas contienen el hexámero CpG siguiente: 5'-GACGTC-3', 5'-AGCGCT-3' y 5'-AACGTT-3'. Los dinucleótidos CpG son poco representados en el ADN vertebrado y usualmente se encuentran metilados. En contraste, los dinucleótidos CpG se encuentran presentes en frecuencia esperada en el ADN bacteriano y se encuentran no metilados (Yi et al., 1996a). Se ha reportado que estos motivos inducen una amplia variedad de citocinas, y activan células B, monocitos, células dendríticas y células NK (Weiner et al., 1997). Yi y colaboradores (1996b), observaron una rápida activación en la transcripción de IL-6 inducida por los CpG a través de la vía dependiente de los intermediarios de oxígeno reactivo. También se ha observado que los motivos CpG en el ADN bacteriano activan leucocitos (inducción de la transcripción de genes leucocitarios y la secreción de citocinas), a través de la generación de especies de oxígeno reactivo dependientes del pH (Yi et al., 1998b). Estos estudios demuestran una vía novedosa de activación de leucocitos por motivos CpG. En diciembre de 1998, el grupo de "Dynavax Technologies Corporation" (fundada en 1996), publicó que una sola administración sistémica o por mucosas (intranasal o intratraqueal), de ISS-DNA, en el modelo murino de asma alérgica, inhibe los síntomas de la enfermedad de forma tan efectiva como la administración diaria y sistémica de corticosteroides por 7 días. Además, a diferencia de los corticosteroides, las inyecciones con ISS-DNA fueron capaces de redireccionar la respuesta inmune, llevando de una fuerte respuesta Th2 asociada a la inflamación alérgica, a una respuesta Th1 no alérgica. Este estudio demuestra por primera vez *in vivo*, que las ISS-DNA pueden ser utilizadas como una droga, tanto para inhibir como para modificar las enfermedades alérgicas (Broide et al., 1998), así como el asma. Además, la tecnología creada por Dynavax provee de la oportunidad de intervenir directamente en los procesos de enfermedades autoinmunes e inflamatorias, ofreciendo alternativas únicas en el tratamiento, o en su uso para el aumento en la respuesta inmune hacia enfermedades infecciosas. Davis y colaboradores (1998), utilizando oligonucleótidos sintéticos (ODN), con motivos CpGs, inmunizando junto con el antígeno de superficie recombinante del virus de la hepatitis B (HbsAg) en ratones, encontraron títulos de anticuerpos 5 veces más altos que la inmunización con HbsAg y el adyuvante standard (hidróxido de aluminio). Pero cuando se inmunizaba con HbsAg y CpG ODN además del aluminio, los títulos fueron 35 veces más altos que los ratones inmunizados con el aluminio, indicando la fuerte interacción sinérgica entre CpG ODN y el aluminio. Los ODN sin motivos CpG, tienen poca o no aumentan la respuesta inmune. El aluminio induce una respuesta humoral Th2 (IgG1 principalmente), y no CTLs. En contraste, CpG ODN induce una fuerte respuesta TH1, predominantemente de anticuerpos IgG2a y CTLs, aún mezclado con el aluminio. Con ello

se demuestra la capacidad prometedora de los CpG ODN para ser usados en vacunación.

A diferencia de la relación de dependencia entre dosis/peso corporal y respuesta inducida en la inmunización con proteínas, la inmunización con ADN requiere de una cierta dosis para asegurar la incorporación a las células, que resulta similar para especies de diferentes pesos. Así las mismas dosis han resultado eficientes tanto para ratones como para cabras (Cox et al., 1993), además de que la habilidad de generar diferentes tipos de Th no se debe a las diferencias en la dosis de ADN utilizado (Feltquate et al., 1997).

Aún cuando la mayor parte de los trabajos de inmunización génica se han realizado en modelos experimentales de enfermedades infecciosas, tanto virales como bacterianas (Ulmer et al., 1993, 1994, 1996; Lai et al., 1997), más recientemente se han tenido avances en intentos de vacunación génica contra parásitos unicelulares (Xu and Liew, 1994; Sedegah et al., 1994; Gardner et al.; 1996; Donnelly et al., 1997); pero poco se ha avanzado en inducir respuestas eficientes contra parásitos pluricelulares (Yang et al., 1995; Rothel et al., 1997; Kayes et al., 1998; Rosas et al., 1998; Cruz-Revilla et al., 1999). Las Tablas 1, 2 y 3 muestran algunos ejemplos de las enfermedades contra las cuales se ha buscado protección mediante inmunización génica, así como el sitio, la forma de inmunización y el tipo de inmunidad conferida. La protección, por vacunas de ADN en modelos de enfermedades preclínicas, ya sea mediada por una respuesta celular o de anticuerpos, comenzó en contra del virus de la influenza en modelos de ratones (Ulmer et al., 1993; Ulmer et al., 1994; Fu et al., 1997a; Pertmer et al., 1996; Kodihalli et al., 1997), aves (Fynan et al., 1993a), en modelos de hurones (Donnelly et al., 1995b; Webster et al., 1994), y avanzó al virus del herpes bovino (Cox et al., 1993), al modelo del virus del herpes simplex humano en el modelo murino, y en mucosas de conejillos de Indias (Ghiasi et al., 1995; Manickan et al., 1995; McClements et al., 1996; Kuklin et al., 1997), el virus de la rabia (Xiang et al., 1995a), el virus de la cariomeningitis linfocítica (Yokoyama et al., 1995;), el virus del papiloma del conejo (Donnelly et al., 1996), el virus de la hepatitis B (Davis et al., 1993, 1997; Whalen and Davis et al., 1995), y el virus HIV en modelo murino (Tobery and Siliciano, 1997; Peet et al., 1997), en chimpancees (Boyer et al., 1997), y en humanos (Calarota et al., 1998). Una de las importancias de la tecnología de la vacunación con ADN en las enfermedades virales, es que la expresión de las proteínas virales *in situ* después de la vacunación con ADN puede llevar al plegamiento, modificaciones postraduccionales y transporte intracelular correcto, pues las proteínas virales normalmente se expresan en la célula eucarionte del huésped durante el curso de una infección viral. En contraste, las proteínas bacterianas son expresadas por si mismas, y no por la maquinaria para sintetizar

proteínas de la célula huésped, por lo que la expresión de proteínas bacterianas en células eucariontes puede llevar a diferentes modificaciones postraduccionales resultando en una conformación no-nativa. Sin embargo, la inyección del ADN plasmídico es una manera efectiva de expresar las proteínas bacterianas en células eucariontas (tanto antígenos como proteínas reporteras), y proveen de protección en modelos de enfermedades bacterianas en animales. En el caso de *Mycobacterium pulmonis* (Barry et al., 1995), confirieron protección inmunizando con varios miles de plásmidos distintos, usando un coctel como vacuna, a lo que se le ha llamado inmunización génica con una biblioteca de expresión, por lo que la mezcla presenta al menos un plásmido que codifica para un antígeno (o una parte de él), que le confiere protección. También se ha obtenido una respuesta protectora vacunando con ADN de antígenos de *Mycobacterium tuberculosis* (Huygen et al., 1996; Tascon et al., 1996; Ulmer et al., 1996), proteínas de *Mycobacterium leprae* (Lowrie et al., 1994), contra el fragmento C de la toxina tetánica de *Clostridium tetani* (Anderson et al., 1996), o contra la proteína porina OmpC de *Salmonella typhi* (Lopez-Macias et al., 1996). Las vacunas con ADN también se han probado para enfermedades parasitarias, en contra de protozoarios unicelulares como *Leishmania major* (Xu and Liew, 1994; Xu et al., 1995), *Plasmodium yoelii* (Sedegah et al., 1994; Gardner et al., 1996; Doolan et al., 1996), o *Plasmodium berghei* (Leitner et al., 1997); contra proteínas de parásitos metazoarios multicelulares como *Schistosoma mansoni* (Kayes et al., 1998) o *Schistosoma japonicum* (Yang et al., 1995), o parásitos pluricelulares como los céstodos *Taenia crassiceps* (Rosas et al., 1998; Cruz-Revilla et al., 1999), o *Taenia ovis* (Rothel et al., 1997). El grupo de Glaxo Wellcome en colaboración con PowderJect Pharmaceuticals plc (PowderJect vaccines Inc.), dirigido por el Dr. Paul R. Drayson, informó el 7 de diciembre de 1998, el logro de la primera vacuna de ADN profiláctica, capaz de inducir una respuesta inmune protectora en humanos contra la hepatitis B humana. Esto señala el primer logro de respuesta inmune protectora con vacunación génica, en pruebas clínicas humanas. Este grupo formuló y liberó el ADN en la piel como “polvo seco” adherido a partículas microscópicas de oro, utilizando un revolucionario sistema de liberación “libre de agujas” (needle-free Dermal PowderJect® System), inmunizando tres veces. Con esta formulación “en polvo”, reportan que utilizan 1000 veces menos de ADN por dosis que las tecnologías actualmente en competencia, lo cual es un factor crítico para que sea exitosa comercialmente.

La vacunación génica crea nuevas esperanzas para el desarrollo de vacunas, pues aparentemente presenta ventajas no solo respecto a las vacunas vivas atenuadas, o formas muertas de todo el organismos, sino también frente a las vacunas con proteínas nativas o

recombinantes (Tabla 4). Las vacunas vivas atenuadas presentan el inconveniente de que se administra todo el patógeno completo, como las vacunas de la polio, viruela, sarampión, paperas o rubeóla; por lo que existe el riesgo intrínseco de que pueda ser patogénico otra vez. La ventaja de este tipo de vacunas es que puede inducir una respuesta de CTLs, Th y de anticuerpos, lo cual no ocurre con las vacunas que utilizan formas muertas de todo el organismo, pues generalmente no son capaces de inducir una respuesta de CTLs, aunque no llevan el riesgo de una vacuna viva. La administración de proteínas nativas o recombinantes, como las vacunas contra el tétano, difteria tóxide o derivados recombinantes, como el antígeno de superficie B contra la hepatitis, no inducen generalmente una respuesta citotóxica, y se requiere de estímulos sucesivos para inducir y mantener una respuesta inmune tanto celular como humoral. Los sistemas de expresión recombinante *in vitro*, producen proteínas que pueden tener modificaciones postraduccionales, o una conformación alternativa o diferente a la que tendría la proteína de tipo silvestre, producida por ejemplo en una infección viral. En cambio, las vacunas con ADN al expresar las proteínas dentro de las células del huésped, son capaces de inducir una respuesta tanto humoral y/o celular prolongada (Yankauckas et al., 1993; Xu and Liew, 1994; Nichols et al., 1995; Donnelly et al., 1997), sin el riesgo asociado a las vacunas vivas, pues se ha visto que los plásmidos pueden mantenerse en las células musculares por un largo tiempo (Wolff et al., 1992; Ulmer et al., 1993; Deck et al., 1997). Sin embargo, se requiere identificar en bibliotecas genómicas o directamente en los tejidos, por medio de técnicas como PCR, las secuencias que codifican para las proteínas protectoras (Barry et al., 1995; Lu et al., 1996).



**Tabla 4. Tipos de Vacuna**

<p>Vacunas vivas atenuadas como las vacunas de la polio, varicela, viruela, sarampión, paperas, rubeóla</p>	<p>Inconveniente: se administra todo el patógeno completo por lo que existe el riesgo intrínseco de que pueda ser patogénico otra vez. Ventaja: puede inducir una respuesta de CTLs, Th, y de anticuerpos, lo cual no ocurre con las vacunas que utilizan formas muertas de todo el organismo, pues generalmente no son capaces de inducir una respuesta de CTLs, aunque no llevan el riesgo de una vacuna viva.</p>
<p>Vacunas vivas atenuadas mediante técnicas de ADN recombinante: mutando o deletando el gen virulento. En experimentación para el virus de la influenza, y una nueva forma de vacuna para <i>Salmonella typhi</i></p>	<p>Se obtiene una vacuna no patogénica, donde la reversión al tipo silvestre es prácticamente imposible, con las ventajas de una vacuna viva.</p>
<p>Proteínas nativas o recombinantes como las vacunas contra el tétano, difteria tóxide o derivados recombinantes, como el antígeno de superficie B contra la Hepatitis.</p>	<p>Generalmente no inducen una respuesta Citotóxica, y se requiere de estímulos sucesivos para inducir, y mantener una respuesta inmune tanto celular como humoral.</p>
<p>Vacuna con péptidos sintéticos. En experimentación contra la malaria, <i>Leishmania</i> o <i>Taenia sp</i> )</p>	<p>Vacuna segura, puede ser capaz de inducir una respuesta celular y/o humoral, con el inconveniente de tener que identificar el epítape inmunogénico.</p>
<p>Vacunas con ADN o vacunas génicas.</p>	<p>Al expresar las proteínas dentro de las células del huésped, son capaces de inducir una respuesta tanto humoral y/o celular prolongada, sin el riesgo asociado a las vacunas vivas. Es especialmente eficiente para inducir una respuesta inmune citotóxica. Falta confirmar su seguridad en humanos.</p>

El grupo de Whalen (Davis et al., 1996), reportaron que una sola inmunización génica intramuscular con el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HbsAg), produce una respuesta inmune humoral fuerte y de larga duración, similar a la inducción producida por una sola inyección con la proteína recombinante. Aunque parecen ser amplias las ventajas de la inmunización génica frente a otro tipo de vacunas, aún cabe el riesgo de revertirse en la forma peligrosa, sobre todo en vacunas en contra de las más serias infecciones virales. Por ello, se han comenzado a evaluar a finales de año de 1998, vacunas que usan ARN como material de inmunización. Aún así, existen investigadores que dicen que no es seguro este tipo de vacunas no se reviertan a la forma peligrosa. Por ello aún falta por evaluar la total seguridad en la inmunización con ADN o ARN.

En un principio solo se realizaba la vacunación génica con los plásmidos que expresaban la proteína de interés, pero después se ha probado co-inyectar otros plásmidos que contengan otras secuencias, las cuáles sean secuencias co-estimuladoras, que pueden amplificar la respuesta inmune, o inducirla hacia algún tipo de respuesta, la cual se conozca que sea capaz de inducir protección. También se ha probado con “plásmidos duales”, los cuales contienen 2 cassettes de expresión independientes. A esto se le ha llamado inmunización polinucleótida (Conry et al., 1996; Tuting et al., 1998). Estas secuencias pueden ser genes de citocinas como GM-CSF (Xiang and Ertl, 1995b) o IL-12, así como moléculas coestimuladoras como B7.1 o B7.2 (Tascon et al., 1996; Iwasaki et al., 1997a; Kuhrober et al., 1997). Puede ser que las vacunas de ADN no reemplacen otro tipo de vacunación, pero sí pueden utilizarse para redireccionar la naturaleza de la respuesta inmune. Además, este procedimiento también puede utilizarse como una herramienta útil para la producción de anticuerpos polinucleares o mononucleares, expresando antígenos *in vivo*, como se reporta para la hormona de crecimiento humano, por el grupo de Johnston en 1994 (Barry et al., 1994). También se ha evaluado la inmunización con ADN en combinación con una vacuna recombinante. Fuller y colaboradores (1997), evaluaron la capacidad de inducir una respuesta inmune protectora en contra del virus de la inmunodeficiencia del simio (SIV), inmunizando con el ADN que codifica para SIVmac239gp120 y gp160, solo o con una subsecuente dosis de la vacuna recombinante SIVmac251gp120. También se realizó el experimento inmunizando primero con la vacuna recombinante, sola o con una última inmunización con ADN. Observaron que las inmunizaciones que implicaban tanto la inmunización con ADN como con la vacuna recombinante, los macacos presentaban títulos de anticuerpos significativamente más altos que los grupos inmunizados solo con ADN o solo con la vacuna recombinante, mostrando

que existe una relación sinérgica en una vacuna basada en una inmunización con ADN y una vacuna recombinante. Por otra parte, Rothe y colaboradores (1977), utilizaron la vacunación con ADN en ovejas, en combinación con una vacuna recombinante (rec45w), en contra de *Taenia ovis*. El gen que codifica para el antígeno protector de 45w de *Taenia ovis*, fue clonado en el vector pcDNA3 (pcDNA3-45w) y utilizado para inmunizar de forma intramuscular o intradérmica. Utilizando ambas rutas de inmunización, obtuvieron una respuesta humoral predominantemente de IgG1. Sin embargo, el nivel de anticuerpos fue bajo y repetidas vacunaciones no aumentaron la respuesta inmune. La inyección intramuscular de pcDNA3-45w en animales con una respuesta inmune previamente generada por la vacunación con rec45w (con Quil A de adyuvante), no resultó en un aumento en los niveles de anticuerpos. Una vacunación inicial con pcDNA3-45w y una subsecuente vacunación con rec45w, resultó en niveles significativamente altos de anticuerpos, comparados con la respuesta obtenida en ovejas vacunadas únicamente con rec45w. Este aumento fue predominantemente de tipo IgG1. Una segunda vacunación de estos animales con rec45w no resultó en un incremento de IgG1, pero aumentó 10 veces los niveles de IgG2.

Existen diferentes factores que se ven involucrados en la respuesta inmune inducida por vacunación con ADN: la naturaleza del organismo que será inmunizado, el esquema de inmunización, la construcción de la vacuna génica utilizada, el método y la ruta de inmunización, la forma en que será expresado el antígeno (ya sea secretado, asociado a la membrana, citosólico o particulado), y el antígeno por sí mismo. La vacunación con ADN abre las posibilidades de estudiar de forma más amplia, los diferentes tipos de respuesta inmune inducidos después de su aplicación. La inmunización génica es especialmente eficiente para inducir una respuesta inmune citotóxica, por lo que al parecer los antígenos producidos se expresan preferentemente por MHC de clase I (Hohlfeld and Engel, 1994; Doe et al., 1996; Iwasaki et al., 1997b).

Al respecto de cuales son los tipos celulares que pudieran estar involucrados en la presentación antigénica, las propuestas han cambiado desde los primeros reportes, los cuales fueron muy especulativos, hasta la fecha. Wolff y colaboradores reportaron en 1990 que después de una sola inyección intramuscular (100 µg), las células musculares eran capaces de expresar los genes reporteros por lo menos durante dos meses, por lo que se pensó que podían tener la capacidad de ser APCs profesionales facultativas e inducir una respuesta tanto celular como humoral (Hohlfeld and Engel, 1994). Esto fue apoyado por otras investigaciones. En 1990, Hohlfeld y Engel publicaron que la expresión de HLA de

clase II, podía ser inducida en mioblastos mononucleados de músculo, después de un cultivo de 5 días en presencia de IFN-gamma recombinante humano. Posteriormente, Goebels y colaboradores (1992), cultivaron mioblastos humanos de músculo, y observaron que si eran tratados con IFN gamma, inducían una proliferación antigénica específica. Sus resultados sugerían que los mioblastos humanos podrían actuar como APCs facultativas durante una reacción inmune local en el músculo. En 1993, Hohlfeld y colaboradores publicaron que bajo condiciones de cultivo estandar, las células musculares expresaban moléculas de HLA clase I, pero si estos mioblastos eran estimulados con IFN gamma, podían expresar moléculas de HLA clase II y adquirir el potencial para procesar y presentar antígenos a células T CD4+. Posteriormente, el conocer que tipo celular (dependiendo del sitio de inoculación), es el responsable de efectuar la verdadera y correcta presentación de los antígenos para llevar a cabo la respuesta inmune observada, se ha convertido en un área de investigación sumamente importante en los trabajos con vacunación génica, pues esto ayudaría a comprender mejor como se lleva a cabo la inducción de la respuesta inmune celular y/o humoral.

La inducción de CTLs restrictivos a MHC de clase I, inmunizando intramuscularmente, puede implicar, (como se pensó primero), la presentación de antígenos mediado directamente por miocitos transfectados, aunque los miotubos del músculo expresan constitutivamente MHC de clase I, pero no MHC de clase II (Michaelis et al., 1993). Después se pensó que las APCs profesionales también podían ser transfectadas, ya sea que se transfecten en el sitio de la inoculación, o el ADN viaje hasta el bazo, donde se inicie la respuesta inmune. También puede implicar la transferencia del antígeno de los miocitos transfectados a APCs profesionales (Fu et al., 1997b).

Actualmente, se propone que las células musculares solo proporcionan el antígeno para que las APCs profesionales de origen hematopoyético realicen la acción de presentarlo (Doe et al., 1996; Iwasaki, 1997b). De hecho, se ha demostrado que las células que juegan un papel clave en el proceso de presentación del antígeno, tanto en inmunización epidérmica por gene gun, así como inmunización intramuscular con jeringa hipodérmica, son APCs profesionales de origen hematopoyético (Iwasaki et al., 1997b; Tuting et al., 1998). En inmunizaciones intramusculares con aguja hipodérmica, se ha retirado el músculo 10 minutos después de efectuar la inyección, y se ha observado que la respuesta humoral no se ve afectada, ni en su magnitud ni en su duración, frente a los que no se les retiró el músculo, por lo que se propone que en el caso del músculo inyectado por vacunación con ADN, las células musculares no juegan un papel esencial para la inducción

de CTLs. Probablemente, el ADN puede ser capaz de moverse libre por los vasos linfáticos o sanguíneos hacia otros tejidos (como el bazo), y alcanzar otros tipos celulares (APCs profesionales que inicien la respuesta), o tal vez las células sanguíneas en tránsito por el lugar sean transfectadas en el momento, para después alejarse a otros sitios (Robinson and Torres, 1997). Estas observaciones se realizaron utilizando la proteína HA del virus de la influenza, que se asocia a membranas; para la hormona del crecimiento humano, que es secretada; y una nucleoproteína del virus de la influenza, que es una nucleoproteína intracelular (Torres et al., 1997), y en ningún caso la forma en que fue expresado el antígeno afectó el resultado.

Por otra parte, si las APCs de origen hematopoyético son las responsables de la presentación del antígeno, y se ha visto la transfección de las células musculares con inyección intramuscular con ADN (Rosas et al., 1998), ¿cómo se transfiere el antígeno entre las células somáticas transfectadas al realizar la inmunización con ADN a las células APCs profesionales?, esto aún no se sabe, si es que realmente se lleva a cabo este proceso. Después de una inmunización intramuscular, también se ha visto que los miocitos parecen ser el tipo celular predominantemente transfectado, aunque en baja proporción (1 al 2% de las células musculares integran el ADN) (Davis et al., 1995). Sin embargo, debe existir mecanismos de cooperación en el procesamiento del antígeno.

La hipótesis de “cross-priming” propone que los antígenos son sintetizados en células somáticas del huésped, y pueden ser transferidos a APCs profesionales, para su presentación en el contexto de moléculas de MHC clase II, (Huang et al., 1994), aunque falta saber cuál es el mecanismo celular involucrado en este proceso. Por otra parte, Pimorady-Esfahani y colaboradores (1997), confirmaron que los macrófagos son un componente significativo normal del músculo esquelético murino y éstas células se incrementan dramáticamente después de una injuria. Además, mostraron por primera vez que las células dendríticas de MHC clase II+ se encuentran presentes en el músculo esquelético normal, y que las células de MHC clase II+, incluidas las células dendríticas, se incrementan también después de una injuria.

En el caso de las inmunizaciones que involucran piel, la duración de la expresión de antígenos en las células puede ser de pocos días, por el mismo recambio de la epidermis (Williams et al., 1991). Las células que presentan el antígeno son células APCs profesionales de la dermis y epidermis (Raz et al., 1994; Hengge et al., 1996), tales como las células de Langerhans y/o células dendríticas dermales (Salmon et al., 1994). Torres y colaboradores (1997), han reportado que si se realiza una biopsia de la piel en el sitio de la

inmunización, 24 horas posteriores a la transfección por gene gun, se elimina completamente la respuesta de anticuerpos en casi todos los ratones. Por otro lado, Donnelly y colaboradores (1997), reportan que en ratones, inmunizando por gene gun en el pabellón de la oreja, seguido de la extracción de la misma, resulta en una respuesta inmune, por lo que sugiere que el ADN por si solo, o las células transfectadas, son suficientes para inducir una respuesta inmune, y escapan rápidamente del sitio de inmunización en piel. Esto permite suponer que la inmunización en la piel por gene gun, transfecta directamente células que son parte del sistema inmune (Salmon et al., 1994), y que las células de Langerhans epidérmicas transfectadas se mueven por la linfa de la piel inmunizada, hacia nódulos linfáticos (Condon et al., 1996; Robinson and Torres, 1997).

Se ha observado que una misma construcción inyectada con jeringa hipodérmica en solución salina o por gene gun (distinto método de transfección), pueden favorecer una respuesta de tipo Th1 (predominantemente anticuerpos IgG2a e interleucina IFN $\gamma$ ), o Th2 (predominantemente anticuerpos IgG1 e interleucina IL-4) respectivamente (Pertmer et al., 1996; Feltquate et al., 1997). Los distintos tipos de respuesta inmune inducida son dependientes del método de inmunización que se utilice para la liberación del ADN, y no de la ruta (en este caso piel o músculo), por el cual se inmunice (Feltquate et al., 1997). Feltquate y colaboradores (1997), utilizando el ADN que expresa la proteína HA del virus de la influenza, reportó que con posteriores inmunizaciones la respuesta inmune se incrementa, pero no se altera la naturaleza de la misma; ya sea que las subsecuentes inmunizaciones se realicen con el mismo método o se utilice otro alternativo; lo cual ha sido apoyado por Pertmer et al., (1996). Este grupo de investigación observó que utilizando ADN que expresa la nucleoproteína (NP) del virus de la influenza, la respuesta inmune es determinada solamente por el método de inmunización primario, sin importar que se realice una segunda dosis con uno distinto. Sin embargo, Mor y colaboradores (1995), usando el ADN que expresa una proteína del circunsporozoito de *Plasmodium yoelii*, reportaron que una inmunización intramuscular inicial produce una respuesta Th2, y una subsecuente produce una respuesta predominantemente Th1. Esto podría explicarse si se considera que existen diferencias en el tipo o forma de antígeno que se utilice para vacunar, por lo que la cantidad y calidad de la respuesta inmune originada por la vacunación con ADN, se ve afectada de forma determinante por la identidad del antígeno en si mismo (Robinson and Torres, 1997; Robinson et al., 1997), además del fondo genético de los animales inmunizados y el método de liberación del ADN, por lo que es necesario profundizar mas, tanto en la caracterización de los antígenos expresados por ADN, como por todos los

factores relacionados que llevan a un tipo de respuesta inmune (Pertmer et al., 1996).

Por último cabe mencionar los problemas de la seguridad, y las ventajas de la vacunación génica:

a.- El plásmido es hecho sin un origen de duplicación funcional en células eucarióticas, por lo que estos plásmidos no pueden duplicarse en el huésped mamífero o integrarse dentro del ADN cromosomal del animal.

b.- No se ha observado evidencia de que el plásmido se integre al genoma de la célula huésped, solo del 1 al 2% de las células musculares son transfectadas *in vivo* durante la inmunización con ADN, por lo que la frecuencia de inducción de mutación por probabilidad de integración es de 3 órdenes de magnitud menor ( $1.3 \times 10^{-9}$ ) que la frecuencia espontánea de mutación ( $2 \times 10^{-6}$ ). (Nichols et al., 1995). Tampoco se ha encontrado evidencias de inducción de crecimiento neoplásico hasta los 11 meses post-vacunación (Xiang et al., 1995a), y si en algún momento, usando alguna construcción determinada, en algún tejido, con un método de aplicación del ADN en particular, causara eventos de transformación, podrían usarse vectores que sean transitorios y líticos, como la expresión mediada por el vector alfaviral (Berglung et al., 1998), evitando la expresión persistente y constitutiva de los vectores tradicionales usados en vacunación génica.

c.- No hay evidencia de la producción de autoanticuerpos anti-ADN. (Nichols et al., 1995), o autoanticuerpos contra de células musculares (Mor et al., 1997), por lo que se sugiere que las vacunas con ADN ni inician, ni aceleran el desarrollo de autoinmunidad sistémica.

Como se ilustra en esta revisión, el área de inmunización génica esta actualmente siendo estudiada para su mejor comprensión, y son aún muchos las interrogantes que faltan contestar.

Es factible que en los próximos años se complete la información necesaria para saber realmente las posibilidades y riesgos de este tipo de procedimientos, para su uso en el diseño de nuevas estrategias para el control de enfermedades.

Aunque aún no se compruebe si este tipo de vacunación pueda realmente reemplazar a las vacunas actuales, si pueden proveer de un recurso para manipular la respuesta inmune en situaciones donde la respuesta hacia determinado agente sea inapropiada o inefectiva.

## 12. Apendice II

### Características de los plásmidos para inmunización génica

La vacunación con ADN consiste en un plásmido bacterial, con un promotor fuerte, la secuencia del gen de interés, y una secuencia de terminación de la transcripción poliadenilacional. El plásmido se transforma en bacterias, se amplifica, se purifica, se disuelve en solución salina, y se inyecta directamente en el huésped. El ADN plasmídico es captado por las células del huésped, y la proteína de interés es codificada.

El mecanismo ideal de optimizar las vacunas de ADN es optimizando el vector en si mismo. Para que un plásmido pueda funcionar como vector necesita: (Ulmer et al., 1996; Donnelly et al., 1997; Manickan et al., 1997; Simmond et al., 1997):

- Ser de doble cadena y estar superenrollado estructuralmente.
- Un promotor eucariótico fuerte, que lleve la transcripción de la secuencia del antígeno insertado de interés. La mayoría de las inmunizaciones exitosas con ADN, utilizan principalmente promotores virales como RSV (virus del Sarcoma Rous); CMV (promotor temprano-inmediato del citomegalovirus) o SV40 (promotor temprano de SV40).
- Un sitio de clonación para insertar la secuencia del gen de interés.
- Una secuencia de terminación de la transcripción, para asegurar la estabilidad del transcrito (ARNm), y así asegurar la traducción, como la región 3' terminal no traducida de la hormona de crecimiento bovino (BGH3'-UTR), o la secuencia de poliadenilación/terminación de SV40.
- Un origen de replicación procariótica conveniente para producir grandes cantidades de plásmido en bacterias transformadas.
- Un marcador de selección, como un gen de resistencia, que confiere un crecimiento selectivo al antibiótico, asegurando que solo las bacterias que contienen el plásmido se propagen en el cultivo.

Aunque este tipo de construcciones son las que mayor resultado han dado en los laboratorios, es posible que una sola construcción no sea óptima para todos los genes de interés posibles.



### 13. Apendice III

#### Bupivacaina

Es un anestésico local (amida), de acción prolongada y de alta potencia. Es usado para bloquear nervios periféricos, como anestésico espinal y postoperatorio.

Desde 1970, Benoit y Belf observaron el efecto de la rápida degeneración y regeneración del músculo esquelético, con inyección de bupivacaina (Tabla 5).

Respecto a su posible uso en vacunación con ADN (Tabla 6), se ha utilizado como una alternativa en la búsqueda de fármacos que puedan:

a? Aumentar la expresión de los genes de interés.

b.- El nivel de expresión reportado para la inoculación de ADN en músculos de primates no humanos, es menor que los reportados para roedores, por lo que se buscan métodos que incrementen la expresión de los genes *in vivo*, lo que podría ser mediante el incremento de la captación del ADN.

La bupivacaina es un agente miotóxico, cuando es inyectado en músculo esquelético. Incrementa la permeabilidad de la membrana a los iones de calcio llevando a la hipercontracción de las fibras musculares y necrosis. La inervación, el suplemento de sangre, las células satélites, y el tejido conjuntivo no se encuentran significativamente afectados, aunque algunas fibras musculares, y hasta los mionúcleos, sean destruidos (Saito, 1994). El proceso de regeneración ha sido asociado a la mayor captación del ADN por parte de las células. El daño del músculo produce que las células satélites se activen mitóticamente, y puedan aceptar la inserción del ADN (Thomason and Booth, 1990; Cantini, 1994). El músculo necrótico se regenera rápidamente: los miotubos se regeneran 3 días después del tratamiento, y la restauración total del músculo es en 21 días. La máxima capacidad proliferativa de las células satélite es entre las 36 y 48 horas después del daño (Thomason and Booth, 1990). La administración de bupivacaina lleva a una infiltración de polimorfonucleares y macrófagos, produciendo una reacción inflamatoria. La fagocitosis del material necrótico se asocia con el comienzo de la replicación de las células satélite. Danko y colaboradores (1994), probaron varios tratamientos previos a la inyección intramuscular del plásmido en cuádriceps, en un intento de aumentar la expresión del gen extraño. Observaron que de todos los tratamientos, el mejor aumento de la expresión lo obtuvieron con un pre-tratamiento con bupivacaina.

## Tabla 5. Bupivacaina (antecedentes)

Autor (año)	Inmunización	Bupivacaina 0.5% en SSI	Observaciones
Benoit and Belt, 1970	-	Inyección intradérmica en los músculos del muslo: Gracilis anticus y gracilis posticus con 500 µl, en ratas.	Con una sola inyección, las fibras musculares se degeneran en los primeros 15 minutos, y hay regeneración total en dos semanas. Con varias inyecciones, se da el mismo patrón de degeneración y regeneración similar a una sola inyección.
Hall-Craggs, 1974	-	Inyecciones intramusculares en músculos anteriores tibiales con 500 µl en ratas.	Cambios de degeneración y regeneración (en tres semanas) del músculo.
Well, 1993	Genes que codifican para cloramfenicol acetiltransferasa (CAT) y β - Galactosidasa (βgal).	Inyección intramuscular en el músculo tibial anterior con 2.5 µl/g del peso del ratón de 3 a 21 días antes de la inmunización	Se encontró un aumento significativo en los niveles de expresión de los genes, en los días 3 y 7.
Danko et al., 1994	Genes que codifican para la luciferasa y la lactosidasa.	Inyección intramuscular con: Solución salina normal, etidocaina, mepivacaina, anhídrido acético, bicarbonato de sodio, de 5 a 7 días antes de la inmunización en ratones.	De los agentes probados, el que mejor aumentó la expresión de los genes fue la bupivacaina.

# Tabla 6. Uso de la bupivacaína en la vacunación génica

Autor (año)	Inmunización	Bupivacaína 0.5% en SSI	Tiempo post- inmunización con ADN	Observaciones
Thomason and Booth, 1990	Gen que codifica para la $\beta$ - galactosidasa de <i>Escherichia</i> <i>coli</i> .	Inyección con 300 a 500 $\mu$ l en el músculo soleus, en ratas.	24 a 48 hr	Mayor expresión de la actividad de la $\beta$ -galactosidasa en las fibras musculares.
Wang et al., 1993	Gen que codifica para gp160 de HIV-1 (100 $\mu$ g cada 2 semanas, para un total de 4 inmunizaciones).	Inyección con 100 $\mu$ l en el músculo cuadriceps, en ratones.	24 hr	Inducción de respuesta celular y humoral.
Wang et al., 1995	Gen que codifica para gp160 de HIV-1 (100 $\mu$ g cada 2 semanas, para un total de 4 inmunizaciones).	Inyección con 500 $\mu$ l en el músculo cuadriceps derecho, en macacos.	24 hr	Inducción de respuesta celular y humoral. Usando esta tecnología no se había examinado la respuesta humoral en detalle, y la respuesta celular no se había descrito antes.

#### 14. APENDICE IV. Artículos:

- 1? Rosas, G., **Cruz-Revilla, C.**, Fragoso, G., López-Casillas, F., Pérez, A., Bonilla, M. A, Rosales, R. and E. Sciutto. 1998. *Taenia crassiceps* cysticercosis: humoral immune response and protection elicited by DNA immunization. *Journal of Parasitology* **84(3)**: 516 -523.
- 2? **Cruz-Revilla, C.**, Rosas, G., Fragoso, G., López-Casillas, F., Toledo, A. and E. Sciutto. 1999. *Taenia crassiceps* cysticercosis: protective effect and immune response elicited by DNA immunization. (Aceptado para su publicación al *Journal of Parasitology*).

## TAENIA CRASSICEPS CYSTICERCOSIS: HUMORAL IMMUNE RESPONSE AND PROTECTION ELICITED BY DNA IMMUNIZATION

Gabriela Rosas, Carmen Cruz-Revilla, Gladis Fragoso, Fernando López-Casillas\*, Armando Pérez†, Marco Antonio Bonilla, Ricardo Rosales, and Edda Sciutto‡

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

**ABSTRACT:** The purpose of this study was to evaluate DNA vaccination in cysticercosis prevention by using a *Taenia crassiceps* cDNA of a recombinant antigen (KETc7) that has been reported as protective against murine cysticercosis. The KETc7 cDNA was cloned into the pcDNA3 plasmid alone or with the betaglycan signal peptide sequence (pTc-7 and pTc-sp7, respectively). Positive expression of the pTc-sp7 product was confirmed by transfection of C33 cells and immunofluorescence using sera of mice infected with *T. crassiceps*. Immunization of mice with 3 injections of pTc-sp7 DNA at the higher dose (200 µg) was the most effective to induce antibody with or without bupivacaine. Immunization with pTc-sp7 induced protection against challenge with *T. crassiceps* cysticerci as successfully as previously observed with the KETc7 recombinant protein. Antibodies elicited by DNA immunization with pTc-sp7 specifically reacted with the native protein of 56 kDa previously reported, which is immunolocalized in the tegument of *T. crassiceps* cysticerci. The 56-kDa antigen is also present in *Taenia solium* oncospheres, cysticerci, and adult tissue. The protection induced in DNA-immunized mice and the observation that the injected plasmid remains as an episomic form within muscle cells, encouraged us to continue testing this procedure to prevent *T. solium* cysticercosis.

Cysticercosis caused by *Taenia solium* is a parasitic disease that seriously affects human health. It is responsible for important economic losses in the Third World (Gemmell et al., 1985; Aluja and Vargas, 1988; Larralde et al., 1992). The essential role of pigs as obligatory intermediate hosts in the life cycle of *T. solium* offers the possibility of applying control measures by interfering with transmission in order to decrease the prevalence of pig cysticercosis. During recent years, experimental murine cysticercosis induced by *Taenia crassiceps* has been successfully used as a model to test promising antigens in the prevention of *T. solium* cysticercosis (Sciutto et al., 1990). Recently, a recombinant proline-rich protective peptide (KETc7) from *T. crassiceps* cysticerci shared by *T. solium* was identified to be of interest in the design of a vaccine against pig cysticercosis (Manoutcharian et al., 1996).

Nucleic acid vaccination has been actively developed in the past few years against a variety of infectious agents including viruses, bacteria (Ulmer et al., 1996; Lai et al., 1997), and, more recently, against unicellular parasites (Xu and Liew, 1994; Yang et al., 1995; Gardner et al., 1996). Much less is known about the potential of DNA vaccination to induce a protective immune response against multicellular parasites (Rothel et al., 1997), although the procedure seems to be promising. It needs, however, to be assessed in each case, considering that its applicability will depend on the nature of the host to be immunized and on the type of immune response it generates. Because DNA immunization represents a new and potentially powerful approach for the development of vaccines (Fynan et al., 1993; Ulmer et al., 1993; Robinson, 1995; Wang et al., 1995) we decided to explore this possibility to control cysticercosis. In the present work, we identified the optimal conditions to elicit a specific antibody response and protection against murine cysticercosis by DNA immunization using the KETc7 cDNA as immunogen. The immunolocalization of the KETc7 native protein was also determined in *T. solium* and *T. crassiceps*.

## MATERIALS AND METHODS

### Mice

BALB/cAnN mice, bred in our animal facilities by brother-sister mating, were used, 4–6-wk old.

### Parasites

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

### Plasmid

The pTc-7 was constructed by cloning the cDNA of the KETc7 (305 pb) recombinant antigen of *T. crassiceps* cysticerci previously reported (Manoutcharian et al., 1996) into the Bam H1 and Xho1 restriction sites of the pcDNA3 plasmid (Fig. 1A) (Promega, Madison, Wisconsin) under the control of the CMV early promoter (Fig. 1B). The pTc-sp7 was constructed by adding in frame the sequence of the signal peptide of the betaglycan receptor, also known as the type III transforming growth factor (TGF)-β receptor (López-Casillas et al., 1991). The signal peptide was added at the 5' end of the KETc7 sequence (Fig. 1C), generating the sequence sp7 of 422 bp. The pTc-sp7 construct was verified by DNA sequencing. Plasmids used in this study were isolated in Promega DNA columns (Promega) according to the manufacturer's instructions. DNA was quantified by spectrophotometry at 260 nm and the final concentration of the solution was adjusted to 0.9% NaCl and 1 µg/µl of DNA.

### Cell transfection

pTc-7 and pTc-sp7 plasmids were transfected into C33 cells. For this, C33 cells grown in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) with 10% fetal calf serum were passaged the day before transfection at a density of about  $1.5 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>. The cells were added on poly-L-lysine-treated coverslips. Calcium phosphate precipitates of the pcDNA3, pTc-7, and pTc-sp7 constructions were made by standard procedure (Chandler et al., 1983). After 16 hr the culture medium was changed, and 48 hr later, cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS) and fixed with acetone for indirect immunofluorescence.

### Immunocytochemistry

Sera from noninfected mice and from mice infected with *T. crassiceps* for 3 mo were used as the source for the initial antibody; sera were diluted 1:500 in PBS, plus 0.01% bovine serum albumin (BSA), and added to C33 cells transfected with the plasmids. Bound antibody was developed by a fluorescein isothiocyanate-labeled conjugated goat anti-mouse IgG (FITC-F[ab]')<sub>2</sub> (Zymed, Lab., San Francisco, Califor-

Received 5 December 1997; revised 4 March 1998; 4 March 1998.

\* Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, A.P. 70246, 04510 México, D.F., México.

† Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, A.P.70-318, 04510 México, D.F., México.

‡ Corresponding author.

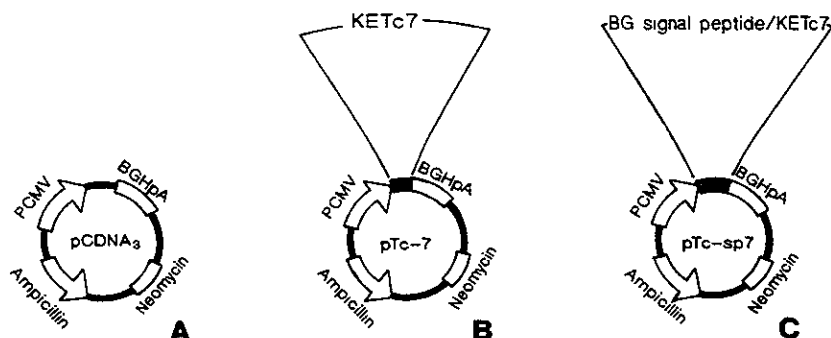


FIGURE 1. DNA constructs. Plasmids pTc-7 (B) and pTc-sp7 (C) derived from pcDNA3 (A) contain a eukaryotic cytomegalovirus immediate early gene (enhancer) and promoter (PCMV) driving the expression of the KETc-7 gene. Transcription is terminated by bovine growth hormone polyadenylation and termination signal (BGHp[A]). Ampicillin resistance gene *a* is also indicated. pTc-sp7 also contains the signal peptide sequence of betaglycan upstream to the KETc-7 sequence.

nia.) (1:1,000). Preparations were observed in an epifluorescent microscope Olympus BH2-RFCA.

#### Immunization protocol

Groups of 10 BALB/cAnN mice were injected with the pcDNA3, pTc-7, and pTc-sp7 plasmids into the quadriceps through the skin at 2 different doses (120 or 200  $\mu$ g in 100  $\mu$ l of saline solution) biweekly for a total of 3 inoculations. To enhance muscle cell uptake of plasmid DNA (Thomason and Booth, 1990), other groups of mice were injected into the same muscle with 100  $\mu$ l of 0.5% bupivacaine hydrochloride (BPH) (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri) in isotonic NaCl 24 hr before DNA injection.

#### Antibody response

Fifteen days after the last immunization before the infection, sera from immunized mice were collected and the antibody level was determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) following the previously described procedure (Larralde et al., 1986). As a source of antigens, soluble *T. crassiceps* cysticerci antigens were used (Larralde et al., 1989). Briefly, Nunc-Immuno plates (NUNC Brand Products, Copenhagen, Denmark) were treated with 10  $\mu$ g of *T. crassiceps* antigen per well diluted in carbonate buffer, pH 9.6, and incubated 1 hr at 37 C. Plates were washed 3 times for 5 min with 200  $\mu$ l/well of 0.15 M saline solution containing 0.05% v/v Tween 20 and blocked with 200  $\mu$ l PBS containing 1% w/v BSA and 0.1% v/v Tween 20 for 60 min at room temperature before washing again. Serum samples diluted 1:50 in PBS and 0.1% Tween-20 were added and incubated for 1 hr at 37 C, followed by the addition of anti-mouse IgG coupled to alkaline phosphatase (Sigma), which was developed with *p*-nitrophenyl phosphate (Sigma). Plates were washed 3 times after each reaction step. Optical density readings at 405 nm were carried out in a Humareader ELISA processor (Human Gessellschaft für Biochemica und Diagnostica, Taunusstein, Germany).

#### Mice infection

Fifteen days after the last immunization, control and mice immunized either with pcDNA3 or pTc-sp7 were injected i.p. with 10 small (2 mm in diameter), nonbudding *T. crassiceps* larvae suspended in PBS. Thirty days after infection, mice were killed and *T. crassiceps* cysts within the peritoneal cavity were counted.

#### Immunoelectrotransfer blot (EITB)

Electrophoresis and immunoblotting using *T. crassiceps* and *T. solium* antigens were performed as described elsewhere (Larralde et al., 1989). Sera from nonimmunized and immunized mice were diluted 1:20 in 0.05% PBS-Tween plus 1% v/v BSA and 5% v/v light milk. As a positive control, sera from *T. crassiceps*-infected mice were used. Bound antibodies were detected by incubating each strip in streptavidin-biotinylated peroxidase conjugate (Amersham Laboratories, Buckinghamshire, U.K.) diluted 1:2,000 for 30 min at room temperature. As a

substrate, 0.5 mg/ml *o*-chloronaphthol with 3% v/v H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in PBS, pH 7.3/CH<sub>3</sub>OH (5:1) was used.

#### Immunolocalization of KETc7 protein

Host proteins joined to *T. crassiceps* and *T. solium* cysticerci were removed. For this process, cysticerci were placed on ice-cold PBS and the vesicular fluid was removed. Then, cysticerci were incubated with glycine buffer (50 mM glycine-HCl, pH 2.5; 0.1% Triton X-100; 0.15 mM NaCl) for 30 second, and pH was restored using Tris-HCl, pH 9. Cysticerci were extensively washed with cold PBS, embedded in Optimun-Cutting-Temperature Compound (O.C.T. Compound, Miles, Inc., California), and frozen at -70 C. Similar procedures were used to prepare eggs and adult *T. solium* tissues. Six-micrometer sections were cut with a cryostat, placed on poly-L-lysine-treated microslides, air-dried for 30 min, fixed in acetone for 10 min, and air-dried for 15 min at room temperature. Slides were rehydrated and blocked using 1% BSA in PBS plus 0.1% Triton X-100, pH 7.2 for 1 hr. For cysticerci slides, a second blocking was performed with sheep anti-mouse IgG whole antibody (Amersham) diluted 1:100 in PBS plus 0.1% BSA and incubated 1 hr at 4 C. Slides of adults and eggs were incubated 1 hr at 4 C with horse serum diluted 1:100 in PBS plus 0.1% BSA as a second blocking. Solutions were removed and the slides were incubated with the appropriate sera diluted at 1:10,000 in PBS and 0.1% BSA, from noninfected (negative control), infected (positive control), or pTc-sp7 immunized mice, overnight at 4 C. Slides were rinsed with PBS and then overlaid with FITC-F(ab)<sub>2</sub> goat anti-mouse IgG (Zymed, San Francisco, California) diluted 1:50 for 1 hr in darkness at room temperature. Slides were washed and mounted with Aquatek, polyvinyl alcohol (Merck, Darmstadt, Germany). Preparations were analyzed in an epifluorescence microscope Olympus BH2-RFCA. Slides were prepared in triplicate in a blind protocol and the fluorescence patterns were reproducible.

#### Detection of plasmid DNA in the muscle

Quadriceps were separated from mice and carefully minced with scissors. Muscle pieces were incubated in DMEM medium in the presence of DNase I (100  $\mu$ g/ml) for 1 hr at 37 C. After the enzymatic treatment, the suspension was washed once with PBS and incubated with trypsin (0.25%) for 30 min at 37 C. Recovered cells were washed with PBS resuspended in Hirt buffer (Hirt, 1967) and incubated for 20 min at room temperature. NaCl to a final concentration of 1 M was added to the suspension and incubated for 8 hr at 4 C. After centrifugation at 14,000 rpm (1 hr, 4 C), the supernatant (containing episomal DNA) and the pellet (genomic DNA) were phenol/CHCl<sub>3</sub> extracted and precipitated at -20 C for DNA detection by polymerase chain reaction (PCR) analysis. DNA was amplified by PCR using as sense primer: 5'GATTTCGGCAGCAGCATTATGCAGCCGCAT3' and 3'CATAAGATCTCTTCTATCTTCTGGTTCCAT5' as the antisense. These oligonucleotides correspond to bases 1-30 of the 5' end and 276-305 of the 3' end of the KETc7 sequence, and therefore, they must amplify a fragment of 305 bp in the intact pTc-sp7 plasmid. To label the PCR reac-

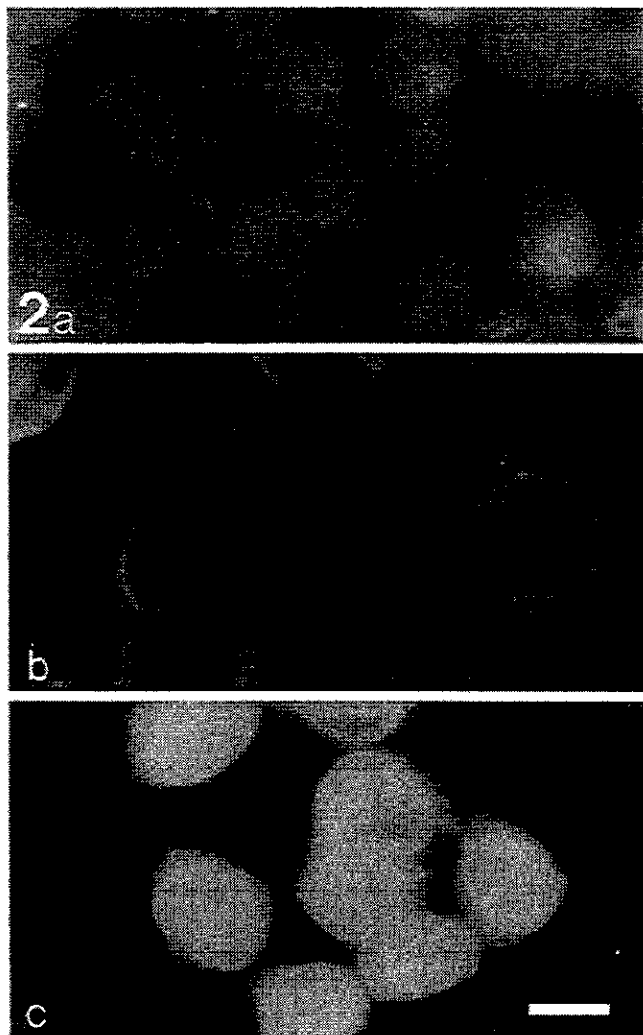


FIGURE 2. Analysis of KETc7 expression by immunofluorescent staining. C33 cells transfected with 10  $\mu$ g of pcDNA3 (a), pTc-7 (b), and pTc-sp7 (c) were stained 48 hr after transfection by indirect immunofluorescence. Sera from *Taenia crassiceps*-infected mice were used as a primary antibody. Bar = 40  $\mu$ m.

tions, 30 cycles of 94 C for 1 min, 57 C for 2 min, and 72 C for 30 sec were performed in the presence of [ $^{32}$ P]dCTP (Amersham). The radioactive PCR product was resolved on a 5% polyacrylamide gel and exposed to autoradiography for 48 hr at  $-70$  C using Kodak film.

#### Statistical analysis

Statistical comparisons between groups were carried out by the Kruskal-Wallis and Dunn's multiple comparisons test.

## RESULTS

### Expression of the KETc7 protein in C33 cells

Cells were transfected with pcDNA3, pTc-7, and pTc-sp7 plasmids, and expression of KETc7 was determined by indirect immunofluorescence using sera of mice infected with *T. crassiceps*. Clear differences were observed between pTc-7- and pTc-sp7-transfected cells. The former showed small granules, randomly distributed, throughout the cytoplasm (Fig. 2b) and the latter showed a higher level of immunofluorescence, granular and diffuse, probably including the nuclear envelope and

the plasma membrane (Fig. 2c). Fluorescence was not observed in cells transfected with the plasmid pcDNA3 (Fig. 2a) or in cells transfected with constructions and developed with sera from noninfected mice (data not shown).

### Antibody response induced by DNA immunization

To identify the optimal conditions for the induction of immunity, levels of antibodies produced by DNA inoculation were determined by ELISA. Sera from control mice inoculated with 100  $\mu$ l of saline or different concentrations of pcDNA3 in presence or absence of BPH did not show reactivity against cysticercal antigens. Mice injected with either pTc-7 or pTc-sp7 plasmids developed specific antibodies, although the response differed. In 5 of 7 mice, increased levels of antibodies were generated when injected with the plasmid pTc-sp7 at the higher concentration (200  $\mu$ g), as well as in 4 out of 7 with the lower concentration (120  $\mu$ g) in the presence or absence of BPH. In contrast, a weak antibody response was observed in mice inoculated with pTc-7 when BPH was included (Fig. 3).

The specificity of the antibody response was determined by western blot. Sera from mice immunized with the pTc-sp7 plasmid strongly recognized a protein of 56 kDa of *T. crassiceps* cysticerci (Manoutcharian et al., 1996), which corresponded to the expected molecular weight of the KETc7 protein band from the *T. solium* fraction that was also detected (Fig. 4).

### Immunolocalization of KETc7 protein

Specific antibodies induced by DNA immunization with pTc-sp7 were employed to locate the native protein in *T. crassiceps* and *T. solium* cysticerci and in *T. solium* oncospheres and tissue. Sera from DNA immunized mice were obtained 15 days after the last of 3 injections of 200  $\mu$ g of DNA from the orbital sinus. Control sera were obtained from the same mice before DNA immunization. In *T. crassiceps* cysticerci, immunofluorescence was restricted to the tegument (T) (Fig. 5e) and in *T. solium* cysticerci to the vestibular wall and the tegument of the fold of the spiral canal (Fig. 5f). Interestingly, the KETc7 antigen was intensively detected in the oncosphere of the egg (Fig. 6e) and in the tegument of the *T. solium* adult (Fig. 6f). When sera from infected mice were used, all structures were fluorescent (Figs. 5c-d, 6c-d); in contrast, only low fluorescence was observed with sera from non-treated mice (Figs. 5a, b, 6a, b).

### Mice protection after DNA immunization

The protective effect induced by DNA immunization was determined by counting the number of parasites after challenge. As Table I shows, the female mice immunized with pTc-sp7 carried a significantly reduced number of cysticerci ( $32.6 \pm 17.1$ ) compared to control mice immunized only with saline ( $78.8 \pm 19.7$ ). Male mice immunized with pTc-sp7 were completely protected, whereas in only 2 out of 5 pcDNA3 immunized mice no cysticerci were found.

### Plasmid localization after immunization

Due to the health regulations, we examined the localization of plasmid DNA in the muscle cells 2 wk after the last immunization. For this purpose, we prepared genomic and eposomal DNA from the injected muscles of the immunized mice

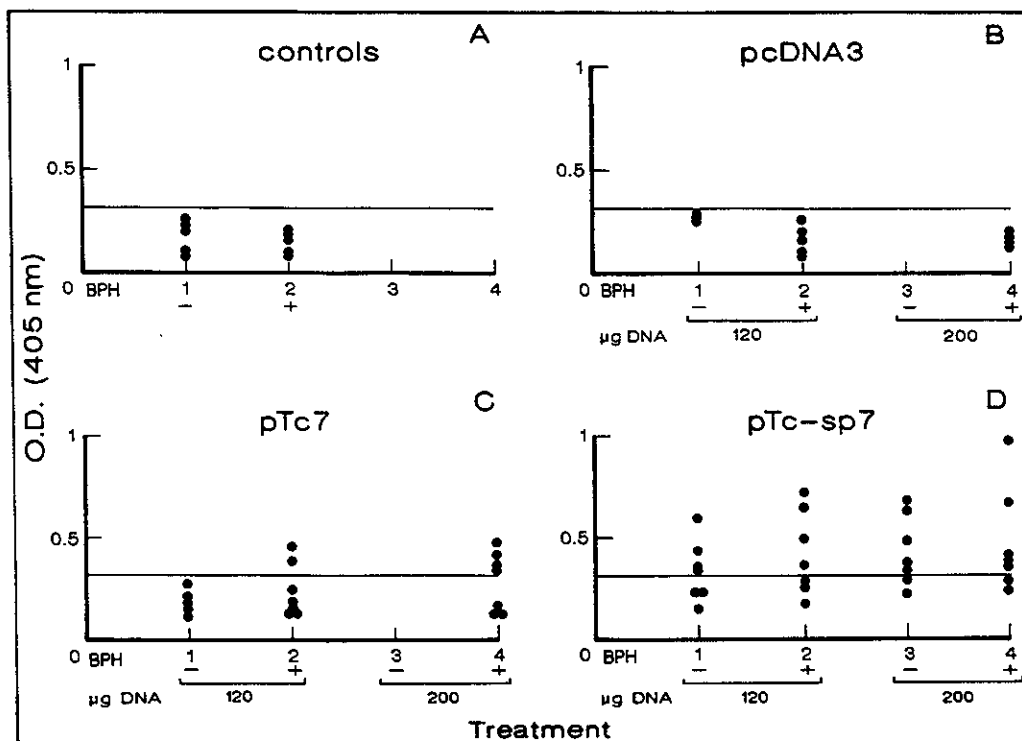


FIGURE 3. Individual antibody response induced after DNA inoculation. IgG anti-cysticercal antibodies were measured by the ELISA method using *Taenia crassiceps* total antigens. Each point represents the optical density (OD) detected in each mouse. A serum sample was considered to be positive when its ELISA OD reading exceeded the mean negative control value + 2 SDs. Control mice were intramuscularly injected with saline solution, BPH<sup>-</sup> (1A) or BPH<sup>+</sup> (2A). pcDNA3 (B), pTc-7 (C), and pTc-sp7 (D) show the antibody response of individual mice immunized with 120 µg of DNA, BPH<sup>-</sup> (1), or BPH<sup>+</sup> (2) and with 200 µg of DNA, BPH<sup>-</sup> (3), or BPH<sup>+</sup> (4).

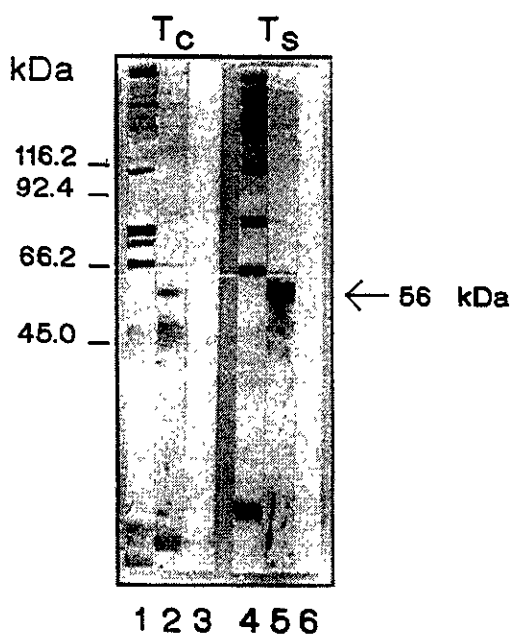


FIGURE 4. Identification of a native protein of 56 kDa in the total extract from *Taenia crassiceps* (Tc) and *Taenia solium* (Ts) cysticerci by western blot. Strips were developed with pool sera from infected mice (1, 4), pool sera from the highest OD pTc-sp7 immunized mice (2, 5), and pool sera from nontreated mice (3, 6). The arrow shows the band of interest.

and used it to detect the plasmid sequence by PCR procedures. The plasmid DNA was found mainly as an episomic form in all animals injected; no plasmid was detected in the genomic fraction after PCR analysis (Fig. 7). These results show that the procedure used with this plasmid is able to stimulate the immune system.

### DISCUSSION

In the present study, we demonstrate the induction of a specific antibody response and protection induced by DNA immunization with a plasmid carrying the cDNA coding for the previously reported KETc-7 protective antigen against *T. crassiceps* murine cysticercosis as previously reported (Manoutcharian et al., 1996). Comparative studies reported herein show that, although it is possible to obtain a degree of detectable antibody response by administration of pTc-7, a successful response was obtained when the signal peptide of a cell surface betaglycan receptor (López-Casillas et al., 1991) was added to the construction (pTc-sp7) (Fig. 3). The increased antibody response, as well as the higher number of seroconverted mice, could be in accordance with the increased expression observed when cells were transfected in vitro with pTc-sp7 versus the expression observed when they were transfected with pTc-7 (Fig. 2). In fact, cells transfected with the construction pTc-7 were lightly fluorescent with small granules distributed randomly throughout the cytoplasm (Fig. 2b), whereas the signal peptide sequence not only modified the pattern of distribution of the peptide but also effectively increased its level of expression



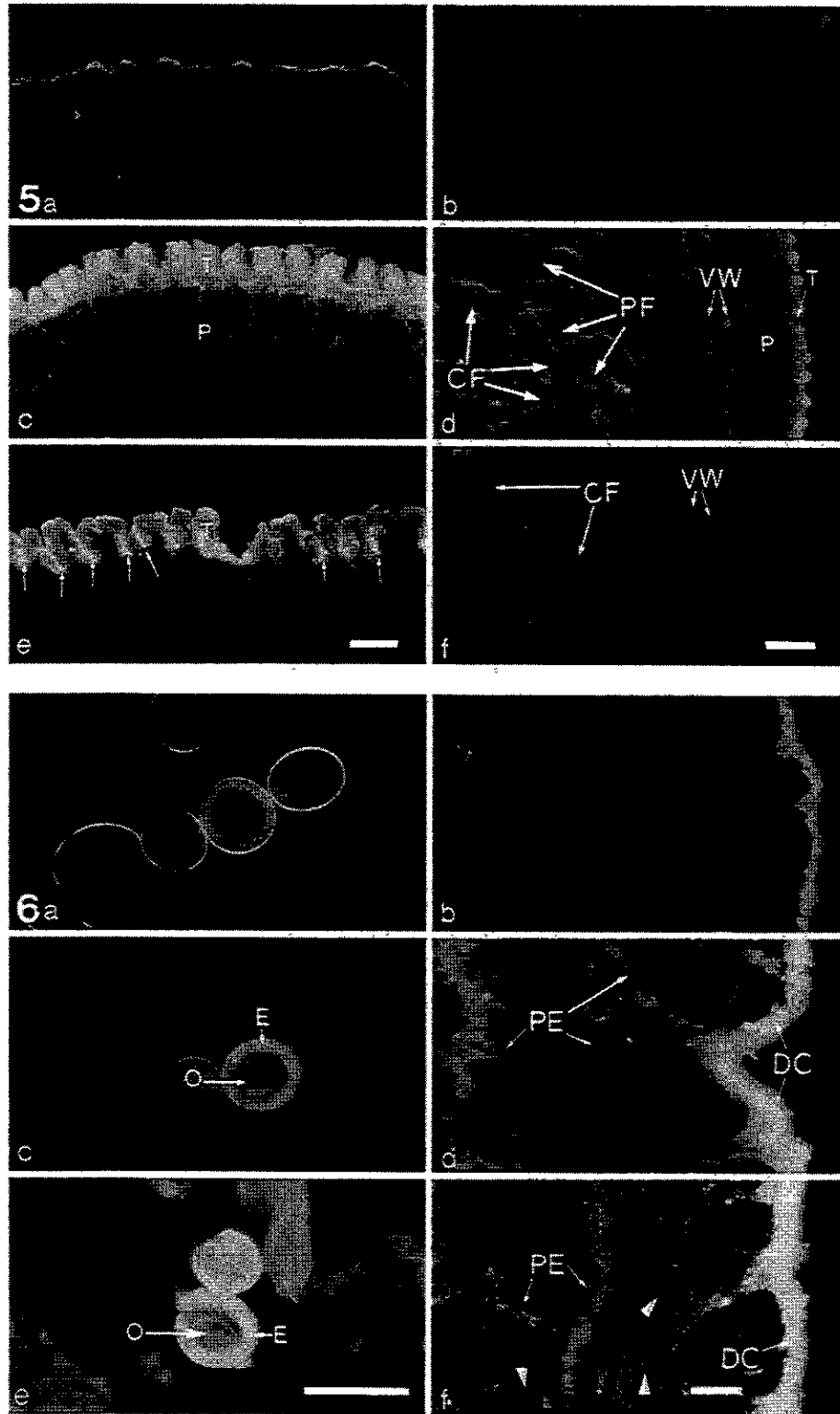


FIGURE 5. Immunofluorescence staining of *Taenia crassiceps* (a, c, e) and *Taenia solium* (b, d, f) cysticerci. The sections were incubated with sera from nontreated mice (a, b), *Taenia crassiceps*-infected mice (c, d), and pTc-sp7-immunized mice (e, f). *Taenia crassiceps* tegument (T) shows a protruding and intensively positive wall surface and the parenchyma (P) is evident (c). In *T. solium* (d) the T, P, vestibular wall (VW), parenchymal folds (PF), and cuticular folds of the spiral canal (CF) are evident. In 5e, only T was positive, particularly the grooves located between the protuberances (arrows). In 5f, only VW and CF were stained positively. Bar = 40  $\mu$ m.

FIGURE 6. Immunofluorescence of eggs (a, c, e) and adult tegument (b, d, f) of *Taenia solium*. The sections were stained with sera from nontreated (a, b), from *T. crassiceps*-infected (c, d), and pTc-sp7-immunized mice (e, f). In 6c, the oncosphere (O) is intensively stained and in 6d the distal cytoplasm (DC) and some structures of the perinuclear cytoplasm region, like the protoplasmic extensions (PE) of the tegumental cells are positive. In 6e and 6f, O, PE and DC are more fluorescent than the positive control (c, d). In 6f, PE contain structures that are probably the rhabdiform organelles (arrowhead). Bar = 40  $\mu$ m.

TABLE I. Protective response induced against *Taenia crassiceps* cysticercosis by DNA immunization.

Treatment*	Females		Males	
	Number of parasites (mean ± SD)	% Protection	Number of parasites (mean ± SD)	% Protection
Saline solution	78.8 ± 19.7	—	6.14 ± 1.55	—
pcDNA3	52.5 ± 14.3	33.37	4.0 ± 4.85	34.4
pTc-sp7	32.6 ± 17.1	58.63	0	100

\* Eight male and female mice per group were intramuscularly injected 3 times with 200 µg of DNA per mouse or with isotonic saline solution. Fifteen days after the last immunization, mice were infected with 10 cysticerci each. Cysticerci were counted after 30 days of infection. The number of cysticerci found in female mice vaccinated with pTc-sp7 was statistically lower ( $P < 0.001$ ) than in those who received isotonic saline solution (ISS). No significant differences were observed between ISS and pcDNA3 and between pcDNA3 and pTc-sp7. Although no significant differences were observed between control and pcDNA3-immunized male mice, in 2 out of 5 pcDNA3-immunized mice no cysticerci were found. All pTc-sp7-immunized male mice were completely protected.

(Fig. 2c). The pTc-sp7 construct should direct the expression of a secretory protein; thus, the immunofluorescence pattern may be due to molecules in transit. Interestingly, the immunization with pTc-sp7 not only increased the number of seroconverted mice, but its effect was also independent of a previous inoculation with BPH (Fig. 3). Bupivacaine has been reported to improve DNA uptake by cells (Thomason and Booth, 1990) during the degeneration and regeneration of muscle fibers (Davis et al., 1995). In addition, it produces rapid destruction of striated muscle fibers followed by phagocytosis (Benoit and Belt, 1970). It is probable that the effective expression of the KETc-7 protein by the use of the pTc-sp7 construction bypassed the requirement of BPH in the treated mice. In contrast, in the case of mice immunized with pTc-7, seroconversions were obtained only when mice were pretreated with the BPH. This result points to the relevance of the increased inflammatory response induced by BPH that allows the antigen be detected by the immune system.

Figure 3 shows that the level of antibodies generated in this study was highly variable among animals and was relatively low in most mice. This finding is in accordance with another report in which only 1 of 15 sheep injected with pcDNA3-45W produced serum antibody to a level that would be considered

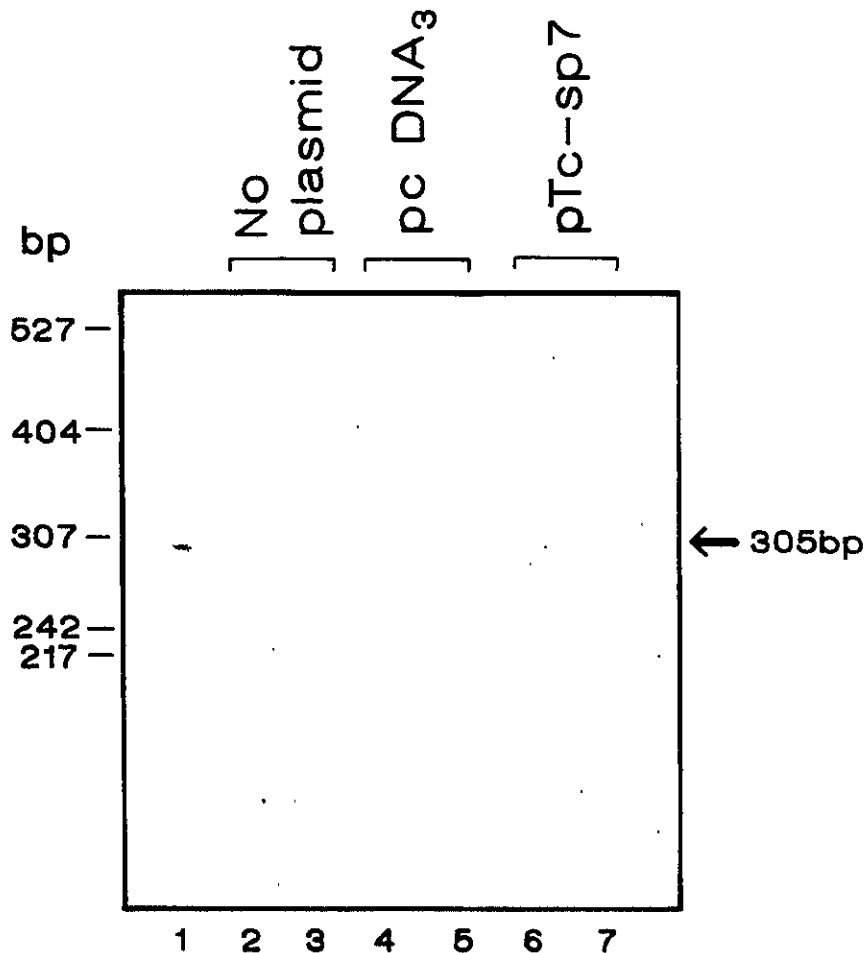


FIGURE 7. Plasmid detection within muscle cells by PCR: plasmid pTc-sp7(lane 1), chromosomal DNA from untreated, pcDNA3 and pTc-sp7 immunized mice (lane 2, 4 and 6, respectively), and extrachromosomal DNA from untreated, pcDNA3, and pTc-sp7-immunized mice (lanes 3, 5, and 7, respectively). Chromosomal and extrachromosomal fractions were isolated by using the Hirt method.

protective (Rothel et al., 1997). However, whereas in *Taenia ovis* cysticercosis, protection correlates with serum antibody levels, the antibody response in *T. crassiceps* cysticercosis induced by vaccination is not closely related to protection (Sciutto et al., 1995). In fact, no correlation was found between the antibody response and the individual protection observed (data not shown). Herein, we show a significant level of protection induced by the immunization with pTc-sp7 (58.6% in females and 94.7% in males). Although the mechanism underlying this protection is not yet known, we are now studying the cellular immune response related to this protection. Interestingly, the immunization with pcDNA3 also reduced by almost 34% the number of expected parasites. Similar effects have been previously observed by Lin et al. (1998), probably due to a nonspecific adjuvant effect of the plasmid DNA (Lathe et al., 1987; Roman et al., 1997). In fact, it has been observed that pcDNA3 has short immunostimulatory DNA sequences that contain CpG dinucleotides flanked by 5' purines and 2, 3' pyrimidines found in the ampicillin resistance gene, which induce B, T, and natural killer cells to secrete cytokines that favor a polyclonal immune response (Klinman et al., 1996; Sato et al. 1996).

In a previous study, we reported that the immunization with KETc7 recombinant antigen induced a similar level of protection (51.75%) in the murine model of cysticercosis to that found here (58.6%) by DNA immunization. Thus, the results reported in the present study indicate that DNA immunization is at least as efficient as the conventional procedures using KETc7 protein to immunize (Manoutcharian et al., 1996).

The specificity of antibodies induced by pTc-sp7 immunization was tested by immunoelectrotransference. As Figure 4 shows, antibodies recognized a 56-kDa *T. crassiceps* native antigen as previously reported (Manoutcharian et al., 1996) and an antigen of similar molecular weight in *T. solium*. Considering that antibodies specifically detect the expected antigen, they were used to immunolocalize the native antigen in both parasites. Several points merit comment regarding the localization of KETc7 antigen in the parasite: First, antibodies recognized a major antigen component present in *T. crassiceps* cysticerci. Second, and most important, is the strong presence of the antigen in the oncosphere because these are thought to be most susceptible to immune attack (Rajasekariah et al., 1982). Although it has been reported that several antigens are stage specific (Harrison and Parkhouse, 1986), KETc7 antigen is not the case. Interestingly, we found that this protein is highly conserved in the different stages of *T. solium*. Its presence in the cysticerci also speaks in favor of its availability to the immune system, especially in the early metacystode stage.

Finally, the protection induced by DNA immunization using pTc-sp7 and the presence of the plasmid in the nucleoplasm, rather than integrated into the host-cell genome (Fig. 6), gives us some optimism as to the possible use of this construction for vaccine purposes, although improvements are needed before progressing to test the system in swine.

#### ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank, Miriam Guido, Martha Ustarroz, Diana Millan, Ma. Luisa Rodriguez, Gerardo Arrellin, Georgina Díaz Herrera, and Nelly Villalobos for technical support, and Karen Manoutcharian and Marisela Hernández for the pTc-7 construc-

tion. Isabel Pérez Montfort corrected the English version of the manuscript. This study was supported by grant IN 208395 from the Dirección General de Asuntos de Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México, CONACyT, México, The European Union INCO-DC STD3 Programme, and Programa Universitario de Investigación en Salud (PUIS).

#### LITERATURE CITED

- ALUJA, A., AND G. VARGAS. 1988. The histopathology of porcine cysticercosis. *Veterinary Parasitology* **28**: 65-77.
- BENOIT, P. W., AND W. D. BELT. 1970. Destruction and regeneration of skeletal muscle after treatment with a local anesthetic, bupivacaine (Marcaine®). *Journal of Anatomy* **107**: 547-556.
- CHANDLER, V. L., B. A. MALER, AND K. R. YAMAMOTO. 1983. DNA sequences bound specifically by glucocorticoid receptor in vitro render a heterologous promoter hormone responsive in vivo. *Cell* **33**: 89-499.
- DAVIS, H. L., M. L. MICHEL, AND R. G. WHALEN. 1995. Use of plasmid DNA for direct gene transfer and immunization. *Annals of the New York Academy of Science* **27**: 21-29.
- FREEMAN, R. S. 1962. Studies on the biology of *Taenia crassiceps* (Zeder, 1800) (Rudolphi, 1810). *Canadian Journal of Zoology* **40**: 969-990.
- FYNAN, E. F. R. G., WEBSTER, D. H. FULLER, J. R. HAYNES, J. C. SANTORO, AND H. L. ROBINSON. 1993. DNA vaccines: protective immunizations by parenteral, mucosal, and gene-gun inoculations. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **90**: 11478-11482.
- GARDNER, M. J., D. L. DOOLAN, R. C. HEDSTROM, R. WANG, M. SEDEGAH, R. A. GRAMZINSKI, J. C. AGUIAR, H. WANG, M. MARGALITH, P. HOBART, AND S. L. HOFFMAN. 1996. DNA vaccines against malaria: immunogenicity and protection in a rodent model. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **85**: 1294-1300.
- GEMMELL, M., Z. MATYAS, Z. PAWLOWSKI, E. SOULSBY, C. LARRALDE, G. S. NELSON, AND B. ROSICKY. 1985. Guidelines for surveillance prevention and control of taeniasis/cysticercosis. VPH/83. 49. World Health Organization Geneva, Switzerland.
- HARRISON, L. J., AND R. M. PARKHOUSE. 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.
- HIRT, B. 1967. Selective extraction of polyoma DNA from infected mouse cultures. *Journal of Molecular Biology* **26**: 365-369.
- KLINMAN, D. M., A. K. YI, S. L. BEAUCAGE, J. CONOVER, AND A. M. KRIEG. 1996. CpG motifs present in bacterial DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12, and interferon  $\gamma$ . *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **93**: 2879-2883.
- LAI, W. C., S. P. PAKES, K. REN, Y. S. LU, AND M. BENNETT. 1997. Therapeutic effect of DNA immunization of genetically susceptible mice infected with virulent *Mycoplasma pulmonis*. *Journal of Immunology* **158**: 2513-2516.
- LARRALDE, C., J. P. LACLETTE, C. S. OWEN, I. MADRAZO, M. SANDOVAL, R. BOJALIL, E. SCIUTTO, L. CONTRERAS, J. ARZATE, M. L. DÍAZ, T. GOVEZENSKY, R. M. MONTOYA, AND F. GOODSAY. 1986. Reliable serology of *Taenia solium* cysticercosis with antigens from cyst vesicular fluid: ELISA and haemagglutination tests. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **35**: 965-973.
- , R. M. MONTOYA, E. SCIUTTO, M. L. DÍAZ, T. GOVEZENSKY, AND E. COLTORTI. 1989. Deciphering western blots of tapeworm antigen (*Taenia solium*, *Echinococcus granulosus*, and *Taenia crassiceps*) reacting with sera from neurocysticercosis and hydatid disease patients. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **40**: 282-290.
- , A. PADILLA, M. HERNANDEZ, T. GOVEZENSKY, E. SCIUTTO, G. GUTIERREZ, R. TAPIA-CONYER, B. SALVATIERRA, AND J. SEPULVEDA. 1992. Seroepidemiología de la cisticercosis en México. *Salud Pública de México* **34**: 197-210.
- LATHE, R., M. P. KIENY, P. GERLENGER, P. CLERANT, I. GUIZANI, F. CUZIN, AND P. CHAMBON. 1987. Tumor prevention and rejection with recombinant vaccinia. *Nature* **326**: 878-880.

- LIN, Y. L., L. K. CHEN, C. L. LIAO, C. T. YEH, S. H. MA, J. L. CHEN, Y. L. HUANG, S. S. CHEN, AND H. Y. CHIANG. 1998. DNA immunization with Japanese encephalitis virus nonstructural protein NS1 elicits protective immunity in mice. *Journal of Virology* **72**: 191–200.
- LÓPEZ-CASILLAS, F., S. CHEIFETZ, J. DOODY, J. L. ANDRES, W. S. LANE, AND J. MASSAGUÉ. 1991. Structure and expression of the membrane proteoglycan betaglycan, a component of the TGF- $\beta$  receptor system. *Cell* **67**: 785–795.
- MANOUTCHARIAN, K., G. ROSAS, M. HERNANDEZ, G. FRAGOSO, A. ALUJA, N. VILLALOBOS, L. F. RODARTE, AND E. SCIUTTO. 1996. Cysticercosis: Identification and cloning of protective recombinant antigens. *Journal of Parasitology* **82**: 250–254.
- RAJASEKARIAH G. R., M. D. RICKARD, G. F. MITCHELL, AND R. F. ANDERS. 1982. Immunization of mice against *Taenia taeniaeformis* using solubilized oncospherical antigens. *International Journal for Parasitology* **12**: 111–116.
- ROBINSON, A. 1995. DNA-based vaccines: New possibilities for disease prevention and treatment. *Journal of the Canadian Medical Association* **152**: 1629–1632.
- ROMAN M., E. M. OROZCO, J. S. GOODMAN, M. D. NGUYEN, Y. SATO, R. ARASH, S. R. KORNBLUTH, D. D. RICHMAN, D. A. CARSON, AND E. RAZ. 1997. Immunostimulatory DNA sequences function as T-helper-1-promoting adjuvants. *Nature Medicine* **3**: 849–854.
- ROTHEL, J. S., J. G. WATERKEYN, R. A. STRUGNELL, P. R. WOOD, H. F. SEOW, J. VADOLAS, AND M. N. LIGHTOWLERS. 1997. Nucleic acid vaccination of sheep: Use in combination with a conventional adjuvanted vaccine against *Taenia ovis*. *Immunology and Cell Biology* **75**: 41–46.
- SATO, Y., M. ROMAN, H. TIGHE, D. LEE, M. CORR, M. D. NGUYEN, G. J. SILVERMAN, M. LOTZ, D. A. CARSON, AND E. RAZ. 1996. Immunostimulatory DNA sequences necessary for effective intradermal gene immunization. *Science* **273**: 352–354.
- SCIUTTO, E., A. ALUJA, G. FRAGOSO, L. F. RODARTE, M. HERNÁNDEZ, N. VILLALOBOS, A. PADILLA, N. KEILBACH, M. BACA, T. GOVEZENSKY, S. DÍAZ, AND C. LARRALDE. 1995. Immunization of pigs against *Taenia solium* cysticercosis. Factors related to effective protection. *Veterinary Parasitology* **60**: 53–67.
- , G. FRAGOSO, L. TRUEBA, D. LEMUS, R. M. MONTOYA, M. L. DIAZ, T. GOVEZENSKY, C. LOMELI, G. TAPIA, AND C. LARRALDE. 1990. Cysticercosis vaccine: Cross-protecting immunity with *Taenia solium* antigens against experimental murine *Taenia crassiceps* cysticercosis. *Parasite Immunology* **12**: 687–696.
- THOMASON, D. B., AND F. W. BOOTH. 1990. Stable incorporation of a bacterial gene into adult rat skeletal muscle in vivo. *American Journal of Physiology* **258**: C578–C581.
- ULMER, J. B., R. R. DECK, R. R., A. YAWMAN, A., FRIEDMAN, C. DEWITT, D. MARTÍNEZ, D. L. MONTGOMERY, J. J. DONNELLY, AND M. A. LIU. 1996. DNA vaccines for bacteria and viruses. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **397**: 49–53.
- , J. J. DONNELLY, S. E. PARKER, G. H. RHODES, P. L. FELGNER, V. J. DWARKI, S. H. GROMKOUSKI, R. R. DECK, C. M. DEWITT, A. FRIEDMAN, L. A. HAWE, K. R. LEANDER, D. MARTÍNEZ, H. C. PERRY, J. W. SHIEVER, D. L. MONTGOMERY, AND M. A. LIU. 1993. Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science* **259**: 1745–1749.
- WANG, B., J. D. BOYER, K. E. UGEN, V. SRIKANTAN, V. AYYAROO, M. G. AGADJANYAN, W. V. WILLIAMS, M. NEWMAN, L. CONEY, AND R. CARRANO. 1995. Nucleic acid-based immunization against HIV-1: Induction of protective in vivo immune responses. *AIDS* **9**: S159–S170.
- XU, D., AND F. Y. LIJEW. 1994. Genetic vaccination against leishmaniasis. *Vaccine* **12**: 1534–1536.
- YANG, W., G. J. WINE, AND D. P. MCMANUS. 1995. Antibodies to *Schistosoma japonicum* (Asian bloodfluke) paramyosin induced by nucleic acid vaccination. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **212**: 1029–1039.

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

17 November 1998

Dr. Edda Sciutto  
Departamento de Inmunología  
Instituto de Investigaciones Biomédicas  
UNAM  
A.P. 70228  
C.P. 04510  
México D.F., MEXICO

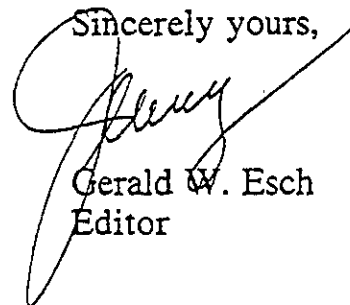
Hi Edda,

Enclosed are two reviews of your ms., GE-1704, and a cover letter from an Associate Editor, Dr. Stephen Kayes. All agree that your study has real significance. However, Dr. Kayes agrees with referee #1 that the experiments need to be repeated. Their contention is that additional work will certainly strengthen the work and add to the significance of the research. Having read the paper and given it careful consideration (even though I am not into this area of research), I am inclined to agree with them. Toward this end, I would ask that you perform the work and resubmit the paper which we will then be most pleased to publish. Toward this end, I have marked a copy in blue pencil. Also enclosed is a set of guidelines to use in preparing the final draft of the paper.

I hope all goes well for you folks and that Carlos has made good use of the cookbook.

With best wishes, I am

Sincerely yours,



Gerald W. Esch  
Editor

GWE/vh  
Encl.

Telephone (336) 758-4487 FAX (336) 758-6008  
Email: [esch@wfu.edu](mailto:esch@wfu.edu)

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

Running Head: Cruz-Revilla et al.-PROTECTIVE IMMUNITY BY DNA IMMUNIZATION

***TAENIA CRASSICEPS* CYSTICERCOSIS: PROTECTIVE EFFECT AND IMMUNE  
RESPONSE ELICITED BY DNA IMMUNIZATION**

**Carmen Cruz-Revilla, Gabriela Rosas, Gladis Fragoso, Fernando López-Casillas\*, Andrea  
Toledo, Carlos Larralde, and Edda Sciutto**

Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, A.P.

70228, Ciudad Universitaria, 04510, México, D.F., MEXICO. E-mail: edda@servidor.unam.mx

**ABSTRACT:** The nucleotide sequence of a protective recombinant antigen of *Taenia crassiceps* cysticerci present in all stages of *Taenia solium* (KETc7), cloned into pcDNA3 plasmid with the signal peptide sequence of the betaglycan receptor (pTc-sp7), has been shown effective in protecting mice against experimental infection of *Taenia crassiceps*. To further explore the possibilities of this form of immunization and the immune response induced, mice were injected intramuscularly (i.m.) or intradermally (i.d.) with 3 doses of pTc-sp7. Similar levels of resistance were found using either i.m. or i.d. immunization. Spleen cells from i.d. and i.m. DNA immunized mice induced a specific T-cell response to *T. crassiceps* antigens and to a synthetic peptide from the immunogen itself (GK-1). Proliferated cells were especially enriched in CD8<sup>+</sup> CD4<sup>-</sup> T-lymphocytes. A clear increase in the percent of CD3<sup>+</sup> cells that produce gamma interferon and interleukin-2 was detected when measuring the intracellular cytokine production, an indication of the pTc-sp7 capacity to induce an effective cellular response. These results provide encouraging information on the use of KETc7 in the prevention of cysticercosis as well as a first insight into the characterization of the immune response induced by pTc-sp7 that hints to the relevance of cellular immunity in protection.

*Taenia solium* cysticercosis is an important socioeconomic problem in non-developing countries of Latin America, Asia, and Africa, where poverty and lack of hygiene prevail and favour transmission. In humans, the most severe form of the disease is neurocysticercosis (Sotelo et al., 1996). Prevalence is low in developed countries, but due to immigrants from endemic areas in Mexico and Central American countries, an increase has been reported in the United States (Loo and Braude, 1982; McCormick et al., 1985; Grisolia and Wiederholt, 1982; Richards and Schantz, 1991).

Pig vaccination studies have been initiated (Molinari et al., 1983, 1993; Nascimento et al., 1995; Sciutto et al., 1995) in order to interrupt the life cycle of the parasite by preventing pigs from acquiring the larval stage. We identified a set of recombinant antigens in a *Taenia crassiceps* cDNA library shared by *T. solium* (Manoutcharian et al., 1996). Four of these peptides induced high levels of protection in an experimental murine model of cysticercosis caused by *T. crassiceps*, a model that has been successfully used to identify promising antigens in the prevention of *T. solium* cysticercosis (Sciutto et al., 1990, 1995). DNA vaccines (Connell et al., 1993; Mor et al., 1995; Doolan et al., 1998) have been little explored in control of multicellular parasites (Yang et al., 1995; Rothel et al., 1997). We recently reported encouraging data with DNA vaccination against murine cysticercosis when using the nucleotide sequence of the protective recombinant antigens previously identified (Manoutcharian et al., 1996). Using the nucleotide sequence of 1 of these antigens (KETc7) we prepared an immunogenic KETc7 cDNA construction (pTc-sp7) that induced effective protection, specific antibodies that reacted with the native protein of *T. crassiceps* and with the tapeworm and oncospheres of *T. solium* (Rosas et al., 1998). The present work was carried out to further explore DNA immunization in cysticercosis



prevention using the murine model of cysticercosis and to more fully characterize the protective immune response elicited by this form of immunization.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Mice**

BALB/cAnN female mice, a syngenic strain previously characterized as susceptible to murine cysticercosis (Fragoso et al., 1998), was used. Original stocks were purchased from Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, and then bred and kept in our animal facilities by the "single-line systems" for 20 generations. All mice were 4- to 6 -wk-old at the start of the experiments.

### **Parasites**

The ORF strain of *T. crassiceps* cysticerci (Zeder, 1800) (Rudolphi 1810), isolated by Freeman (Freeman, 1962) has been maintained by serial intraperitoneal (i.p.) passage in BALB/cAnN female mice for 10 yr at our Institute. Parasites for infection were harvested from the peritoneal cavity of mice 1- to 3- mo after inoculation of 10 small (2-3 mm in diameter), non-budding cysticerci per mouse.

### **Plasmid**

The expression vectors used in this study have been previously described (Rosas et al., 1988). Briefly, the pTc-sp7 was constructed by cloning the cDNA of the KETc7 (305 bp) recombinant antigen of *T. crassiceps* cysticerci previously reported (Manoutcharian et al., 1996) into the Bam H1 and Xho1 restriction sites of the pcDNA3 plasmid (Promega, Madison, Wisconsin) under the control of the CMV early promoter. The pTc-sp7 was constructed by adding in frame the sequence of the signal peptide of the betaglycan receptor, also known as the type III TGF- $\beta$  receptor (López-Casillas et al., 1991). The signal peptide was added at the 5' end of the KETc7 sequence, generating the sequence sp7 of 422 bp. The pTc-sp7 construct was verified by DNA sequencing. Plasmids were isolated in Qiagen plasmid purification columns

(Qiagen Inc. Santa Clarita, California), the solutions used were prepared in our laboratory, according to the manufacturer's instructions. DNA was quantified by spectrophotometry at 260 nm and the final concentration of the solution was adjusted to 0.9% NaCl (SS) and 1 µg/µl of DNA. DNA quality was determined by electrophoresis on 1.5 % agarose gels. The expression of KETc7 was confirmed by indirect immunofluorescence in C33 pTc-sp7 transfected cells (Rosas et al., 1998).

### **Immunization protocol**

To determine the protective capacity induced by immunization with the pTc-sp7 construction, groups of 10 BALB/cAnN female mice were injected with the pcDNA3 or pTc-sp7 using a 27-gauge needle, 3 times at 2-wk intervals. Each construct was injected i.m. (100 µg) into each individual quadriceps muscle through the skin (200 µg per mouse each time) or i.d. a total of 200 µg per mouse each time. In hope of increasing the number of lymph nodes reached by the antigen, the 200 µg of DNA per mouse was inoculated divided at 6 different sites in the ventral region of mice. As a control (non immunized), 10 mice were injected i.m. into each quadriceps muscles with 100 µl of SS or i.d. injected at 6 sites in the ventral area with a total of 200 µl of SS, 3 times at 2-wk intervals.

### **Antibody response**

Serum sample from immunized mice were collected individually before the infection (8-wk after the last immunization) and stored at -70 C until individually tested for the presence of specific antibodies. Antibody levels were determined by ELISA following the previously described procedure (Larralde et al., 1986). As a source of antigens, soluble *T. crassiceps* cysticerci antigens were used (Larralde et al., 1989). Briefly, 96-well flat-bottom microtitration plates (NUNC Brand Products, Copenhagen, Denmark) were coated with 1 µg of *T. crassiceps*

antigen per well diluted in carbonate buffer, pH 9.6, and incubated overnight at 4 C. Plates were washed 3 times for 5 min with phosphate-buffered saline (PBS) containing 0.1% v/v Tween 20 (PBS-T) and blocked with 200  $\mu$ l of PBS containing 1% w/v BSA (blocking buffer) at 37 C for 1 hr before washing again with PBS-T. Serum samples were used at 1:100 dilution in blocking buffer as noted above, and 100  $\mu$ l per well were incubated for 1 hr at 37 C and added in duplicate to the well. Plates were washed 3 times for 5 min with PBS-T. Bound mouse Igs were detected using the alkaline phosphatase-conjugated anti-mouse IgG (whole molecule, Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri) diluted 1:1,000 in blocking buffer for 1 hr at 37 C. The substrate used was detected using *p*-nitrophenyl phosphate (Sigma) in diethanolamine buffer for 10 min at room temperature. The reaction was stopped with 2N NaOH. Optical density readings at 405 nm ( $A_{405}$ ) were carried out in a Humareader ELISA processor (Human Gesellschaft für Biochemica und Diagnostica, Taunusstein, Germany).

### **Proliferation assay**

Spleen cells from control or i.m. or i.d. immunized mice either with pcDNA3 or pTc-sp7 were cultured in RPMI medium 1640 (GIBCOBRL, Grand Island, New York, USA) supplemented with L-glutamine (0.2 mM), nonessential amino acids (0.01 mM), penicillin (100 U/ml), streptomycin (100  $\mu$ g/ml) and FBS 10%. Cells were cultured at a concentration of  $2 \times 10^5$  cells per 200  $\mu$ l of final volume and incubated with Con A (5  $\mu$ g/ml) or *T. crassiceps* total antigens (10  $\mu$ g/ml), obtained as previously described (Sciutto et al., 1990). An immunogenic synthetic peptide from the KETc7 sequence, namely GK-1 (Gevorkian et al., 1996), was also used at 10  $\mu$ g/ml and incubated at 37 C in a 5% CO<sub>2</sub> humidified atmosphere in flat-bottom microtiter plates. Ten-thousand peritoneal cells recovered from the same mice were added to each well at a volume of 50  $\mu$ l. Peritoneal cells were obtained by ex vivo lavage with 5 ml of RPMI-1640. The

cells were sedimented by centrifugation at 800 g for 10 min. The pellets were resuspended in an additional 3 ml of supplemented RPMI medium 1640, thus adjusting the volume to contain  $2 \times 10^5$  cells/ml. After 72 hr, the cultured cells were pulsed (1  $\mu$ Ci per well) for a further 18 hr with (Methyl  $^3$ H thymidine) (Amersham, Life Science, Little Chalfont, U.K.). Then, all cells were harvested and the amount of incorporated label was measured by counting in a model 1205  $\beta$ -plate spectrometer (Wallac). All assays were performed in triplicate in 3 individual mice per group.

### **Flow cytometry**

After 72 hr of in vitro culture with mitogen, whole antigens or a synthetic peptide which represents one protective epitope of KETc7 (GK-1), splenocytes were harvested and CD8, CD4 expression was determined by 2 colour staining with FITC-conjugated anti-CD8 (Pharmingen, San Diego, California), phycoerytherin (PE)-labelled anti-CD4 (Pharmingen), according to the protocol previously described (Fragoso et al., 1998). Briefly, cells were washed with PBS containing 10 % of FBS  $\gamma$ -globulin-depleted plus 0.02%  $\text{NaN}_3$  and incubated with the indicated antibodies at 4 C for 30 min. After washing, splenocytes were resuspended in 3% formaldehyde in isotonic solution and analyzed by FACScan (Becton Dickinson, San Jose, California). Results were expressed as percentage of positive cells.

### **Cytokine measurements**

For the detection of intracellular cytokines, spleen cells treated with medium, GK-1 or *T. crassiceps* antigens were cultured for 60 h and for the inhibition of cytokine secretion, brefeldin A (2  $\mu$ M) was added to cell cultures 10 hr before the assay. At harvest, the cells were centrifuged at 500 x g for 10 min and washed twice in ice-cold PBS containing 10% globulin depleted FBS plus 0.02%  $\text{NaN}_3$ . CD3 and interleukine

expression was determined by two-color double fluorescence-activated cell sorting (FACS) as previously described (Toledo et al., 1999). Briefly, cells were stained with the FITC-conjugated anti-CD3 monoclonal antibody (Pharmingen). Intracellular cytokines were assayed by using a cytoStain™ kit (Pharmingen) to fix and permeabilize the cells. To stain intracellular cytokines, fixed and permeabilized cells were incubated with monoclonal rat anti-IL-2PE, anti-IL-4PE, anti-IL-10PE or anti-INF- $\gamma$ PE (all from Pharmingen). Parallel samples of the cells were stained with isotype control to account for nonspecific staining of the cells. Ten-thousand cells were analyzed with a CD3<sup>+</sup> lymphocyte gate as defined by light scatter in a FACScan (Becton Dickinson, Palo Alto, California). The percentage of cells in each quadrant is indicated in the dot plot. Quadrant statistics were set on the basis of the corresponding isotype controls.

### **Experimental challenge**

Eight wk after the first immunization, control and immunized mice either with pcDNA3 or pTc-sp7 were infected with 10 small non-budding cysticerci (2 mm in diameter) suspended in PBS as previously reported (Fragoso et al., 1998). Thirty days after infection, the standardized time to measure parasite load (Sciutto et al., 1990), mice were killed and the cysts found were recovered after several thorough washing with PBS of the peritoneal cavity and counted.

### **Statistical analysis**

The effect of DNA immunization on the parasite load in challenged mice was analyzed statistically using the non-parametric Kruskal-Wallis Tests. The statistical significance of the difference between mean values of binding activity in ELISA, proliferative response, and flow cytometry was performed with the Welch's unpaired *t*-test (alternative *t*-test). Both statistical

analyses were performed by the InStat Software Program (GraphPad, San Diego, California).

Differences were considered statistically significant at  $P < 0.05$ .

## RESULTS

### **Protective effect against *T. crassiceps* cysticercosis induced by different number of DNA immunizations**

The effect of DNA immunizations upon the number of cysticerci recovered from mice thirty days after infection is shown in Table I. pTc-sp7 immunization significantly reduced the expected parasite load i.m. or i.d. to a similar extent (63% and 79% respectively). I.m. or i.d. immunization with pcDNA3 by itself reduced the parasite load to 34 or 36 %, respectively.

### **Antibody responses induced by DNA immunization**

Figure 1 shows the level of antibodies induced by i.d. immunization with 200 µg of pTc-sp7. Antibodies that recognized total *T. crassiceps* antigens by ELISA were detected in 5 of the 9 pTc-sp7 immunized mice (62%) whereas no antibodies were detected in control or pcDNA3 immunized mice. Unexpectedly, no seroconversion was observed in pTc-sp7 i.m. immunized mice. This result is not consistent with those previously reported (Rosas et al., 1998), the only difference between experiments being that herein plasmids were purified using Qiagen columns instead of Promega kit.

### **Proliferative response**

Figure 2 shows the level of proliferation obtained when spleen cells from non-immunized and pcDNA3 or pTc-sp7 immunized mice i.m. or i.d. were stimulated in vitro. A significant level of proliferation was induced by whole antigens from *T. crassiceps* or GK-1 in mice immunized either i.d. or i.m. whereas no proliferation was observed in those injected with pcDNA3 or non immunized mice.



## Cytometry Analysis

As Table II shows the proportion of  $CD4^+CD8^+$  ( $CD8^+$ ) T cells increases from 10.9 in controls to 17.1 or 25.7 respectively, in i.d. or i.m pTc-sp7 immunized mice, when cells were activated with whole antigens. Similar results were obtained when GK-1 was used as mitogen. It also shows a significant increase in the  $CD4^+CD8^-$  ( $CD4^+$ ) population albeit to a lesser level. Although in lower magnitude a significant increase in the  $CD4^+$  and  $CD8^+$  population was observed in i.m. pcDNA3 immunized mice with or without in vitro stimulation.

The frequency of cells capable of producing IL-4, INF- $\gamma$ , IL-2 and IL-10 was also determined by FACS after intracellular staining for cytokines. Figure 3 and 4 shows that *T. crassiceps* total antigen or GK-1 stimulated cells from immunized mice had significantly higher frequencies of cells producing INF- $\gamma$  and IL-2 than those from non-immunized mice and also shows in a lower magnitude that IL-4 and IL-10 were also increased in those pTc-sp7 immunized mice.

## DISCUSSION

The KETc7 peptide has been proposed as a possible candidate antigen for a vaccine against *T. solium* cysticercosis (Manoutcharian et al., 1996). KETc7 is located in the external tegument of the *T. solium* cysticercus and of the tapeworm and it is also expressed in the onchospherical stage (Rosas et al., 1998). In previous work, we evaluated DNA immunization using the KETc7 sequence; best results were obtained when KETc7 was added to the type III TGF- $\beta$  receptor signal peptide sequence (pTc-sp7). Here, pTc-sp7 was tested in different protocols to maximize its effectiveness and to study the type of immune response it induces.

We confirmed the protective capacity of pTc-sp7 DNA immunization against experimental murine cysticercosis. As Table I shows, similar levels of protection were induced by i.d. and i.m. immunization (79% and 63%, respectively), as reported by other authors in other diseases (Raz et al., 1994; Davis et al., 1995). The level of protection obtained by DNA immunization herein is somewhat higher than those reported in a previous study using the corresponding recombinant antigen (KETc7) (Manoutcharian et al., 1996), encouraging the use of DNA vaccination against multicellular parasites. It is of interest to note that between 34 and 36 % of protection was induced by i.m. or i.d. immunization with the empty pcDNA3. This result is not new but is important: it confirms the previously observed protective effect, probably mediated by a non-specific polyclonal immune response, induced by short immunostimulatory DNA sequences that contain CpG dinucleotide in a particular base context, flanked by 2, 5' purines and 2, 3' pyrimidines (Klinman et al., 1996, 1997; Roman et al., 1997; Kline et al., 1998; Krieg et al., 1998) included in the cytomegalovirus promoter as well as in the ampicillin resistance gene.

In contrast with previous work, characterized by 85% of seroconversion of i.m. immunized mice with the same protocol that is used herein (Rosas et al., 1998), we now did not

detect antibodies induced in i.m. immunized mice (data not shown) whilst 62% of i.d. immunized mice had antibodies (Fig. 1). It should be noted that, in this work, DNA was purified by Qiagen plasmid purification columns, which differs from the previous study in which the Promega kit was used. This probably leads to differences in the conformational state of the purified DNA (relative amount of superhelical DNA). However, since the presence (shown in Rosas et al., 1998) or absence of antibodies reported in this study (i.m. immunization mice), did not correlate with the level of protection, 58.6% and 63% respectively, we conclude that the antibody response is not an absolute requirement for parasite growth control, as suggested elsewhere (Bojalil et al., 1993). In addition, variations in inducing antibodies by DNA obtained by diverse procedures could explain some conflicting results that have been reported in other diseases (Yang et al., 1995; Waine et al., 1997). In any case, our results show that i.d. immunization is a more effective alternative to produce antibodies, protective or not, as has been also reported by other authors (Boyle et al., 1997; Gramzinski et al., 1998). However, we cannot discard an additional effect due to the number of inoculations in im. (6 per mouse in total) and in i.d. (18 per mouse in total) immunized mice.

Our results suggest an important participation of cell-dependent mechanisms in conferred immunity to *T. crassiceps* cytotoxicosis by both i.m. and i.d. injections. Figure 2 shows a high level of specific proliferation induced by antigen and GK-1 in cells from pTc-sp7 immunized mice. Similar levels of proliferation were obtained using spleen cells (sc) from i.m. or i.d. immunized mice (Fig. 2).

Albeit the percentage of CD4<sup>+</sup> cells was increased in the proliferated T-cells from i.m. immunized mice, the percentage of CD8<sup>+</sup> cells was rather higher (Table II). The increased percentage of CD3<sup>+</sup> cells that produced inflammatory cytokines (IFN $\gamma$  and IL-2) could result in

macrophage activation at the parasite vicinity which can be involved in the resistance induced. It is probable that this CD8<sup>+</sup> enriched inflammatory response could be a consequence of the features of KETc7, more than the form of immunization, specially considering that immunization with the GK-1 epitope of this antigen induces a very similar immune response (Toledo et al., 1999).

A conciliatory, if not trivial, conclusion with respect to the immune mechanisms involved in *T. crassiceps* cysticercosis would be that antibody and cell mediated events are both effective and sufficient against the parasite but not both are equally detectable in all experimental protocols and times of infection.

One economic concern on the advantages of nucleic acid vaccines in terms of public health is the amount of high quality DNA required for immunization. However, the possible solution of DNA delivery by particle bombardment, which requires very low amounts of DNA (Fynan et al., 1993), should be thoroughly examined, particularly considering recent reports that clearly show that a different quality of immune response is elicited by DNA injection or by particle bombardment with DNA (Feltquate et al., 1997). It is also possible that fused antigens used to increase the delivery to APCs cells can reduce the DNA required to induce an effective immune response (Boyle et al., 1998). In short, further research is needed to produce a simpler and less costly DNA vaccine. Results obtained in this study further encourage us to use the KETc7 antigen in the design of a multivalent vaccine against cysticercosis, and to describe the immune response related to the resistance induced.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

The authors thank, Gerardo Arrellin, Georgina Díaz Herrera, Marisela Hernández and Mercedes Baca for technical assistance. Isabel Pérez Montfort corrected the English version of the manuscript. This work was supported by from the Dirección General de Asuntos de Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México (IN208395, IN212798), CONACyT (G25955m), México and INCO-DC STD3 Programme from The European Union.

## LITERATURE CITED

- Bojalil, R., I. Terrazas, T. Govezensky, E. Sciutto, and C. Larralde. 1993. Thymus-related cellular mechanisms in sex-associated resistance to experimental murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). *Journal of Parasitology* **79**: 384-389.
- Boyle, J. S., A. Silva, J. L. Brady, and A. M. Lew. 1997. DNA immunization: induction of higher avidity antibody and effect of route on T cell cytotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **94**: 14626-14631.
- \_\_\_\_\_, J. L. Brady, and A. M. Lew. 1998. Enhanced responses to a DNA vaccine encoding a fusion antigen that is directed to sites of immune induction. *Nature* **392**: 408-411.
- Connell, N. D., E. Medina-Acosta, W. R. MacMaster, B. R. Bloom, and D. G. Russell. 1993. Effective immunization against cutaneous leishmaniasis with recombinant bacille Calmette-Guerin expressing the *Leishmania* surface proteinase gp63. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **90**: 11473-11477.
- Doolan, D.L., R.C. Hedstrom, M. J. Gardner, M. Sedegah, H. Wang, R. A. Gramzinski, M. Margalith, P. Hobart, and S. L. Hoffman. 1998. DNA vaccination as an approach to malaria control: current status and strategies. *Current Topics in Microbiology and Immunology* **226**: 37-56.
- Feltquate, D. M., S. Heaney, R. G. Webster, and H. L. Robinson. 1997. Different T helper cell types and antibody isotypes generated by saline and gene gun DNA immunization. *Journal of Immunology* **158**: 2278-2284.
- Fragoso, G., E. Lamoyi, A. Mellor, C. Lomelí, M. Hernández, and E. Sciutto. 1998. Increased resistance to *Taenia crassiceps* murine cysticercosis in Qa-2 transgenic mice. *Infection and Immunity* **66**: 760-764.

- Freeman, R.S. 1962. Studies on the biology of *Taenia crassiceps* (Zeder, 1800), (Rudolphi, 1810). *Canadian Journal of Zoology* **40**: 969-990.
- Fynan, E. F., R. G. Webster, D. H. Fuller, J. R. Haynes, J. C. Santoro, and H. L. Robinson. 1993. DNA vaccines: protective immunizations by parental, mucosal and gene-gun inoculations. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **90**: 11478-11482.
- Gevorkian, G., K. Manoutcharian, C. Larralde, M. Hernández, J. C. Almagro, M. Viveros, J. Sotelo, E. García, and E. Sciutto. 1996. Immunodominant synthetic peptides of *Taenia crassiceps* in murine and human cysticercosis. *Immunology Letters* **49**: 185-189.
- Gramzinski, R.A., C. L. Millan, N. Obaldia, S. L. Hoffman, and H. L. Davis. 1988. Immune response to a hepatitis B DNA vaccine in Aotus monkeys: a comparison of vaccine formulation, route, and method of administration. *Molecular Medicine* **4**: 109-118.
- Grisolia, J. S. and W. C. Wiederholt. 1982. CNS cysticercosis. *Archives of Neurology* **39**: 540-544.
- Klinman, D. M., A. K. Yi, S. L. Beaucage, J. Conover, and A. M. Krieg. 1996. CpG motifs present in bacteria DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12, and interferon gamma. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **93**: 2879-2883.
- \_\_\_\_\_, G. Yamshchikov, and Y. Ishigatsubo. 1997. Contribution of CpG motifs to the immunogenicity of DNA vaccines. *Journal of Immunology* **158**: 3635-3639.
- Kline, J. N., T. J. Waldschmidt, T. R. Businga, J. E. Lemish, J. V. Weinstock, P. S. Thorne, and A. M. Krieg. 1998. Modulation of airway inflammation by CpG oligodeoxynucleotides in a murine model of asthma. *Journal of Immunology* **160**: 2555-2559.
- Krieg, A. M., A. K. Yi, J. Schorr, and H. L. Davis. 1998. The role of CpG dinucleotides in DNA vaccines. *Trends in Microbiology* **6**: 23-27.

Larralde, C., J. P. Lacleite, C. S. Owen, I. Madrazo, M. Sandoval, R. Bojalil, E. Sciutto, L. Contreras, J. Arzate, M. L. Díaz, T. Govezensky, R. M. Montoya, and F. Goodsaid. 1986. Reliable serology of *Taenia solium* cysticercosis with antigens from cyst vesicular fluid: ELISA and haemagglutination test. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **35**: 965-973.

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

Loo, L., and A. Braude. 1982. Cerebral cysticercosis in San Diego. A report of 23 cases and a review of the literature. *Medicine (Baltimore)* **61**: 341-359.

López-Casillas, F., S. Cheifetz, J. Doody, J. L. Andres, W. S. Lane, and J. Massagué. 1991. Structure and Expression of the Membrane Proteoglycan Betaglycan, a Component of the TGF- $\beta$  Receptor System. *Cell* **67**: 785-795.

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

McCormick, G. F. 1985. Cysticercosis, review of 230 patients. *Bulletin of Clinical Neuroscience* **50**: 76-101.

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



\_\_\_\_\_, P. Tato, R. Lara-Aguilera, and A. C. Jr. White. 1993. Effects of serum from neurocysticercosis patients on the structure and viability of *Taenia solium* oncospheres.

*Parasitology* **79**: 124-127.

Mor, G., D. M. Klinman, S. Shapiro, E. Hagiwara, M. Sedegah, J. A. Norman, S. L. Hoffman, and A. D. Steinberg. 1995. Complexity of the cytokine and antibody response elicited by immunizing mice with *Plasmodium yoelii* circumsporozoite protein plasmid DNA. *Journal of Immunology* **155**: 2039-2046.

Nascimento, E., J. O. Costa, M. P. Guimaraes, and C. A. Tavares. 1995. Effective immune protection of pigs against cysticercosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **45**: 127-137.

Raz, E., D. A. Carson, S. E. Parker, T. B. Parr, A. M. Abai, G. Aichinger, S. H. Gromkowski, M. Singh, D. Lew, and M. A. Yunkauckas. 1994. Intradermal gene immunization: the possible role of DNA uptake in the induction of cellular immunity to viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **91**: 9519-9523.

Richards, F. Jr., and P. Schantz. 1991. Laboratory diagnosis of cysticercosis. *Clinical in Laboratory Medicine* **11**: 1011-1028.

Roman, M., E. Martin-Orozco, J. S. Goodman, M. D. Nguyen, Y. Sato, A. Ronaghy, R. S.

Kornbluth, D. D. Richman D. A. Carson, and E. Raz. 1997. Immunostimulatory DNA sequences function as T-helper-1 promoting adjuvant. *Nature Medicine* **3**: 849-854.

Rosas, G., C. Cruz-Revilla, G. Fragosó, F. López-Casillas, A. Pérez, M. A. Bonilla, R. Rosales, and E. Sciutto. 1998. *Taenia crassiceps* cysticercosis: humoral immune response and protection elicited by DNA immunization. *Journal of Parasitology* **84**: 516-523.

- Rothel, J. S., J. G. Waterkeyn, R. A. Strugnell, P. R. Wood, H. F. Seow, J. Vadolas, and M. W. Lightowlers. 1997. Nucleic acid vaccination of sheep: Use in combination with a conventional adjuvanted vaccine against *Taenia ovis*. *Immunology Cell Biology* **75**: 41-46.
- Sciutto, E., G. Fragoso, L. Trueba, D. Lemus, R. M. Montoya, M. L. Díaz, T. Govezensky, C. Lomeli, G. Tapia, and C. Larralde. 1990. Cysticercosis vaccine: Cross-protecting immunity with *Taenia solium* antigens against experimental murine *Taenia crassiceps* cysticercosis. *Parasite Immunology* **12**: 687-696.
- \_\_\_\_\_, A. Aluja, G. Fragoso, L. F. Rodarte, M. Hernández, N. Villalobos, A. Padilla, N. Keilbach, M. Baca, T. Govezensky, S. Díaz, and C. Larralde. 1995. Immunization of pigs against *Taenia solium* cysticercosis: Factors related to effective protection. *Veterinary Parasitology* **60**: 53-67.
- Sotelo, J., O. H. Del Brutto, and G. Roman. 1996. Cysticercosis. *Current Clinical Tropical Infection Disease* **16**: 240-259.
- Toledo, A., C. Larralde, G. Fragoso, G. Gevorkian, K. Manoutcharian, M. Hernández, G., Acero, G. Rosas, F. López-Casillas, G. Kubli Garfias, R. Vázquez, I. Terrazas, and E. Sciutto. 1999. Towards a *Taenia solium* cysticercosis vaccine: an epitope shared by *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* protects mice against experimental cysticercosis. *Infection and Immunity* **67**: 2522-2530.
- Waine, G. J., W. Yang, J. C. Scott, D. P. McManus, and B. H. Kalinna. 1997. DNA-based vaccination using *Schistosoma japonicum* (Asian blood-fluke) genes. *Vaccine* **15**: 846-848.
- Yang, W., G. J. Wine, and D. P. McManus. 1995. Antibodies to *Schistosoma japonicum* (Asian bloodfluke) paramyosin induced by nucleic acid vaccination. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **212**: 1029-1039.

FIGURE 1. Individual antibody response in control and pcDNA3 or pTc-sp7 intradermally immunized mice determined by ELISA. The cut-off values were obtained from 2 SD plus the mean optical density (OD) reading of the control serum sample of each mouse. The bars represent mean OD for each experimental group injected.

FIGURE 2. T-cell proliferative response of spleen cells from mice injected intradermally (A) or intramuscularly (B), were determined by [<sup>3</sup>H] thymidine incorporation on day 3 of culture and incubated with *Taenia crassiceps* antigens or GK-1 (10 µg/ml) or with Con A (5 µg/ml) as a positive control. The data show the mean ± SD of 3 individual mice. Differences were significant when  $P < 0.05$  (\*).

FIGURE 3. FACS analysis of intracellular cytokines (IL-2, IFN-γ) in CD3<sup>+</sup> spleen cells from non immunized, pcDNA3 and pTc-sp7 immunized mice 60 hr poststimulation. Cells had been dually stained with FITC (abscissa) and PE (ordinate). The percentage of cells in each quadrant of the dot plot is indicated. The data are representative of 2 experiments using different mice.

FIGURE 4. FACS analysis of intracellular cytokines (IL-10, IL-4) in CD3<sup>+</sup> spleen cells from non immunized, pcDNA3 and pTc-sp7 immunized mice 60 hr poststimulation. Cells had been dually stained with FITC (abscissa) and PE (ordinate). The percentage of cells in each quadrant of the dot plot is indicated. The data are representative of 2 experiments using different mice.

## FOOTNOTES

\*Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México A.P. 70246, 04510 México, D.F., México

Table I. Protective effect induced against *Taenia crassiceps* murine cysticercosis by intramuscular or intradermal DNA immunization.

	Experiment 1	Experiment 2
Controls	79.7 ± 21.1 <sup>**</sup>	44.2 ± 24.4 <sup>c</sup>
Immunized with 3 doses of:	Intramuscular	Intradermal
pcDNA3	52.3 ± 15.4 <sup>ab</sup> (34%) <sup>†</sup>	28.1 ± 20.9 <sup>cd</sup> (36%)
pTc-sp7	29.1 ± 15.1 <sup>b</sup> (63%)	9.1 ± 4.6 <sup>d</sup> (79%)

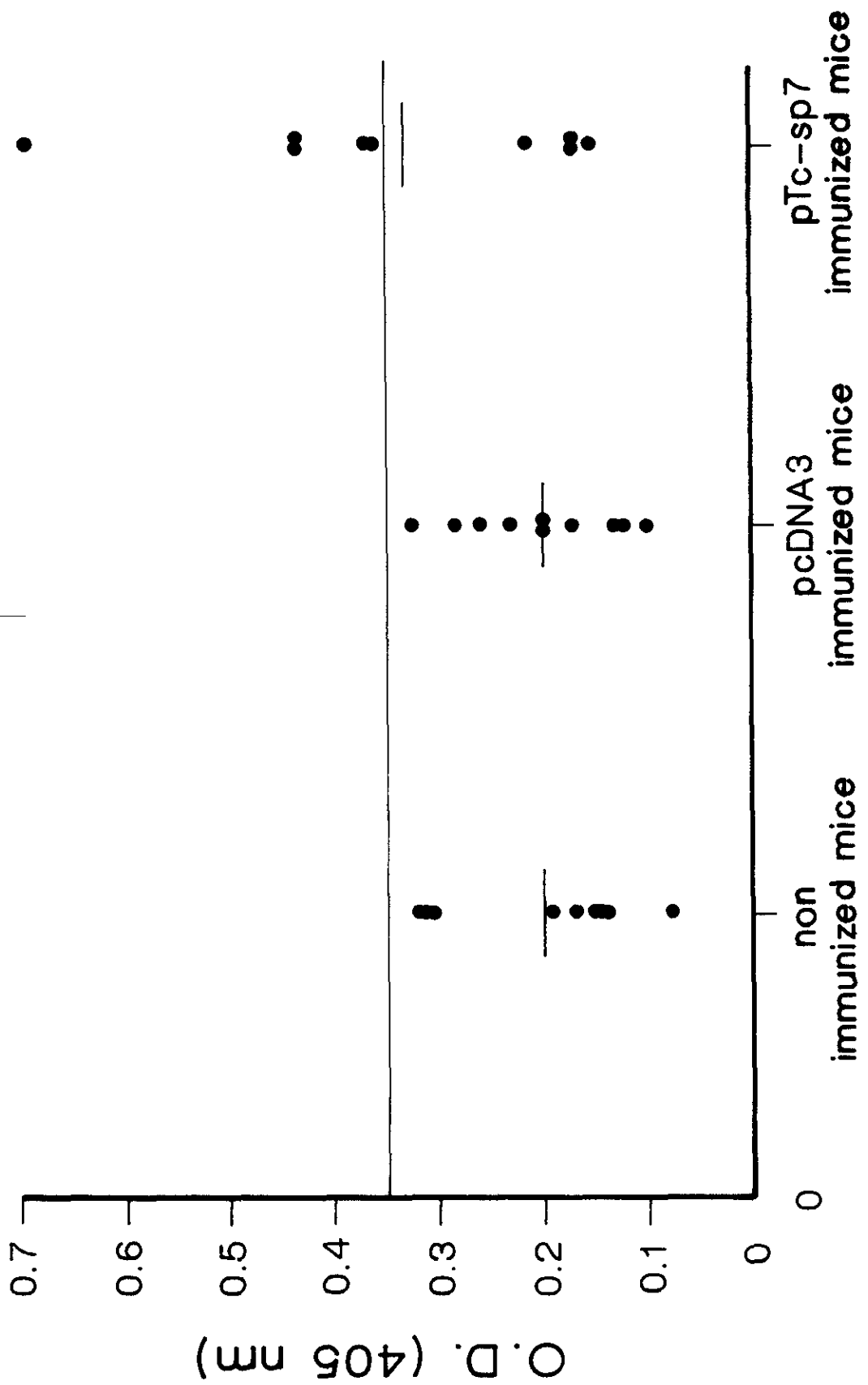
\*Mean ± SD of the parasite load in each group. †Percent of protection in each group.

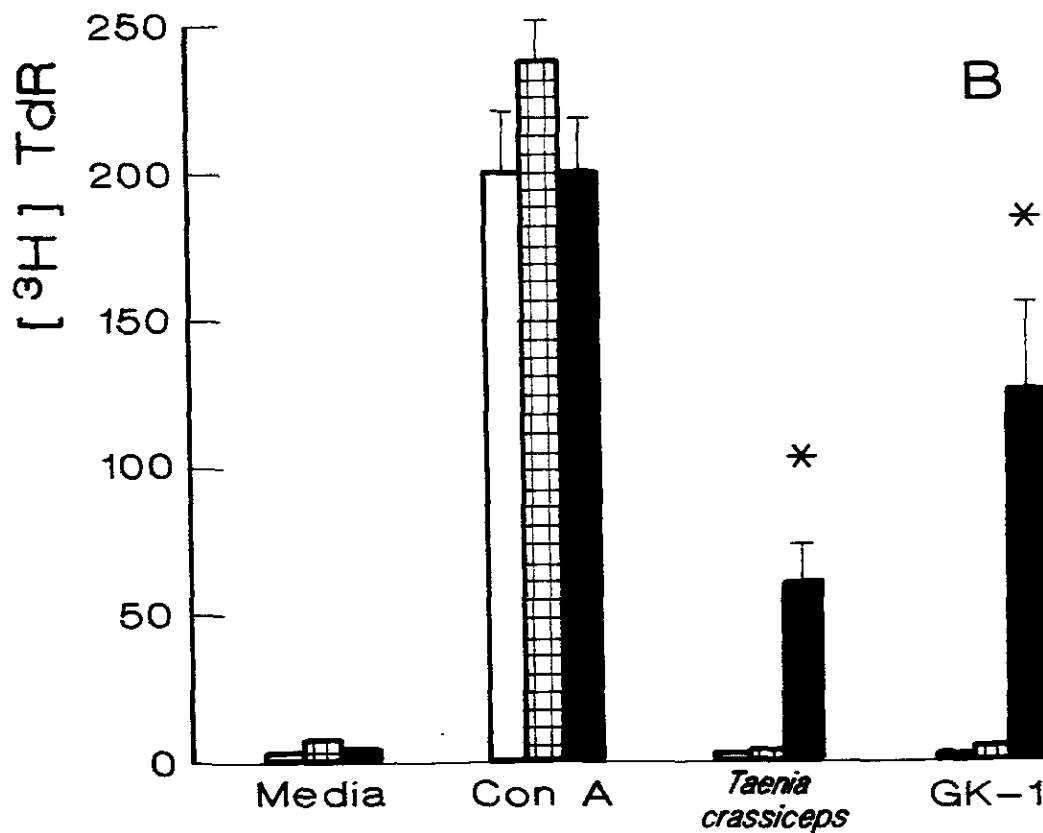
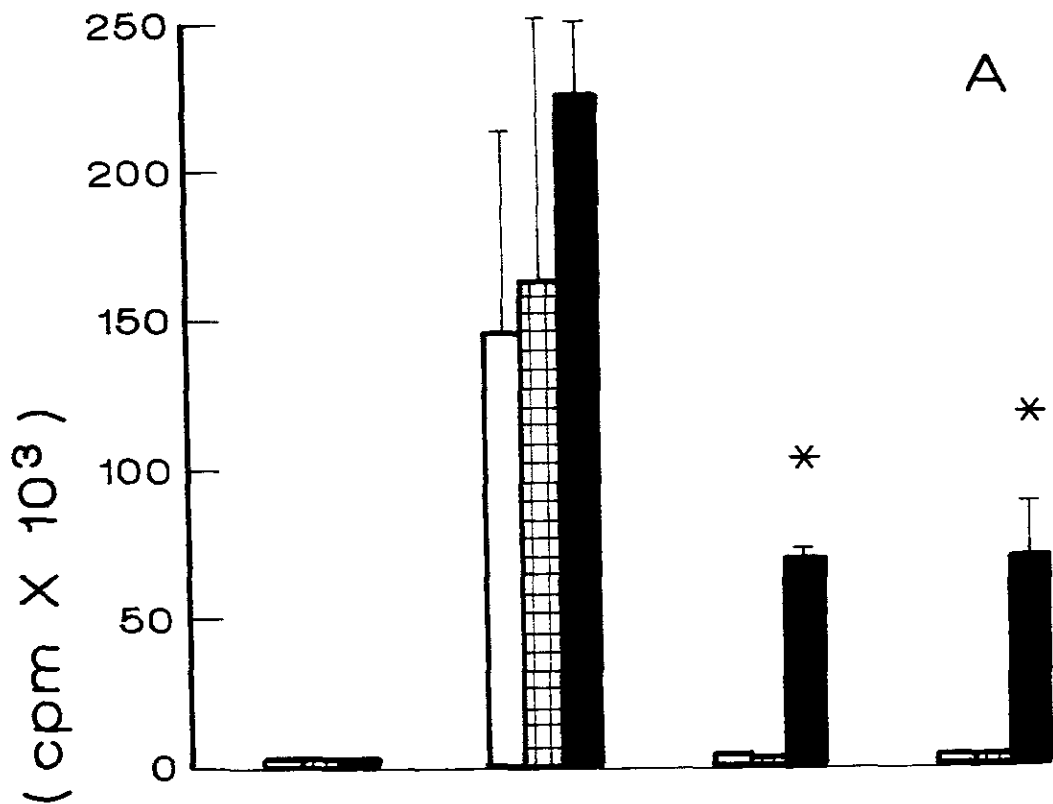
Statistic comparisons were done between intramuscularly<sup>(ab)</sup> or intradermally<sup>(cd)</sup> female immunized mice. Data were considered significantly different using the non-parametric Kruskal-Wallis ANOVA Test ( $P < 0.05$ ). The Dunn's post test was used to determine which treatments are significantly different from each other. Data labeled with the same letter are NS different from each other, whereas those with different letters are significantly different from each other.

Table II. Flow cytometer analysis of spleen cells from non immunized and immunized mice injected intramuscularly or intradermally either with pcDNA3 or pTc-sp7.

Incubation with:	Mean of the percentage of positive cells $\pm$ S.D.											
	Immunized intradermally with:						Intramuscularly with:					
	Saline		pcDNA3		pTc-sp7		pcDNA3		pTc-sp7		pTc-sp7	
	CD4 <sup>+</sup>	CD8 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup>	CD8 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup>	CD8 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup>	CD8 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup>	CD8 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup>	CD8 <sup>+</sup>
Media	29.9 $\pm$ 0.8	11.0 $\pm$ 0.4	27.3 $\pm$ 0.5	10.3 $\pm$ 0.4	32.4 $\pm$ 0.6	12.2 $\pm$ 0.3	35.9 $\pm$ 1.4*	14.4 $\pm$ 0.7*	36.6 $\pm$ 0.5*	9.9 $\pm$ 1.8		
Cysticercal antigens	28.8 $\pm$ 0.3	10.9 $\pm$ 0.1	30.2 $\pm$ 0.3	10.4 $\pm$ 0.6	31.2 $\pm$ 0.3	17.1 $\pm$ 0.1*	35.7 $\pm$ 1.6*	13.7 $\pm$ 0.4*	41.9 $\pm$ 1.9*	25.7 $\pm$ 1.4*		
GK-1	31.8 $\pm$ 1.9	10.4 $\pm$ 0.4	29.2 $\pm$ 0.3	10.1 $\pm$ 0.1	26.3 $\pm$ 0.3	16.2 $\pm$ 0.3*	34.9 $\pm$ 0.6*	12.0 $\pm$ 0.2*	40.1 $\pm$ 0.7*	37.5 $\pm$ 3.5*		

Flow cytometer analysis was performed on spleen cells from intradermally or intramuscularly immunized mice with their respective controls after 3 days of culture without or with *Taenia crassiceps* cysticercal antigens or GK-1(10  $\mu$ g/ml). Data represent the percent of cells from 3 individual mice and is representative of two experiments performed in duplicate. \*Significant increase in the percentage of cells, in stimulated immune mice compared with those controls saline treated, using the non-parametric unpaired *t* Welch's test (alternative *t* test) ( $P < 0.01$ ).





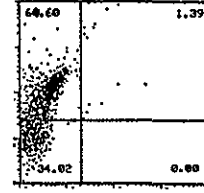
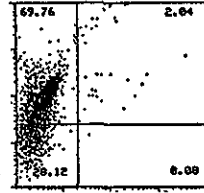
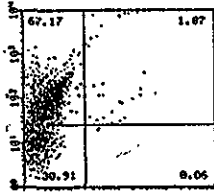
Non immunized
  pcDNA3 immunized
  pTc-sp7 immunized

Non immunized

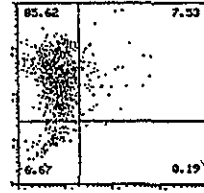
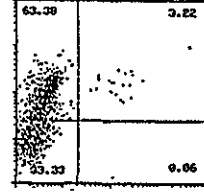
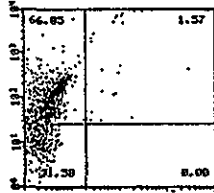
pcDNA3 immunized

pTc-sp7 immunized

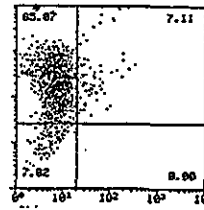
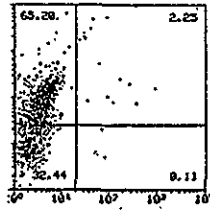
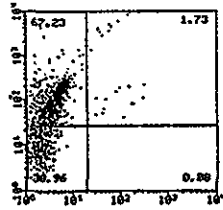
Media



*Taenia crassiceps*



GK-1



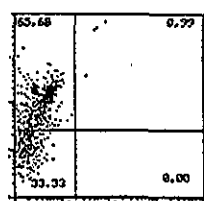
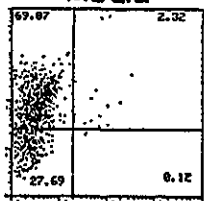
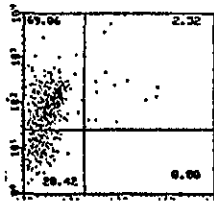
IL-2

Non immunized

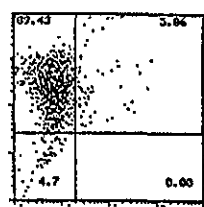
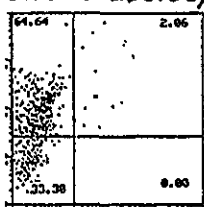
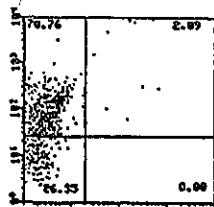
pcDNA3 immunized

pTc-sp7 immunized

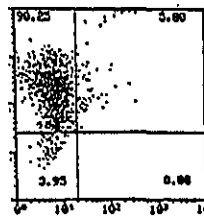
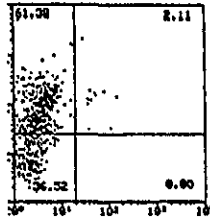
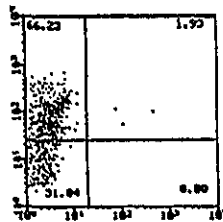
Media



*Taenia crassiceps*



GK-1



IFN- $\gamma$

CD3

CD3

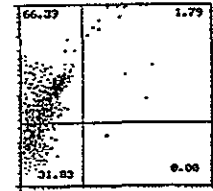
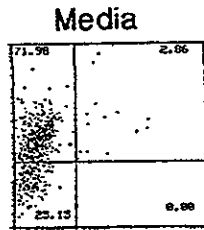
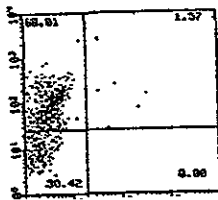


Non immunized

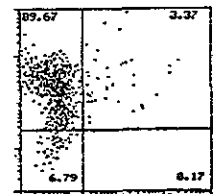
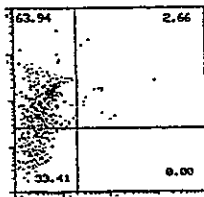
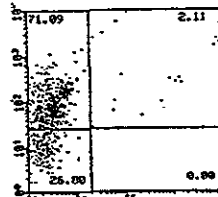
pcDNA3 immunized

pTc-sp7 immunized

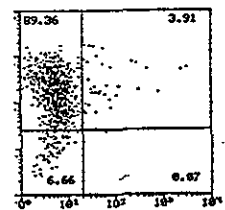
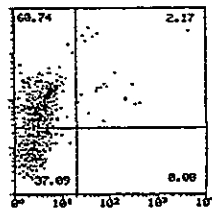
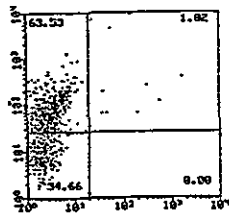
CD3



*Taenia crassiceps*



GK-1



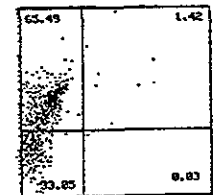
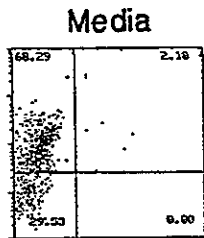
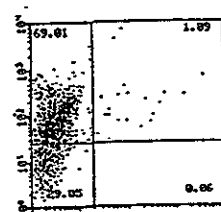
IL-10

Non immunized

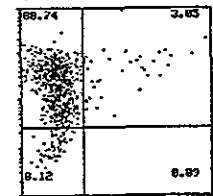
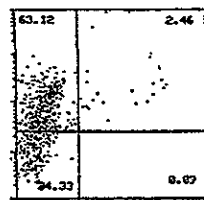
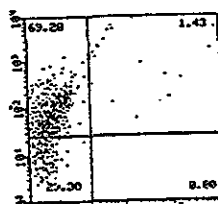
pcDNA3 immunized

pTc-sp7 immunized

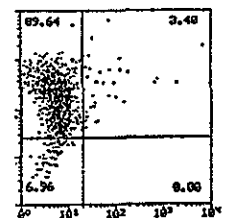
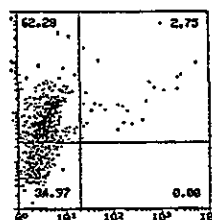
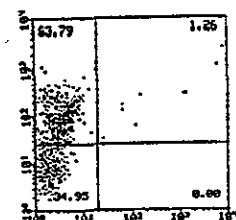
CD3



*Taenia crassiceps*



GK-1



IL-4