



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
COORDINACIÓN

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 29 de marzo del 2004, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de DOCTORA EN CIENCIAS de la alumna **María Alicia Díaz y Orea** con número de cuenta 99810140 y número de expediente 3991174, con la tesis titulada: **"EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL Y CELULAR INDUCIDA POR LA INMUNIZACIÓN DE CERDOS CON TRES PEPTIDOS SINTÉTICOS EN CONTRA DE LA CISTICERCOSIS POR Taenia solium."**, bajo la dirección del **DR. FAUSTO R. MÉNDEZ DE LA CRUZ**.

Presidente:	Dra. Aline Schunemann de Aluja
Secretario:	Dra. Cecilia Teresa Ximénez García
Vocal:	Dra. Kaethe Willms Manning
Vocal:	Dr. Rafael Saavedra Durán
Vocal:	Dra. Edda Lidia Sciutto Conde
Suplente:	Dra. Gladis Fragoso González
Suplente:	Dra. Patricia Margarita Tato Zaldivar

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 31 de agosto del 2004

Dr. Juan José Morrone Lupi
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado



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.

Esta Tesis fue realizada en el Laboratorio de Inmunología de la
Dra. Edda Sciutto de el Instituto
Investigaciones Biomédicas
UNAM.

Laboratorio de Biología Celular
del Centro de Investigación
Biomédica del IMSS.

Contó con el apoyo económico: de la Coordinación de Investigación
en Salud del IMSS.

Consejo Nacional de Ciencia y
Tecnología
Mediante el programa de becas
para estudiantes de doctorado.

Con el apoyo técnico de la DC Andrea Toledo
MC Nelly Villalobos
MC Víctor O. Castellanos
Bioterio de la Facultad de Medicina
Veterinaria y Zootecnia
UNAM.

00387



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

DOCTORADO EN CIENCIAS

EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL Y CELULAR
INDUCIDA POR LA INMUNIZACIÓN DE CERDOS CON TRES PÉPTIDOS
SINTÉTICOS EN CONTRA DE LA CISTICERCOSIS POR *Taenia solium*

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACÁDEMICO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

P R E S E N T A

MARIA ALICIA DÍAZ Y OREA

TUTOR: EDDA LIDIA SCIUTTO CONDE
GLADIS FRAGOSO GONZÁLEZ
ALINE S. DE LILIA

México, D. F.



COORDINACIÓN

septiembre, 2004

A mis padres

Con infinito amor por haberme dado lo mejor de sus vidas.

A mi pequeña hija

Ejemplo de bondad, trabajo y esfuerzo por alcanzar la meta anhelada.

A mis hermanos y sobrinos

*A los que me une el amor la gratitud
y el valioso ejemplo de sus vidas*

A mis tutoras

*Mi más sincero agradecimiento por el interés, la dedicación
y sus valiosos conocimientos en la realización de este
proyecto.*

A mis compañeros y amigos

Dr. Eduardo Gómez-Conde

*Por su sincero afecto, gran calidad humana y
sabios consejos.*

A las Instituciones que me formaron

AL HONORABLE JURADO

INDICE

	Página
I. Resumen.....	8
Abstract.....	10
II. Introducción	
La cisticercosis.....	12
Ciclo de vida <i>Taenia solium</i>	18
Ciclo de vida <i>Taenia crassiceps</i>	25
III. Antecedentes específicos	
Medidas de Prevención y control de la Cisticercosis por <i>Taenia solium</i>	32
Desarrollo de la vacuna sintética.....	40
Respuesta Inmune inducida por el metacéstodo de la <i>Taenia solium</i> en cerdos.....	53
Respuesta Inmune inducida por el cisticerco la <i>Taenia crassiceps</i> en el ratón.....	57
Respuesta Inmune del cerdo.....	60
IV. Objetivo general.....	66
V. Objetivos particulares.....	66
VI. Material y Métodos.....	66
VII. Resultados.....	74
VIII. Artículos que resumen los principales hallazgos de esta tesis y artículos en colaboración.....	78

Vaccination against *Taenia solium* cysticercosis in underfed rustic pigs of México: roles of age, genetic background and antibody response.

Huerta M., Aluja A., Fragoso G., Toledo A., Villalobos N., Hernández M., Gevorkian G., Acero G., Díaz J., Díaz A., Alvarez L., Avila R., Beltrán C., García G., Martínez JJ., Larralde C., Sciutto E. *Vet Parasitol.* 2000; 90:209-19.

Syntetic peptide vaccine against *Taenia solium* pig cysticercosis successful vaccination in a controlled field trial in rural Mexico.

Huerta M., Aluja A., Fragoso G., Toledo A., Villalobos N., Hernández M., Gevorkian G., Acero G., Díaz A., Alvarez L., Avila R., Beltrán C., García G., Martínez JJ., Larralde C., Sciutto E. *Vaccine.* 2002; 20: 262-266.

Th1 and Th2 indices of the immune response in pigs vaccinated against *Taenia solium* cysticercosis suggest various host immune strategies against the parasite

María Alicia Díaz, Nelly villalobos, Aline Aluja, Gabriela Rosas, Eduardo Gómez-Conde, Pablo Hernández, Carlos Larralde, Edda Sciutto, Gladis Fragoso. *Vet Immunol Immunopathol.* 2003; 93(3-4): 81-90.

Recombinant Bacteriophage as a Multiepitope Vaccine Carrier¹

Karen Manoutcharian, Alicia Díaz-Orea, Goar Gevorkian, Gladis Fragoso, Gonzalo Acero, Erik González, Aline de Aluja, Nelly Villalobos, E. Gómez-Conde, and Edda Sciutto. *Vet Immunol Immunopathol.* 2004; 99:11-24.

IX. Discusión.....	78
X. Conclusión.....	82
XI. Bibliografía.....	83
XII. Anexos.....	102
Anexo I. Hacia la identificación de mecanismos efectores asociados a la protección mediada por S3Pvac.....	102
Anexo II. Fago filamentoso M13.....	130

I. Resumen

En este trabajo se describen las respuestas inmunes inducidas por la vacunación de cerdos con los 3 péptidos sintéticos (KETc-1, KETc-12 y GK-1) que constituyen la vacuna (S3Pvac) y la vacuna constituida por estos 3 péptidos y un antígeno recombinante KETc-7 expresados en múltiples copias en la superficie del bacteriófago M13 (CPhV), desarrolladas contra la cisticercosis por *Taenia solium*.

S3Pvac ha demostrado prevenir eficientemente la cisticercosis porcina en condiciones naturales de transmisión y destruir los cisticercos instalados. Con el propósito de identificar la respuesta inmune asociada a la demostrada capacidad protectora se diseñó este estudio. Se utilizaron cerdos mestizos provenientes de pies de crías que se mantuvieron en condiciones controladas en campo. Los cerdos fueron vacunados con S3Pvac y otro grupo de cerdos recibió en forma individual cada uno de los péptidos. Se sangraron a diferentes tiempos después de la vacunación durante 51 días detectando anticuerpos específicos a partir de la segunda inmunización. Se determinó la respuesta proliferativa y los niveles de citocinas estimulando *in vitro* con cada uno de los péptidos y con antígeno de *Taenia solium*. Si bien se detectaron en algunos cerdos respuestas proliferativas específicas, se observó una alta variación individual y bajos índices de estimulación específica. Más claro fueron los incrementos en los niveles de IL-2

e IFN- γ que señalan una exacerbada respuesta inflamatoria inducida por la vacunación.

Al respecto de la eficacia de los anticuerpos demostramos, utilizando un modelo experimental de teniasis, que los anticuerpos anti-GK-1 y no los anti-KETc1 y KETc12 tienen capacidad de dañar al cisticerco de *Taenia solium*, inhibiendo su capacidad de transformarse en tenia después de ser administrados a hámsteres por vía oral.

La vacunación con (CPhV), indujo una respuesta inmune celular y humoral al ser administrada en forma oral y parenteral a cerdos mestizos en cautiverio. Indujo un bajo nivel de anticuerpos y una respuesta proliferativa péptido y antígeno específica con producción de INF- γ e IL-4 en los sobrenadantes del cultivo de PBMC de los cerdos inmunizados. En esta respuesta mezcla Th1/Th2, la producción de INF- γ promueve una respuesta Th1 que aparentemente es el resultado de la activación inmune péptido específica, mientras la producción de IL-4 es inducida por el fago M13. La inmunogenicidad de este fago recombinante, junto con el bajo costo de su producción hace de ella, un candidato realista para ser probado en cerdos rústicos como una vacuna anticisticerco expresada en fagos.

Abstract

This study is the description of the immune response induced by the vaccination of pigs with the 3 synthetic peptides (KETc-1, KETc-12 and GK-1) that constitute the vaccine (S3Pvac) and the vaccine constituted by these 3 peptides and a recombinant antigen KETc-7 expressed in multiple copies in the surface of the bacteriophage M13 (CPhV), developed against *Taenia solium* cysticercosis .

S3Pvac has been shown to prevent cysticercosis efficiently under natural conditions of transmission and to destroy the tissue cysticerci. The present study was designed to identify the immune response associated with the protective capacity. Crossbred pigs were purchased in a rural farm in the state of Puebla and transferred to the farm of the Veterinary School of the Universidad Nacional Autónoma de Mexico in Mexico City where they were kept under controlled sanitary condition to prevent infections. The pigs were vaccinated with S3Pvac; another group of pigs were vaccinated with individual peptides and a control group of pigs were vaccinated with adjuvant alone. All animals were bled at different times after the vaccination for 51 days. Specific antibodies were detected after the second immunization. The proliferative response and the cytokines levels were determined in the Peripheral Blood Mononuclear Cells and in their supernatants after specific stimulation in vitro with each one of the peptides and with *Taenia solium*

antigen. Although specific proliferative responses were detected in some pigs, high individual variation and low specific stimulation indices were observed. Somewhat clearer were the increases in the cytokines IL-2 and IFN- γ levels that indicate a Th1 response induced by S3Pvac vaccination.

We were able to demonstrate that antibodies to GK-1 peptide, but not to KETc-1 or KETc-12, are capable of damaging *Taenia solium* cysticerci and inhibit their capacity to transform into *taenia* after being orally administered in experimental hamsters.

The vaccination with (CPhV) induced a cellular and humoral immune response when it was administered in oral and subcutaneous form to crossbred pigs in captivity. It also induced a low level of antibodies and a specific peptide and antigen proliferative response with production of INF- γ and IL-4 in the supernatants of cultured PBMCs of immunized pigs. In this mixed Th1/Th2 response, the production of INF- γ promotes a response Th1 that is apparently the result of peptides-specific immune activation, while the production of IL-4 is induced by the M13phage itself. The immunogenicity of this recombinant phage, together with the low cost of their production makes it a realistic candidate to be tested in rustic pigs as an anticysticercus phage vaccine for field trials.

II. INTRODUCCIÓN

La cisticercosis es una enfermedad parasitaria causada por el establecimiento del estadio larvario de la *Taenia solium* que afecta principalmente al hombre y al cerdo. El parásito puede establecerse en diferentes tejidos como músculo esquelético, corazón, tejido subcutáneo y ojo. En América la forma grave de localización en el humano es en el sistema nervioso central (SNC) en donde ocasiona la neurocisticercosis (NC). Esta es la forma grave de la enfermedad y que constituye un gran problema de salud pública que prevalece tanto en áreas urbanas como rurales, donde se asocian a las prácticas tradicionales de crianza de cerdos, malas condiciones sanitarias e higiénicas, ignorancia, pobreza y fecalismo al ras del suelo (Del Bruto *et al.*, 1998, 2001; Sciutto *et al.*, 2000; Aluja *et al.*, 1982). Esta parasitosis se encuentra ampliamente distribuida en África, Asia y América Latina (Fig.1), donde representa un serio problema socioeconómico. El aumento de inmigrantes de áreas endémicas ha causado una mayor incidencia de esta enfermedad parasitaria en países económicamente desarrollados como Estados Unidos, donde se han reportado cientos de casos en los últimos años (Mc Cornick *et al.*, 1982; Cuetter *et al.*, 1992, Ong *et al.*, 2002).

Debido a que el diagnóstico de NC requiere de estudios imagenológicos de alto costo y baja accesibilidad para ser aplicados a la población general no existen estudios amplios sobre su prevalencia. Los reportes de prevalencia de NC más confiables provienen de datos de autopsias. En México, en diferentes series de necropsias se reportan frecuencias de hasta 8.6 % en Hospitales de Especialidades y de entre el 2 y 3% en necropsias de hospitales generales (Secretaria de Salud 1994-1996). Existen algunos estudios epidemiológicos utilizando tomografía axial computarizada, desarrollados en comunidades rurales en Honduras y México en las que se reportan prevalencias del 8 al 10% (Sánchez *et al.*, 1999, Fleury *et al.*, 2003).

La NC puede considerarse activa o inactiva de acuerdo a la apariencia imagenológica del parásito. La forma activa se considera cuando se detecta la presencia del parásito vesicular y la inactiva se caracteriza por la presencia de cisticercos calcificados. Las manifestaciones clínicas son variadas y no específicas, dependiendo del número, edad y localización de los cisticercos y a la respuesta inmunológica generada en el hospedero (Rosenfeld *et al.*, 2003).

Además de afectar la salud humana, la NC tiene un impacto económico importante como resultado del elevado costo para el diagnóstico

y seguimiento del tratamiento que requiere estudios imagenológicos y cada vez menos de intervenciones quirúrgicas en los casos en que se asocia a hipertensión craneana. Si bien el tratamiento resulta eficaz para la destrucción de los parásitos, es frecuente que esta parasitosis deje secuelas de por vida, con un alto grado de morbilidad y las consecuencias que esto implica tanto para la calidad de vida de los pacientes como en términos económicos. En México se estima un costo mínimo por admisión hospitalaria y tratamiento para pacientes con neurocisticercosis de US \$17 millones anualmente, y una pérdida económica por cisticercosis porcina de US \$164 millones al año para toda la América Latina (Murrell *et al.*, 1991).

En la porcicultura rústica o de traspatio, esta parasitosis implica importantes pérdidas económicas, en especial para los productores marginados quienes practican esta forma de crianza. La cisticercosis porcina es causa de decomiso de la canal infectada, lo que promueve que los cerdos criados rústicamente y con alta probabilidad de estar infectados (5 al 30%) se consuman sin inspección sanitaria a un precio menor que el que pudiese acceder en el mercado. Estos factores favorecen la transmisión de la enfermedad y castigan económicamente al productor rústico.

Considerando que la taeniasis-cisticercosis es una enfermedad de la pobreza, mejorar las condiciones socioeconómicas de las comunidades

rurales implicaría el control definitivo de esta enfermedad. Diferentes intervenciones biotecnológicas se han contemplado para evitar la transmisión, desde aquéllas orientadas hacia el tratamiento masivo o selectivo de individuos portadores de *Taenia*, hasta estrategias para reducir la prevalencia de la cisticercosis porcina. Al respecto de programas de tratamiento masivo deberían ser aplicados con medidas complementarias a fin de no aumentar el riesgo de contaminación del medio ambiente por los huevos liberados por el tratamiento, evento que podría tener resultados contrarios a los esperados (Keilbach *et al.*, 1989). Recientemente, se han desarrollado procedimientos específicos para detectar portadores sanos de *Taenia solium* por ELISA y PCR en heces, sin embargo aún no se conoce su capacidad diagnóstica aplicada en campo (González *et al.*, 2000).

Entre las estrategias biotecnológicas para el control de la cisticercosis porcina, la inmunización del cerdo es el método que promete mucho éxito. Desde hace más de 20 años se ha estado estudiando la respuesta inmunológica contra *T. solium* en el cerdo con el objeto de producir una vacuna contra esta enfermedad. Para este propósito se han evaluado un conjunto variado de antígenos, desde mezcla de antígenos de todo el cisticerco, antígenos específicos de algún estadio, hasta antígenos heterólogos, y recombinantes (Molinari *et al.*, 1993, 1997, Nacimiento *et al.*, 1995, Plancarte *et al.*, 1999, Huerta *et al.*, 2002). El uso de antígenos

heterólogos (*T. ovis*, *T. crassiceps*, *T. saginata*) se justifica considerando que se ha encontrado que los céstodos comparten gran parte de su contenido antigénico y por la gran similitud de la historia natural y patología de las cestodiasis.

Con respecto a la identificación de antígenos con potencial para la composición de una vacuna, un método conveniente de selección, puede ser el desafío experimental de los cerdos. Sin embargo, sólo debe considerarse como una primera etapa de evaluación y en todos los casos se requiere determinar su capacidad protectora en condiciones reales de transmisión. En este sentido en condiciones naturales se ha encontrado que la población de cerdos es genéticamente heterogénea, con diferentes susceptibilidades a la cisticercosis, aspecto que se ha podido comprobar en desafíos experimentales (Huerta *et al.*, 2000). Las diferencias de susceptibilidad genéticamente determinadas permiten considerar la incorporación de razas más resistentes o su producción a través de transgénesis. Recientemente se ha identificado un gen asociado a la resistencia en cisticercosis en un modelo experimental murino de cisticercosis causado por *Taenia crassiceps* (Fragoso *et al.*, 1998). El conocimiento de los factores involucrados en la transmisión, el uso de un tratamiento efectivo contra la teniasis y la aplicación de vacunas efectivas de bajo costo contra la cisticercosis porcina, podrían introducirse en un futuro no lejano, para la aplicación de un programa efectivo de erradicación de cisticercosis por *Taenia solium* (Sarti *et*

al., 2003), que debe incluir, medidas higienicas, inspección sanitaria de toda la carne y educación.

CICLO DE VIDA DE *Taenia solium*

En el ciclo de vida de *T. solium* se distinguen dos etapas; la primera ocurre en el hospedero intermediario y la segunda en el definitivo (Fig 2). El ser humano es el único hospedero definitivo del gusano adulto y es el responsable de la infección de los hospederos intermediarios humano, porcino y otros mamíferos (Hoberg *et al.*, 2000).

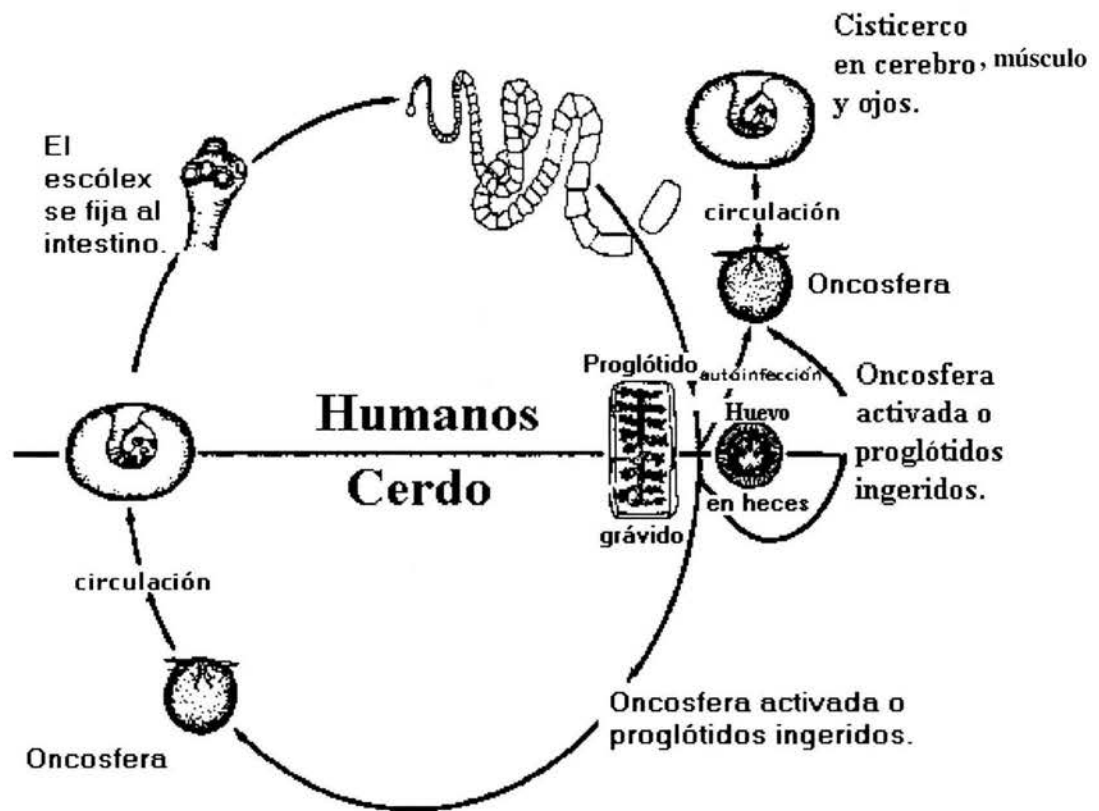


Figura 2. Ciclo de vida de la *Taenia solium*. (Tomado con modificaciones de: <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Taeniasis.htm>).

Cuando ocurre la ingestión de los huevos de *T. solium* (Fig. 3) por el hospedero intermediario, las enzimas proteolíticas del estómago e intestino destruyen al embrióforo (una de las envolturas que protegen al embrión para sobrevivir en el medio ambiente) liberándolo (Laclette *et al.*, 1982, Silverman

et al., 1954), Se cree que el embrión hexacanto activado (también conocido como oncosfera) atraviesa la mucosa intestinal por la acción combinada de sus ganchos (Gemmell *et al.*, 1982) y de secreciones líticas (enzimas hidrolíticas) que digieren la mucosa y atraviezan la barrera intestinal. Posteriormente, el embrión alcanza los capilares sanguíneos y linfáticos que lo llevan a diferentes órganos, en donde se desarrolla hasta convertirse en un cisticerco en el curso de 2 meses.

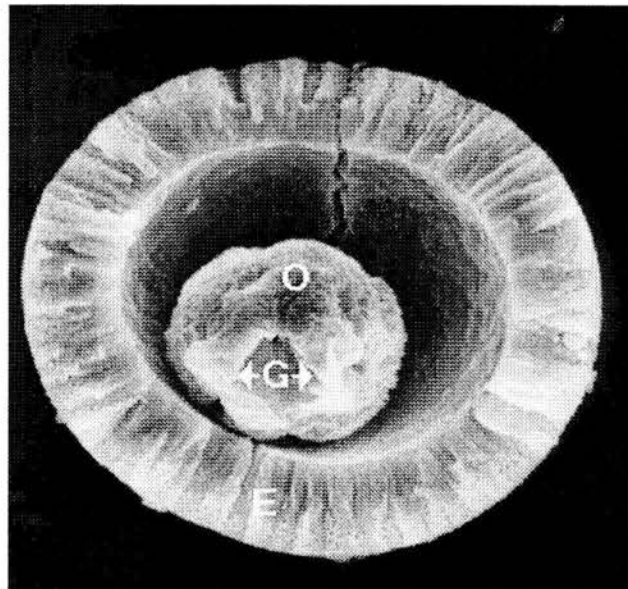


Figura 3. Micrografía electrónica de barrido de un huevo de *Taenia solium*. E: embrióforo, G: ganchos oncosferales, O: oncosfera (cortesía Dr. J. P. Lalette).

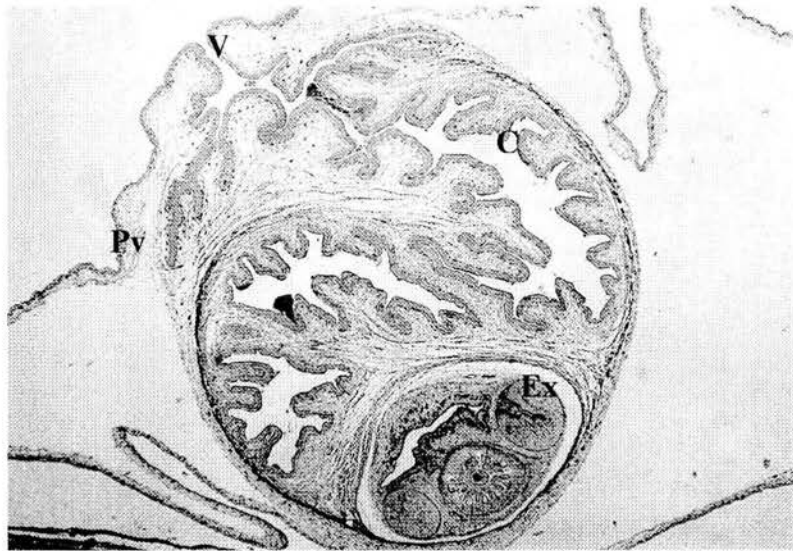


Figura 4. Microfotografía de un corte de la larva o cisticerco de *Taenia solium*. C: canal espiral, Ex: escólex, Pv: pared vesicular y V: espacio vestibular (cortesía Dra. Aline S. de Aluja)

El cisticerco (Fig. 4) es una vesícula translúcida, ovoide o circular de 5 a 10 mm de diámetro con un pequeño escólex invaginado, que puede permanecer en los tejidos del hospedero intermediario durante varios años (Dixon *et al.*, 1944, 1961), rodeado por una cápsula de tejido conectivo formada por el hospedero. La vesícula está llena de un fluido transparente que contiene proteínas del parásito y del huésped (Ambrosio *et al.*, 1994). La pared de la vesícula, es una estructura membranosa compuesta de tres capas, tegumentaria o externa, celular o media y reticular o interna. Cabe notar que el tegumento es el sitio de contacto del parásito con el hospedero y

desempeña un papel central en el mantenimiento de la relación hospedero-parásito.

El ciclo de vida se completa cuando el ser humano consume carne de cerdo infectada e ingiere uno o varios cisticercos viables. Las sales biliares y las proteasas digestivas inducen la salida o evaginación del escólex (Cañedo *et al.*, 1982). Una vez evaginado, el escólex (Fig. 5) se fija en la pared del yeyuno por medio de sus ventosas y ganchos rostelares (Merchant, willms *et al* 1998). A partir del escólex comienza a crecer el estróbilo formado por los segmentos o proglótidos, que maduran y se diferencian hasta convertirse en segmentos grávidos.

La tenia adulta mide entre 1.5 m y 8 m (Pumarola *et al.*, 1984) de longitud y su cuerpo esta formado por el escólex, el cuello y el estróbilo. El estróbilo es una cadena de segmentos o proglótidos que se desarrollan a partir del tejido germinal en el cuello (Willms *et al.*, 2001).

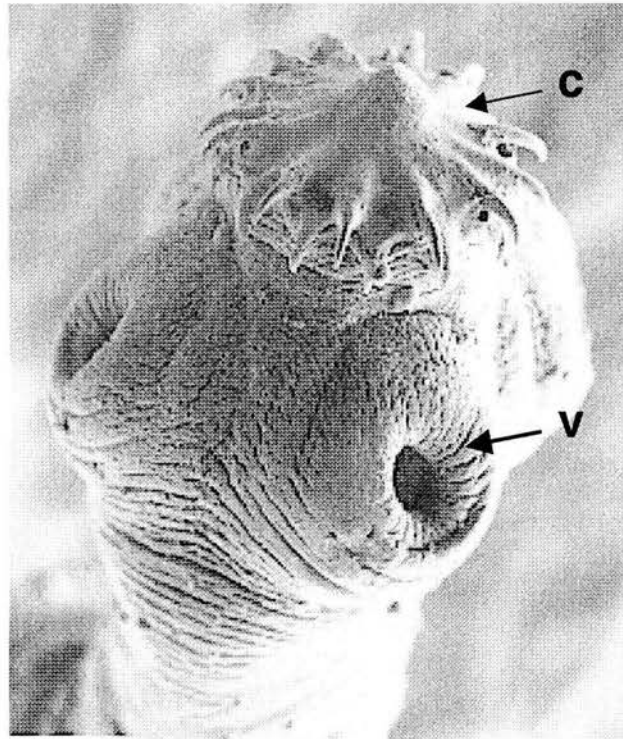


Figura 5. Micrografía electrónica de barrido del escólex de *Taenia solium* (tomado de Google cortesía del Dr. José Luis Molinari)

Los proglótidos poseen cientos de testículos y un ovario trilobulado (Fig. 6).

Los proglótidos maduros se encuentran en la parte final de la tenia y en ellos se distingue el útero con sus ramificaciones, que en la *T. solium* son de 7-16 y en la *T. saginata* son hasta 32 (14-32). El útero en los proglótidos maduros contiene miles de huevos, los que son fecundados en el mismo proglótido por los espermatozoides formados en el testículo (Sónlsby 1987) para producir hasta 50,000 huevos infectantes (Aluja *et al.*, 1987). La contaminación de aguas y alimentos con los huevos es favorecida por el

fecalismo al aire libre, el hacinamiento y la falta de higiene personal. Se ha demostrado que el principal factor de riesgo es la presencia de un portador de tenia en el ambiente cercano (Sarti *et al* 1992, 1994, Schantz *et al.*, 1994). El ciclo de vida se cierra cuando el hospedero intermediario ingiere los huevos que contaminan alimentos y agua.

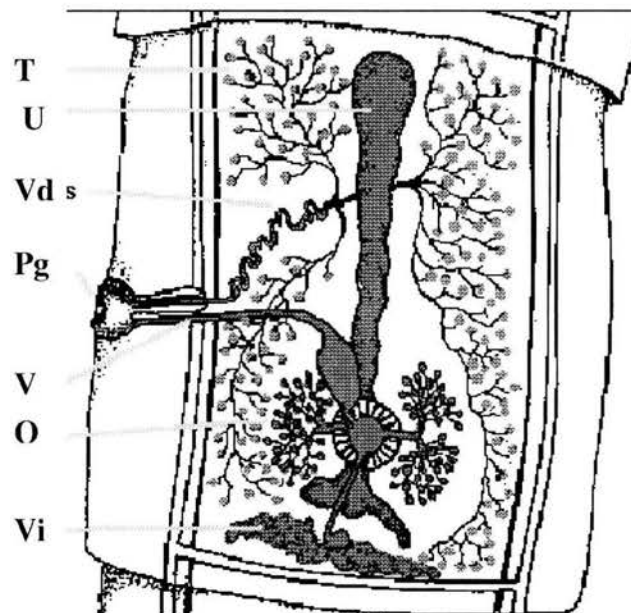


Figura 6. Representación esquemática de un proglótido de *Taenia solium*, enfatizando al aparato reproductor. T: testículos, U: útero, Vd: vasos deferentes, Pg: poro genital, V: vagina, O: ovario trilobulado, y Vi: vitelaria (tomado de Parasites and Parasitological Resources).

CICLO DE VIDA DE *Taenia crassiceps*

En el estudio de la cisticercosis se han empleado distintos modelos experimentales para ahondar en los mecanismos inmunológicos, sexuales y genéticos que participan o condicionan esta parasitosis. El modelo experimental más utilizado ha sido la cisticercosis murina causada por el cisticerco de *Taenia crassiceps*, cuya forma adulta se ha localizado en la naturaleza en el intestino de cánidos y félidos de Europa y Estados Unidos (Freeman 1962).

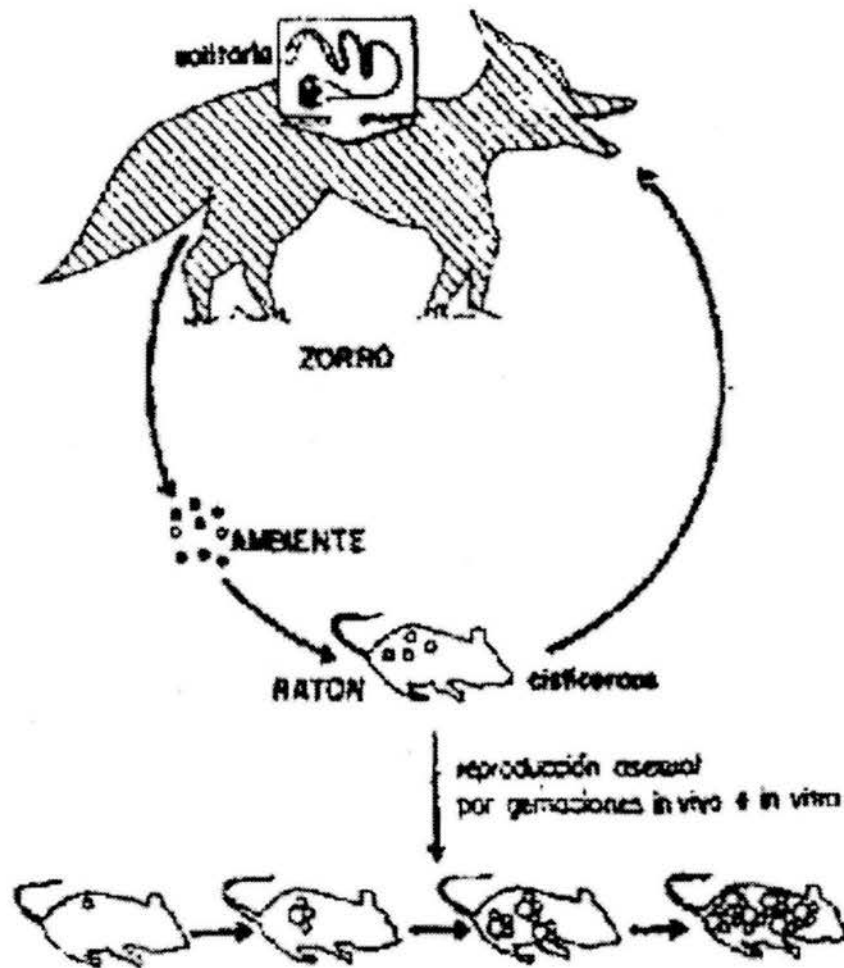


Figura 7. Ciclo de vida de la *Taenia crassiceps*

El metacéstodo, o cisticercos cuando se desarrolla completamente, es encontrado parenteralmente en roedores y con menos frecuencia en herbívoros, carnívoros y primates (Abuladze 1964). En los roedores naturalmente infectados, los cisticercos se instalan subcutáneamente cerca de la axila, en la caja torácica, o en el cuello, y con menor frecuencia entre la

escapula o en la región inguinal. En algunos hospederos el cisticerco se puede desarrollar en el sistema nervioso central (Freeman et al., 1973).

La *T. crassiceps* puede reproducirse en forma sexuada, este ciclo incluye 2 hospederos, el hospedero intermediario, roedores, los cuales adquieren la infección al ingerir huevos dispersos en el medio ambiente (Fig. 7), provenientes de heces de cánidos infectados por la tenia adulta.

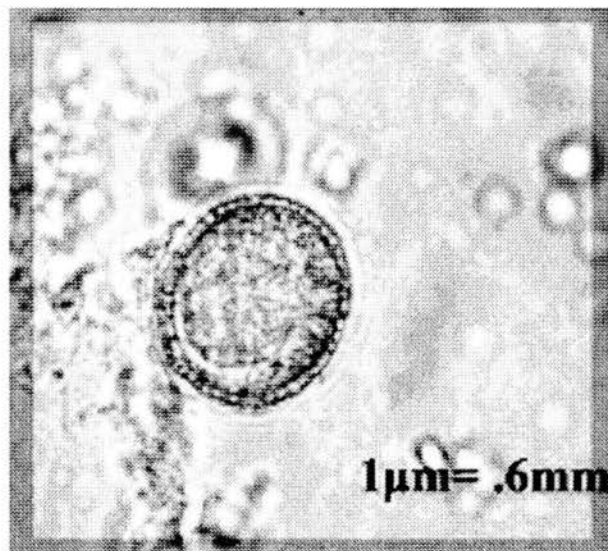


Figura 8. Microfotografía de un huevo de *Taenia crassiceps* (preparación en fresco) (cortesía de la Dra. Kaethe Willms).

Después de que el roedor ingiere el huevo, el embrióforo de éste (Fig. 8) es removido por los jugos digestivos en el intestino; las oncosferas eclosionan de los huevos atraviezan el epitelio intestinal originando

cisticercos (Fig.9), que podemos encontrarlos en cuello y axilas y en tejidos subcutáneos.

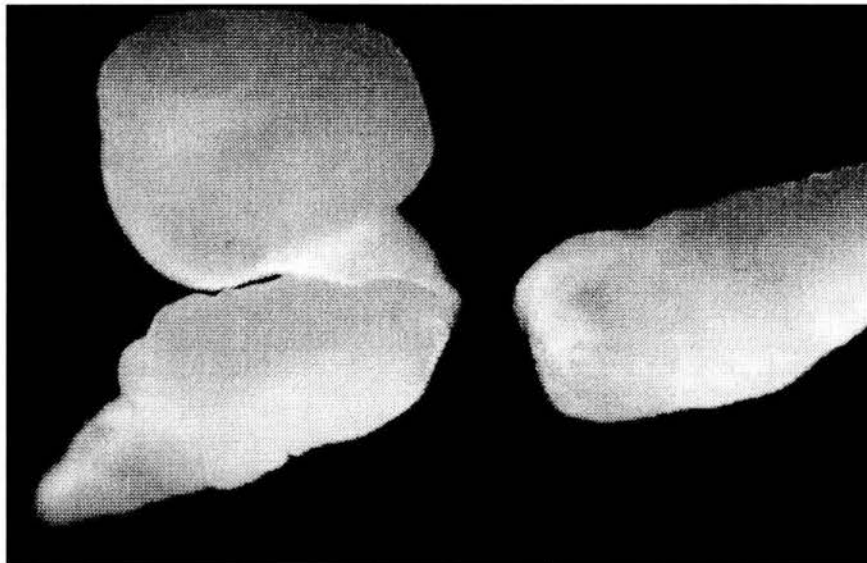


Figura 9. Cisticercos de *Taenia crassiceps* obtenidos de la cavidad peritoneal de un ratón BALB/cAnN infectado.

Cuando un ratón infectado es devorado por algún cánido o félido (hospedero definitivo), los cisticercos se instalan en el intestino y se desarrolla el gusano o estróbilo (Abuladze 1964).

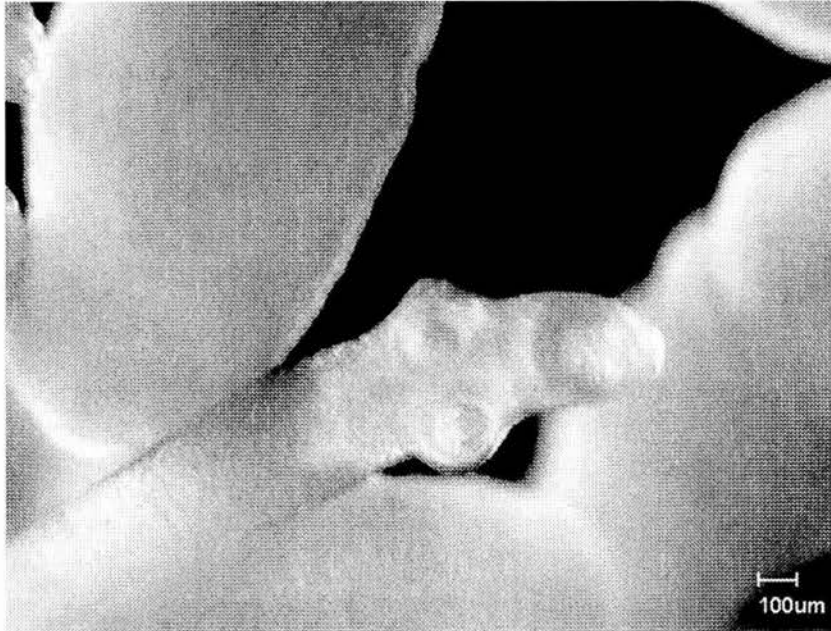


Figura 10. *Taenia crassiceps* obtenida por cultivo *in vitro*.

El parásito adulto (Fig. 10) mide de 70-140 mm y al alcanzar la madurez sexual la tenia produce huevos infectivos, los cuales serán ingeridos por el hospedero intermediario (ratón) cerrando de este modo el ciclo de vida del parásito. Este es un típico ciclo de vida de tenia con dos hospederos. El cisticerco tiene además, la capacidad de reproducirse asexualmente por gemación cuando se inocula intraperitonealmente en ratones (Freeman 1962). Este tipo de reproducción asexual no es común

entre céstodos, por lo que este modelo ha resultado ser muy adecuado para avanzar en el conocimiento de los factores inmunológicos (Robinson *et al.*, 1997; Terrazas *et al.*, 1999; Toenjes *et al.*, 1999), genéticos (Sciutto *et al.*, 1991; Fragoso *et al.*, 1996, 1998) y sexuales (Bojalil *et al.*, 1993; Larralde *et al.*, 1995) implicados en la resistencia y/o susceptibilidad a la cisticercosis.

El cisticerco hemos logrado mantenerlo *in vitro* durante varias semanas, ofreciendo la posibilidad de realizar varios ensayos de experimentación, como estudios de su biología, pruebas de susceptibilidad o resistencia a drogas en diferentes fases de su desarrollo, o bien estudiar sus productos de secreción etc. (Fig. 11).

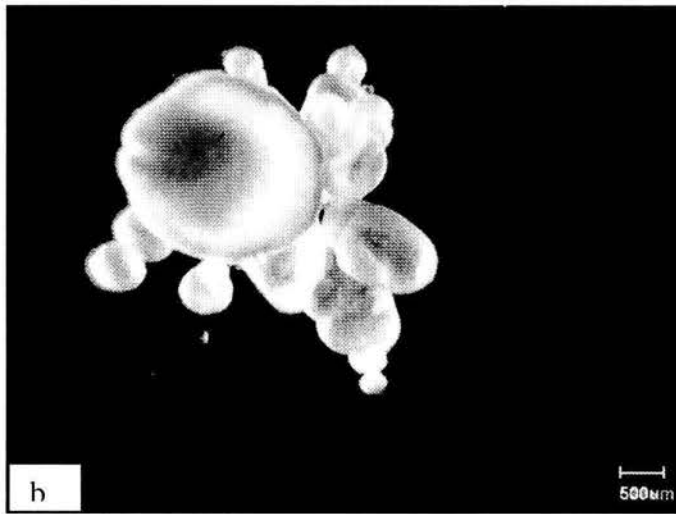
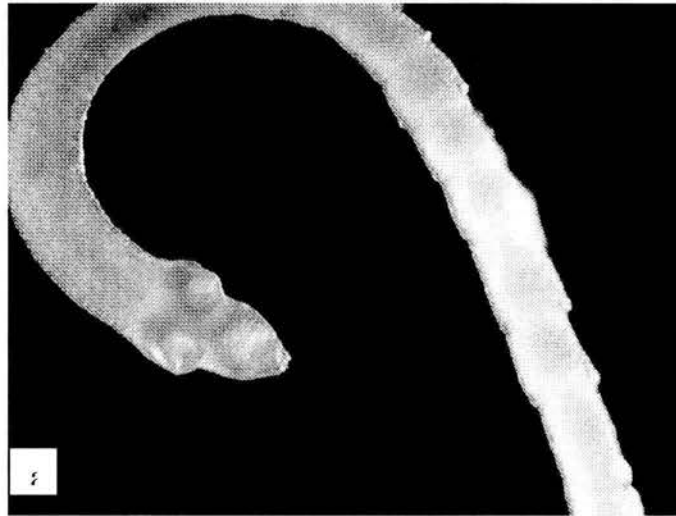


Figura 11. *T. crassiceps* mantenida en cultivo. a) Taenia adulta, b) cisticerco en proceso de gemación.

III. Antecedentes

Medidas de prevención y control de la cisticercosis por *Taenia solium*

La taeniasis y la cisticercosis son causadas por el céstodo de la *Taenia solium*. Esta zoonosis representa un problema de salud pública en países en desarrollo en las que las condiciones sociales, económicas y culturales favorecen el ciclo de transmisión.

Se ha propuesto por la OMS que esta zoonosis es potencialmente erradicable ya que:

- (1) el parásito adulto de la *Taenia solium* vive exclusivamente en el humano
- (2) la taeniasis es la única fuente de infección para el hospedero intermediario
- (3) la cisticercosis porcina puede ser controlada
- (4) no hay reservorios silvestres
- (5) hay tratamientos eficientes en contra de la taeniasis y cisticercosis (Schantz *et al.*, 1993).

Considerando este panorama se han propuesto diferentes estrategias como medidas de prevención y control de esta parasitosis. Entre ellas figura el tratamiento masivo para eliminar a los portadores teniásicos. Para este propósito se han estudiado diferentes drogas, entre las figuran la niclosamida, el praziquantel y el albendazol. La niclosamida actúa directamente sobre los proglótidos, haciéndolos más susceptibles a la acción

de las enzimas proteolíticas del hospedero. No parece tener acción sobre los huevos, ni contra los cisticercos. El uso de este medicamento presenta serios riesgos epidemiológicos pudiendo aumentar la presión de infección del ambiente y el riesgo potencial de contraer cisticercosis, pues destruye los proglótidos y libera los huevos aparentemente viables al medio (Garattini *et al.*, 1982, Bundy *et al.*, 1990).

El praziquantel es el medicamento más utilizado en los tratamientos masivos, y aunque no se conoce bien su mecanismo de acción, se sugiere que lesiona el tegumento del parásito adulto y de la larva interfiriendo con los canales iónicos, principalmente del calcio (Botero *et al.*, 1982). En Ecuador se utilizó como tratamiento aplicándolo a más de 10 000 personas con dosis oral única de praziquantel de 10 mg/kg de peso. Un año después del tratamiento masivo, la prevalencia de cisticercosis en cerdos de rastros registró una disminución (de 11.4 a 2.6%). Sin embargo, dos años después del tratamiento masivo los porcentajes de cisticercosis porcina volvieron a registrarse aumentados (Cruz *et al.*, 1989, Sarti *et al.*, 1997). Un comportamiento similar se observó en una comunidad de Sinaloa de aproximadamente 2000 habitantes, después de la administración de un tratamiento masivo con praziquantel (Díaz *et al.*, 1991). En otra comunidad del Estado de Guerrero, de 1500 habitantes aproximadamente, la

cisticercosis porcina aumentó casi al doble un año después de haber suministrado praziquantel a la población (Keilbach et al., 1989).

Se han diseñado otros estudios para comparar el efecto del tratamiento masivo con otras posibles estrategias, como la aplicación de campañas de educación para la salud con énfasis en el conocimiento de la existencia de la teniasis/cisticercosis y los factores que la predisponen. Para este propósito de 1993 a 1995 en tres comunidades rurales de Morelos, se evaluaron a corto plazo (seis meses) dos estrategias de intervención (tratamiento masivo con praziquantel y educación para la salud). Los resultados más importantes muestran que en la comunidad donde se ofreció tratamiento masivo se logró una reducción importante de la teniosis, pero no de la contaminación ambiental medida por la frecuencia de cisticercosis porcina. Mientras tanto, en la comunidad que recibió educación para la salud se observaron reducciones importantes tanto de la teniosis como de la cisticercosis porcina. En la comunidad que recibió tratamiento masivo y educación para la salud se encontró una reducción importante de la infección humana con resultados discordantes en contaminación ambiental (Sarti *et al.*, 1997, 2003, Flisser *et al.*, 2003). Cabe señalar que considerando las limitaciones existentes para el diagnóstico sensible y específico de teniosis los resultados obtenidos al respecto del efecto en este parámetro deben considerarse con precaución más confiable resulta el efecto en prevalencia de cisticercosis porcina

detectada por inspección en la lengua, considerando que este procedimiento es altamente específico cuando se practica por personal entrenado para tal fin con reportes previos en los que se determinó que el procedimiento presenta una sensibilidad del 50 al 60%.

A pesar de las expectativas optimistas utilizando el tratamiento masivo del teniásico, las experiencias mencionadas señalan la reversibilidad del efecto del tratamiento masivo. La baja eficiencia de esta medida de control, al menos utilizada en forma exclusiva, parece esperable considerando la extensa migración de individuos entre comunidades con la consecuente migración de teniásicos y la falta de inmunidad adquirida en la infección con la fase adulta del parásito. Además es de interés señalar el riesgo potencial de aumentar la presión infectiva del ambiente con la eliminación de mayor cantidad de tenias en especial que los efectos del tratamiento en la teniasis no se han explorado extensamente.

Otra medida alternativa para la prevención y control de esta parasitosis es el uso de vacunas contra la cisticercosis porcina. Así, se han desarrollado varias vacunas para inmunizar al cerdo hospedero intermediario con el propósito de disminuir la incidencia de la enfermedad en el cerdo y en el humano. Entre las vacunas desarrolladas figura la basada en antígenos totales de cisticercos enteros de *T. solium* (Molinari *et al.*, 1993), en

antígenos de escolex (Kumar et al. 1987, Nascimento et al. 1995), en las bandas de 56, 66, y 74 kDa obtenidas de fluido vesicular de *T. crassiceps* (Manoutcharian et al. 1996), antígenos de secreción y excreción de cultivo de oncosferas o extractos crudos de oncosferas de *T. solium* (Phatak & Gaur 1990, Plancarte et al. 1999), antígenos recombinantes de *T. ovis* (Plancarte et al. 1999), en antígenos sintéticos o expresados en forma de antígenos recombinantes en un fago filamentoso (Manoutcharian et al., 2004) (Tabla I).

Tabla I. VACUNAS CONTRA LA CISTICERCOSIS POR *Taenia solium*

Referencia	Vacuna	Desafío	% de protección
Molinari 1993	Extracto crudo de cisticerco de <i>T. solium</i>	Experimental	86
Nacimiento 1995	Extracto de escolex de cisticerco de <i>T. solium</i>	Experimental	71.4
Manoutcharian 1996	F luido vesicular, bandas de geles de 56, 66 y 74 kDa de cisticercos de <i>T. crassiceps</i>	Experimental	96
Molinari 1997	Extracto de cisticercos de <i>T. solium</i>	Campo	82
Plancarte 1999	Antígeno recombinante <i>T. ovis</i> , extracto de oncosferas	Experimental	93
Huerta 2002	Péptidos sintéticos KETc-1, 12 y GK-1	Campo	97.9
Manoutcharian/2003	Fagos filamentosos	Experimental	87

Como se observa en la Tabla I diferentes antígenos han inducido altos niveles de protección lo que sugiere la vulnerabilidad del parásito a la exacerbación de la respuesta inmune. También se observa que la mayor parte de los antígenos evaluados han sido en condiciones experimentales, esto a pesar de las dificultades de identificar individuos teniásicos para la disposición de huevos para infecciones experimentales. En efecto, para realizar estudios de vacunación contra *Taenia solium* se debe contar con un gran número de huevos para desafiar a los animales inmunizados, y los huevos sólo pueden obtenerse de pacientes con teniosis. Ésta ha sido probablemente la dificultad más grande para avanzar en este proyecto. Por tal razón se ha tratado de obtener un modelo experimental de teniasis. Los resultados más promisorios se obtuvieron infectando chinchillas inmunodeprimidas con cisticercos de *Taenia solium*, en las que se logró desarrollar una taenia con proglótidos grávidos según se confirmó por su capacidad de infectar un cerdo (Maravilla *et al.* 1998). Si este modelo logra reproducirse extensamente, se podrá considerar como una alternativa importante para el suministro de huevos de *Taenia solium*.

Las dos únicas vacunas que han sido evaluadas en campo en condiciones naturales de transmisión, requisito indispensable para confirmar

su utilidad son la desarrollada por Molinari y col (1993) y la vacuna sintética (Huerta *et al.*, 2002). La validación en campo resulta esencial considerando las características de los hospederos a proteger así como las circunstancias de la exposición. Los cerdos a los que está destinada la vacuna son extremadamente heterogéneos genéticamente, en su estado nutritivo, condiciones de stress y están expuestos a múltiples infecciones virales, bacterianas y parasitarias y al respecto de la cisticercosis probablemente estén expuestas a múltiples desafíos de diferente tamaño.

El efecto de la vacuna desarrollada por Molinari y colaboradores (1983b) fue observado macro y microscópicamente. En estos estudios se reportó que los cisticercos de cerdos vacunados infectados naturalmente presentaban infiltrados con presencia de eosinófilos y diferentes grados de necrosis después de la inmunización con un extracto crudo de cisticerco de *T. solium*. La aplicación de esta vacuna se realizó en un total de 3295 cerdos en 18 comunidades rurales endémicas de México quienes recibieron el mismo extracto (Molinari *et al.*, 1993). Doce meses después de la vacunación no se detectaron cerdos cisticercosos en esas comunidades después de la inspección de cientos de animales revisados (Molinari *et al.* 1993). Estos resultados son muy alentadores y señalan nuevamente la vulnerabilidad del parásito a la vacunación.

Sciutto y colaboradores desarrollaron una vacuna subunitaria contra la cisticercosis porcina constituida por tres péptidos sintéticos que ha sido también evaluada en campo con resultados muy satisfactorios. Esta vacuna se está actualmente evaluando en formas alternativas de presentación para reducir su costo de producción masiva utilizando diferentes estrategias entre las que figura la expresión en fagos filamentosos (Manoutcharian *et al.*, 2004)

Otra alternativa para el control es el tratamiento de los cerdos cisticercosos. Esta forma de intervención ha sido extensamente evaluada por el grupo peruano quienes han demostrado la utilidad de drogas de bajo costo. Sin embargo, esta medida requiere esperar el efecto del tratamiento que se reporta de por lo menos dos meses después de su aplicación lo que limita su utilidad en campo (González *et al.*, 1998,2001).

Desarrollo de la vacuna sintética

Etapas de la investigación que permitieron la identificación de los tres péptidos protectores en contra de cisticercosis que constituyen la vacuna sintética desarrollada contra la cisticercosis porcina.

1. Desarrollo de un modelo experimental para la identificación de los antígenos para su posible aplicación contra la cisticercosis

Considerando las dificultades económicas y logísticas involucradas en la experimentación con cerdos, decidimos utilizar la cisticercosis murina por *Taenia crassiceps* (Freeman, 1962), como modelo experimental de cisticercosis. Este cisticerco tiene un ciclo de vida similar al de la *Taenia solium*, siendo sus hospederos intermediarios un conjunto extenso de roedores y sus hospederos definitivos los cánidos y félidos. Tanto los cisticercos como las tenias de ambas especies presentan una estructura macroscópica similar, con algunas diferencias: los cisticercos de *Taenia crassiceps* son más pequeños y además presentan una característica única que es su capacidad de dividirse por gemación polar múltiple. Este parásito se reproduce rápidamente en la cavidad peritoneal de ratones, ofreciendo así una importante fuente de antígenos obtenidos bajo condiciones experimentales controladas. Así, después de sólo algunos meses de infección pueden recuperarse a partir de la cavidad peritoneal de cada ratón infectado varios gramos de antígenos. Este hecho, aunado a que los antígenos presentan una extensa reactividad cruzada con los antígenos de cisticercos de *T. solium* (Larralde *et al.*, 1989), nos alentó en el empleo de los antígenos del cisticerco murino a fin de evaluar su capacidad de prevenir la cisticercosis porcina.

Este modelo nos ha permitido además profundizar en el conocimiento de la biología del parásito (Toledo *et al.*, 1997), así como investigar la participación

de factores genéticos (Sciutto *et al.*, 1991, Fragoso *et al.*, 1996, 1998), inmunológicos (Sciutto *et al.*, 1995, Aluja *et al.*, 1996, Terrazas *et al.*, 1997) y sexuales (Larralde *et al.*, 1995) en la infección. La utilización de los antígenos del cisticercos murino ha permitido además, avanzar en el inmunodiagnóstico de la parasitosis (Larralde *et al.*, 1989, 1990, 1992).

2. Protección con antígenos de *Taenia crassiceps* o de *Taenia solium* contra la cisticercosis murina.

La capacidad protectora de los diferentes inmunógenos se evaluó en ratones de la cepa BALB/cAnN, los cuales se inmunizaron con los inmunógenos a evaluar. Quince días después de la inmunización, los ratones se desafiaron intraperitonealmente con 10 cisticercos de *Taenia crassiceps* cepa ORF y 30 días después se sacrificaron humanitariamente, y se determinó el número de cisticercos en la cavidad peritoneal de cada ratón infectado. El número de parásitos obtenido en los ratones inmunizados se comparó con el observado en ratones no inmunizados.

En los primeros estudios se evaluó la capacidad protectora de los antígenos de los extractos totales de larvas de *Taenia crassiceps* y de *Taenia solium*, utilizando el modelo murino de cisticercosis. Ambos extractos antigénicos protegieron efectivamente a los ratones contra la cisticercosis por *Taenia crassiceps* (Sciutto *et al.*, 1990). Esta observación permitió suponer que los

antígenos de *Taenia crassiceps* podrían conferir protección contra la cisticercosis porcina.

3. Protección con antígenos de cisticercos de *Taenia crassiceps* en contra de la cisticercosis porcina.

Considerando los hallazgos anteriores, se evaluó en forma experimental si los antígenos de *Taenia crassiceps* eran capaces de proteger contra la cisticercosis porcina por *Taenia solium* (Sciutto *et al.*, 1995). La vacunación con extractos de cisticercos completos de *Taenia crassiceps* utilizados (400 µg/kg de peso), redujo en un 58% la carga parasitaria de los cerdos desafiados experimentalmente con huevecillos de *Taenia solium* administrados por vía oral. Este resultado demostró que los antígenos del cisticerco murino son capaces de proteger contra la cisticercosis porcina e indica que el modelo de cisticercosis murina es adecuado para identificar antígenos de interés en vacunación. Sin embargo, el empleo de antígenos de extractos de cisticercos completos para vacunación, en este caso, no es un método ideal, ya que en experimentos adicionales encontramos que el efecto de la inmunización en el desarrollo de la parasitosis depende de la dosis de antígeno empleada. Así, la dosis de 4 mg/kg de peso indujo facilitación de la parasitosis, incrementándose la carga parasitaria en los animales inmunizados en más del 50% con respecto a los controles no inmunizados

(Sciutto *et al.*, 1995). Considerando estos hallazgos se decidió identificar los antígenos protectores presentes en este complejo extracto antigénico.

4. Identificación de las fracciones antigénicas que inducen protección en la cisticercosis por *Taenia crassiceps*.

Con el fin de optimizar la vacuna se obtuvieron fracciones antigénicas separadas en geles de acrilamida (7 y 15%) por diferencias en peso molecular. A partir de los antígenos solubles del cisticerco de *T. crassiceps* se obtuvieron 12 fracciones antigénicas para su evaluación. Tres fracciones antigénicas de 56, 66 y 74 kDa indujeron los mayores niveles de protección (Valdez *et al.*, 1994). Estas fracciones se utilizaron de manera conjunta como inmunógeno para tratar de proteger al cerdo contra la cisticercosis por *T. solium*. Los resultados mostraron que la inmunización redujo muy importantemente la carga parasitaria, obteniéndose 0.16 cisticercos en promedio en los animales vacunados a diferencia de 5 en los no vacunados, con lo que se confirmó su capacidad protectora (Manoutcharian *et al.*, 1995). Esta metodología permitió entonces identificar los antígenos protectores en el conjunto de antígenos de cisticercos de *Taenia crassiceps*. Sin embargo, esta metodología no es adecuada para la obtención de antígenos por requerir grandes cantidades de los mismos para ser utilizados en vacunación masiva, por lo que se decidió producirlos por métodos de DNA recombinante.

5. Identificación de antígenos recombinantes protectores contra cisticercosis

Se construyó una biblioteca de cADN en el vector Uni-ZapXR utilizando ARNm de cisticercos de *Taenia crassiceps*. A partir de esta biblioteca se seleccionaron trece clonas recombinantes por inmunodetección utilizando sueros específicos producidos en conejo en contra de las fracciones antigénicas protectoras de 56, 66 y 74 kDa. De las clonas identificadas se seleccionaron aquéllas que también fueran reconocidas por sueros de cerdos infectados con cisticercos de *Taenia solium*, asegurándose así que las clonas codifican antígenos de *T. crassiceps* homólogos a los de *T. solium*, lo que los hace candidatos para la prevención contra la cisticercosis porcina. Las clonas seleccionadas fueron designadas como KETc1, KETc4, KETc11, KETc7 y KETc12 (Manoutcharian *et al.*, 1995, 1996).

Posteriormente, anticuerpos contra los antígenos codificados por cada una de estas clonas se utilizaron para la detección de los antígenos específicos en el fluido vesicular de *Taenia crassiceps* por inmunoelectrotransferencia. Los anticuerpos reconocieron específicamente a antígenos nativos de 56 y 74 kDa. Este resultado implica que los 5 antígenos recombinantes representan al menos parte de los antígenos nativos con los indicados pesos moleculares.

6. Evaluación en el modelo murino de la capacidad protectora de los antígenos recombinantes

Con la finalidad de evaluar la eficacia de las proteínas recombinantes, en la prevención de la cisticercosis, se vacunaron ratones de la cepa susceptible BALB/cAnN (Manoutcharian *et al.*, 1995, 1996). Los ratones fueron vacunados con las proteínas recombinantes en los correspondientes lisados de *E. coli* emulsionadas en Adyuvante Completo de Freund (ACF). Como controles se utilizaron animales inoculados con ACF y proteínas del lisado de *E. coli* infectada con un fago sin inserto. En los ratones vacunados con lisados de las clonas KETc1, KETc4, KETc7 y KETc12 se observaron diferentes niveles de protección contra la cisticercosis murina causada por *Taenia crassiceps* que oscilaron entre el 30 al 90% de reducción de la cantidad de parásitos en comparación con los controles (Manoutcharian *et al.*, 1996).

7. Identificación de epítopes para el diseño de una vacuna sintética constituida por 3 péptidos.

Identificación del péptido protector GK1

El antígeno KETc7 demostró capacidad protectora utilizando procedimientos adicionales de inmunización génica (Rosas *et al.*, 1998; Cruz *et al.*, 2000). La secuencia del antígeno KETc7 (Manoutcharian *et al.*, 1996), que codifica para un polipéptido de 100 aminoácidos, se analizó para tratar de predecir las regiones de mayor antigenicidad de este polipéptido. Con base en esta predicción teórica (Gevorkian *et al.*, 1996), se sintetizaron 3

péptidos que resultaron ser reconocidos por sueros de individuos infectados. Los tres péptidos fueron evaluados en su capacidad protectora en el modelo murino, encontrándose que sólo uno de ellos, el GK-1, indujo altos niveles de protección (Toledo *et al.*, 1999). La inmunización de ratones BALB/cAnN con dos dosis de 10 µg del péptido GK-1, utilizando saponina como adyuvante, indujo niveles de protección del 70 al 90% (cuadro 1).

Identificación de los péptidos protectores KETc1 y KETc12.

Con base en la secuencia completa codificada por las clonas KETc1 y KETc12 se sintetizaron los dos péptidos denominados KETc1 y KETc12. Ambos péptidos fueron evaluados en el modelo de cisticercosis murina con resultados muy satisfactorios (Toledo *et al.*, 2001). La inmunización de ratones con KETc1 o con KETc12 (dos dosis de 10 µg/ratón) reduce en 60 a 80% la carga parasitaria.

Cuadro I. Capacidad protectora inducida por los péptidos GK-1, KETC-1 y KETc-12 en contra de la cisticercosis murina.

Antígeno	Eficiencia de Vacunación (%)		
	1er ensayo	2do ensayo	3er ensayo
GK-1	40%	70%	90%
KETc1	75.3%	100%	66.7%
KETc12	52.7%	88.1%	73.4%
Control	0	0	0

Eficiencia de Vacunación: $[(\text{Número de parásitos en ratones no vacunados} - \text{Número de parásitos en ratones vacunados}) / \text{Número de parásitos en ratones no vacunados}] \times 100$ (Toledo *et al.*, 1999; 2001).

8. Inmunolocalización de los epítopes protectores

Es importante señalar que los 3 epítopes protectores que constituyen la vacuna sintética desarrollada, se encuentran extensamente distribuidos en

las distintas fases del parásito *Taenia solium* con diferentes patrones. Una mezcla de sueros con una elevada concentración de anticuerpos anti-péptidos fueron utilizados para inmunolocalizar antígenos nativos en *Taenia crassiceps* y *Taenia solium*. KETc1 y KETc12 se expresan en el tegumento del cisticerco *Taenia crassiceps* mientras en *Taenia solium* se encontró en la parte más externa del tegumento y en el canal espirales. KETc12 fue detectado también en la oncosfera del huevo en diferentes puntos. Ambos epítopes se encontraron distribuidos a lo largo del tegumento del gusano adulto. (Toledo *et al.*, 1999; 2001), lo que podría implicar un blanco accesible al ataque inmunológico. Es de especial interés su localización en la oncosfera, que según lo encontrado en otras cestodiasis (Rickard and Willms, 1982) constituye la fase del parásito más susceptible al ataque inmunológico.

9. Evaluación de la capacidad protectora de la vacuna compuesta por los tres epítopes identificados en cerdos expuestos al desafío natural.

Se elaboró un protocolo para la aplicación de la vacuna en cerdos utilizando cerdos genéticamente heterogéneos (Huerta *et al.*, 2000) y se procedió a evaluar la vacuna en campo.

Esta evaluación se desarrolló en poblaciones rurales del estado de Puebla (Huatlatlauca y Tepetzezintla) en colaboración con la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, la Secretaría de Salud del Estado y el Centro de Investigación Biomédica de Oriente del Instituto Mexicano del

Seguro Social, con el Instituto de Investigaciones Biomédicas y con la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM.

Los cerdos mestizos de 60 y 90 días de edad, producidos en corrales construidos en las propias comunidades se inmunizaron con los tres péptidos en saponina o con saponina solamente (controles) y se distribuyeron en pares (un vacunado, un control) entre los habitantes de la comunidad con el acuerdo de que fueran criados según sus métodos tradicionales, alimentándolos fundamentalmente con base en desperdicios, excrementos y algo de maíz. Los cerdos se sacrificaron humanitariamente entre los 10 y 12 meses de edad y se realizaron las necropsias revisando la mitad de cada canal y registrando el número de cisticercos y su aspecto macro y microscópico. Los resultados indican que la vacuna reduce en un 50% los cerdos infectados, de 66563 a 1369 el número total de cisticercos identificados potencialmente capaces de transformarse en tenias y daña a más del 90% de los cisticercos que se instalaron en los cerdos vacunados (Huerta *et al.*, 2002). La vacuna desarrollada es capaz de proteger en contra de la cisticercosis porcina. Su efecto se visualiza en la disminución de cerdos infectados, en la disminución de parásitos recuperados y en el aumento de la degeneración de aquellos parásitos que lograron establecerse (Huerta *et al.*, 2002). Con base en las observaciones realizadas se propone que este

desarrollo tecnológico es una herramienta capaz de controlar eficientemente la transmisión de la parasitosis.

10. Expresión de péptidos en el fago filamentoso M13

Con el propósito de evaluar formas alternas eficientes y de menor costo de presentación de los péptidos vacunales, las respectivas secuencias fueron expresadas en fagos filamentosos por Manoutcharian. Este procedimiento está basado (*Phage Display*) en la expresión de un gran número de péptidos (hasta 10^9) o proteínas fusionadas a la proteína 3 de la cubierta viral /cpIII/ o proteína 8 /cpVIII/ sobre la superficie del bacteriófago filamentoso M13. La expresión repetida de los epítopes en el contexto de estas proteínas virales permite en general aumentar la inmunogenicidad de los epítopes en cuestión y se ha observado que la propia estructura del fago puede exhibir propiedades adyuvantes (Willis *et al.*, 1993; Meola *et al.*, 1995). Las bibliotecas de péptidos por *Phage Display* /PDPL/ fueron descritas inicialmente por Scott and Smith, 1990 y más tarde utilizadas ampliamente para estudiar los aspectos moleculares de las interacciones entre antígeno-anticuerpo (Grihalde *et al.*, 1995) y las interacciones ligando-receptor (Hennecke *et al.*, 1997). En la mayoría de los casos, las bibliotecas fueron utilizadas en ensayos de bioselección simple llamado *biopanning*, el cual consiste en varias rondas de interacción entre el fago y el ligando,

dando como resultado la selección de clonas de fagos con altas afinidades a un ligando en particular. También se ha demostrado que esta tecnología resulta de interés como una herramienta para definir antígenos en sueros policlonales (Dybwad *et al.*, 1995; Scala *et al.*, 1995) así como para la selección de mimótopos (péptidos que mimetizan la unión al antígeno original a anticuerpos específicos sin compartir homología de secuencia con el antígeno original).

11. Expresión de la vacuna péptídica en fagos filamentosos M13

Considerando la posibilidad de simplificar su administración y la relevancia que han tomado en los últimos años la administración oral de inmunógenos. Se evaluaron las características inmunogénicas de los péptidos sintéticos expresados en fagos filamentosos. La inmunogenicidad de la vacuna péptídica expresada en el fago filamentoso M13 fue probada en cerdos, hospedero natural de *Taenia solium*. La vacunación oral o subcutánea con estos fagos, indujo en los cerdos una respuesta inmunológica protectora humoral y celular Th1/Th2 antígeno específica. Indujo un bajo nivel de anticuerpos y una respuesta proliferativa péptido y antígeno específica con producción de INF- γ e IL-4 en los sobrenadantes del cultivo de PBMC de los cerdos inmunizados (Manoutcharian *et al.*, 2004). En esta respuesta mixta Th1/Th2, la producción de INF- γ promueve una respuesta Th1 que

aparentemente es el resultado de la activación inmune péptido específica, mientras la producción de IL-4 es inducida por el fago M13.

La inmunogenicidad de este fago recombinante, junto con su bajo costo de producción es un candidato realista para ser incluido como una vacuna anti-cisticerco expresada en un fago filamentoso. Esta es la primera ocasión que se utiliza un bacteriófago filamentoso como vacuna en animales tan grandes como el cerdo, hospedero intermediario de la *T. solium*.

Cabe señalar que la evaluación de esta nueva estrategia de presentación de antígenos vacunales podría enriquecer el área de la vacunación y considerar las observaciones obtenidas para el desarrollo de vacunas contra otros padecimientos.

Respuesta inmune inducida por el metacéstodo de Taenia solium en cerdos.

La cisticercosis en cerdos y humanos se adquiere después de ingerir alimentos o agua contaminados con huevos de *Taenia solium*. El cisticerco que se desarrolla se localiza en el cerdo generalmente en músculo y en el humano en el Sistema Nervioso Central (SNC) (Willms *et al.*, 1980, García *et al.*, 1999), causando la Neurocisticercosis (NCC). En los cerdos la infección parece ser benigna, porque no presentan síntomas a pesar de estar infectados con miles de cisticercos por todo el cuerpo (Flisser *et al.*, 1989).

En contraste la NCC humana puede ser asintomática o asociada a un espectro clínico variable (Sotelo *et al.*, 2000). La severidad de los síntomas está fuertemente asociada con la intensidad de la respuesta inmune local (Rabiela-Cervantes *et al.*, 1982, Escobar *et al.*, 1983). Los parásitos meningeales a menudo inducen una fuerte reacción inflamatoria quizá debido a su mayor exposición al sistema inmune (Restrepo *et al.*, 1998). La viabilidad del parásito juega un papel importante en la progresión de la enfermedad. Parásitos vesiculares o viables pueden evitar su detección por el sistema inmune, por enmascaramiento de estructuras de su superficie por moléculas del hospedero y secretando moléculas inmunomoduladoras (Arechavaleta *et al.*, 1998, Restrepo *et al.* 1998, White *et al.*, 1992). En contraste, cisticercos muertos pierden esta capacidad inmunomoduladora y liberan un número de antígenos que son fácilmente detectables por el sistema inmune, causando inflamación. Sin embargo este estado es frecuentemente asociado a una intensa respuesta inmune con severos síntomas clínicos. Finalmente los cisticercos calcificados generalmente presentan una discreta respuesta inmune residual (Rabiela-Cervantes *et al.*, 1982, Escobar *et al.*, 1983). La enfermedad puede ser grave cuando los parásitos son abundantes obstruyendo la circulación del LCR. Una fuerte respuesta inmune contra los antígenos del metacéstodo de la *Taenia solium*, aumenta la probabilidad de que el humano presente síntomas clínicos

(Rabiela-Cervantes *et al.*, 1982, Escobar *et al.*, 1983). En estudios inmunohistoquímicos, realizados en cerebros de pacientes con NCC se observó una respuesta Th1 con células NK, macrófagos, un número variable de linfocitos T y abundante IL-12 que parece desarrollarse dentro de un fenotipo mezcla Th1-Th2 que predomina en especímenes de craneotomías en los cuales los parásitos están alojados en el parénquima cerebral (Restrepo *et al.*, 2001). Infecciones con fenotipo mezcla Th1-Th2 parecen ser crónicas porque presentan una respuesta granulomatosa con abundantes depósitos de colágena alrededor de cisticercos en desintegración (Restrepo *et al.*, 2001). La combinación de los resultados de ambos análisis sugieren que en la NCC humana, inicialmente hay una respuesta predominantemente Th1 que eventualmente envuelve un fenotipo crónico Th1 y Th2 asociado con la formación de un granuloma maduro, fibrosis y angiogénesis (Restrepo *et al.*, 2001). Estas observaciones coinciden con las obtenidas en un estudio realizado en una comunidad de elevada exposición a *Taenia solium* en la cual se encontró un perfil inmunológico de tipo Th2 asociado a la forma de NCC asintomática, con niveles elevados de IL-4, IL13 e IL-5 y de IgG1, IgG2, IgG4 e IgE (Chavarria *et al.*, 2003). El papel de la IL-5 e IL-13 parece estar asociado con la protección previamente reportada (Evans *et al.*, 1998, Finkelman *et al.*, 1999).

Considerando las limitaciones del estudio de la enfermedad humana en especial en los casos de NCC asintomática es por lo que se han realizado diferentes análisis en el cerdo, hospedero intermediario. El cerdo puede así visualizarse como un modelo adecuado para estudiar los eventos tempranos de la respuesta inmune, en especial considerando que la forma de infección es la oral equivalente a la que se observa en el humano. Se ha descrito que los cisticercos en el cerdo, están inicialmente rodeados por una fina capa de colágena con un discreto infiltrado celular, predominando las células mononucleares. Las células presentes son macrófagos, linfocitos T CD4⁺, eosinófilos y células plasmáticas, pero no neutrófilos. Cuando el parásito muere predominan los eosinófilos, lo que podría resultar causa o consecuencia de la muerte del parásito. Los restos del parásito son lentamente reabsorbidos asociados a una respuesta de hipersensibilidad retardada crónica que tiene elementos tanto de Th1 como de Th2 (Álvarez *et al.*, 2002, de Aluja *et al.*, 1999). Se considera la posibilidad de que en un inicio de la respuesta inmune específica, las células T $\gamma\delta$ participen en el fenómeno inflamatorio asociado a la muerte del parásito, y que los macrófagos, eosinófilos, y los astrocitos se incorporen a este fenómeno inflamatorio gradualmente. Se ha encontrado que la adhesina CD44, parece ser importante en el fenómeno de reclutamiento de células inflamatorias al sitio de la lesión, así como en la interacción célula-célula en los infiltrados en

el granuloma (Yang *et al.*, 1993, Puré *et al.*, 2001). En la determinación serológica de anticuerpos por Western blot en cerdos infectados experimentalmente con huevos de *Taenia solium* se detectó que era posible diferenciar una infección reciente de una tardía por el reconocimiento de antígenos. Glicoproteínas de 13, 14 y 18 kDa fueron reconocidas durante los primeros días de infección, y únicamente las de 42 y 50 kDa pudieron ser detectadas a los 200 días postinfección. Estas observaciones podrían proporcionar una información útil en la evolución de la cisticercosis en cerdos y en la comprensión de la relación hospedero-parásito (de Aluja *et al.*, 1996).

Respuesta Inmune inducida por el cisticerco de Taenia crassiceps en ratón.

La cisticercosis es una enfermedad causada por el estadio larval de céstodos de la familia Taeniidae que afecta a muchos hospederos mamíferos intermediarios incluyendo al hombre. El metacéstodo Taeniide persiste en los tejidos del hospedero por largos periodos de tiempo, a menudo aumentando la infrapoblación por reproducción asexual (Slais, 1973). Después de un periodo de establecimiento inicial, la respuesta inmune parece tener un pequeño efecto sobre la larva o sobre el desarrollo de la infrapoblación (Freeman, 1962, 1964; Craig *et al.*, 1996). Numerosos estudios indican que la cisticercosis está asociada con diferentes grados de inmunosupresión

(Good & Miller, 1976; Burger, Rikihisa & Lin, 1986, Leid, Suquet & Perryman, 1984). En ratones infectados experimentalmente con larvas de *Taenia crassiceps* se ha observado que inducen una anergia y linfopenia de los linfocitos T localizados cerca del parásito, directamente relacionado con un aumento en la producción de IL-4 y disminución de la IL-2 (Villa *et al.*, 1996). Específicamente la IL-4 (citocina Th2) estimula la producción de IgG1 e IgE e inhibe la producción de IgG2a, mientras el IFN- γ (citocina Th1) estimula la producción de IgG2a e inhibe la producción de IgG1 (Finkelman *et al.*, 1990). En la cisticercosis experimental los niveles de IL-2 e IL-4, y los perfiles de Igs específicas del parásito son consistentes con una sobre regulación de células CD4⁺ de fenotipo Th2. El aparente proceso de selección de fenotipo Th2 en células peritoneales de ratones infectados, sugiere que la sobre regulación Th2 puede ser compatible con la sobrevivencia del parásito, mientras la respuesta Th1 parece participar en el control de la infección (Villa *et al.*, 1996). Observaciones similares han sido realizadas en la leishmaniasis, donde la transferencia pasiva de células Th2 CD4⁺ exagera el curso de la infección, mientras las líneas celulares Th1 se asocian a una evolución benigna de la infección y a la resolución de las úlceras producidas por la *Leishmania major* (Nabors *et al.*, 1995). Adicionalmente se ha reportado cierta correlación entre los perfiles de citocinas producidos por esplenocitos de ratones infectados con *Taenia crassiceps* y el progreso de la infección. En

la 1^a. y 2^a. semana después de la infección, cuando muy pocos parásitos pueden ser recuperados de la cavidad peritoneal del ratón infectado, se observa una clara respuesta inmune tipo Th1 concomitante; con una exacerbada proliferación linfocitaria cuando son estimulados con antígenos del parásito con niveles de IFN- γ incrementados en los sobrenadantes; la respuesta de DTH a antígenos específicos es elevada, así como el nivel de anticuerpos de isotipo IgG2a, que se reporta es regulado por células Th1 a través del IFN- γ (Snaper *et al.*, 1987, Terrasas *et al.*, 1998). En la 4^a semana después de la infección la respuesta proliferativa a antígenos específicos disminuye, así como la producción de IL-2 e IFN- γ . Concomitantemente, los niveles de IL-4, IL-10, IgG2b, y anticuerpos IgG1 anticisticerco, promueven una respuesta Th2, que permite el establecimiento y desarrollo del cisticerco de *Taenia crassiceps* en su hospedero murino (Terrasas *et al.*, 1998).

Con respecto a las diferencias asociadas al sexo de los ratones asociado a susceptibilidad, se han documentado diferencias en la respuesta inmune entre ratones infectados machos y hembras; en los machos los niveles de IFN- γ aumentan más rápidamente que en las hembras, mientras las concentraciones de IL-10 se elevan más rápidamente y se mantienen en niveles elevados en hembras que en machos. La cinética de producción de IL-4 y la distribución de linfocitos T difieren también entre los géneros, lo que hace suponer que la susceptibilidad entre ratones machos y hembras en la

cisticercosis murina puede ser mediada inmunologicamente (Bojalil *et al.*, 1993; Terrasas *et al.*, 1994, 1998; Larralde *et al.*, 1995).

RESPUESTA INMUNE CELULAR EN EL CERDO

La respuesta inmunológica, es el resultado de diferentes interacciones entre células y moléculas, inducidas por la presencia de un inmunógeno o antígeno con la protagónica participación de Linfocitos T y Linfocitos B. De acuerdo con sus funciones y algunas moléculas que expresan en su superficie, los linfocitos T se pueden dividir en linfocitos $CD4^+CD8^-$ o cooperadores y linfocitos $CD4^-CD8^+$ o citotóxicos (Doherty *et al.*, 1997). Los primeros son los responsables de regular la respuesta inmunológica con la producción de citocinas como la IL-2, el INF- γ , I IL-4 y la IL-10; los segundos se encargan de eliminar células infectadas y cancerosas, aunque también producen citocinas y pueden regular la respuesta inmune (Doherty 1997). Los linfocitos $CD4^+CD8^-$ y los linfocitos $CD4^-CD8^+$ maduran en el timo. En el proceso de maduración, los linfocitos T adquieren la capacidad de reconocer cualquier antígeno que el cerdo enfrente durante su vida. En este proceso, los linfocitos T adquieren el marcador CD1 que las identifica como células inmaduras, y lo pierden cuando salen a circulación a poblar los diferentes ganglios linfáticos. Otros marcadores que aparecen en la superficie de los linfocitos inmaduros son el receptor del linfocito T ($TCR\alpha\beta$ y $TCR\gamma\delta$) y las

moléculas CD4 y CD8, entre otros (Zúñiga., *et al* 1991). Una vez que las células han adquirido sus receptores específicos entran a dos procesos básicos de selección: la selección positiva y la selección negativa.

La selección positiva se lleva a cabo en la corteza tímica, donde únicamente son seleccionadas aquellas células que tengan los receptores específicos para reconocer a las moléculas del MHC propio. Las células seleccionadas positivamente entran en un nuevo proceso de selección, ahora negativa, que se desarrolla en la región cortico-medular, y donde se eliminan aquellas células que muestran excesiva afinidad por el MHC propio, lo que repercutiría en procesos de autoinmunidad (Janeway *et al.*, 1997). En el humano y en el ratón una vez que han finalizado su proceso de maduración, los linfocitos T maduros salen del timo expresando únicamente el receptor CD4 o el receptor CD8 en su superficie asociados al TCR. Sin embargo, en el cerdo se han observado que además de los linfocitos CD4⁺CD8⁻ y CD4⁻CD8⁺, algunos linfocitos T maduros expresan las moléculas CD4 y CD8 linfocitos (CD4⁺CD8⁺).

La especie porcina posee subpoblaciones de linfocitos que no se encuentran en otras especies animales estudiadas a la fecha. Además de los linfocitos T CD4⁺CD8⁻ o CD4⁻CD8⁺ con receptor $\alpha\beta$, que los encontramos en el hombre y en el ratón, el cerdo expresa linfocitos T maduros CD4⁺CD8⁺ (Pescovitz MD *et al.*, 1985, Saalmueller A *et al.*, 1987). Otro ejemplo de las

poblaciones porcinas son los linfocitos T con receptor $\gamma\delta$ que en el hombre y el ratón representan el fenotipo $CD4^+CD8^-$ (Doherty *et al.*, 1997), mientras que el cerdo presenta tres subpoblaciones con fenotipo $CD2^+CD4^+CD8^+$, $CD2^+CD4^-CD8^-$ y $CD2^-CD4^-CD8^+$ (Yang *et al.*, 1996). Los linfocitos $\gamma\delta$ $CD4^+CD8^-$ se encuentran elevados en cerdos jóvenes y se desconoce su papel biológico en la respuesta inmunológica del cerdo (Binns *et al.*, 1994).

Los linfocitos $CD4^+CD8^-$ regulan la respuesta inmunológica con la producción de citocinas que activan macrófagos, linfocitos B y linfocitos T (Summerfield *et al.*, 1996, Abbas *et al.*, 1991). En modelos murinos y en el humano se distinguen dos subpoblaciones de linfocitos $CD4^+CD8^-$ basándose en el patrón de citocinas; los linfocitos Th1 y los TH2 (Mosmann *et al.*, 1986, Constant *et al.*, 1997). Los linfocitos Th1 producen IL-2, IFN- γ y TNF- β y modulan la respuesta mediada por células. Los linfocitos Th2 producen IL-4 e IL-10 y regulan la respuesta mediada por anticuerpos; la elección de uno u otro tipo de respuesta está en función del tipo de célula presentadora, de las características del antígeno y del microambiente en el cual los antígenos son presentados a los linfocitos T (Lederman *et al.*, 1999). En la población de linfocitos $CD4^+CD8^-$ no ha sido posible identificar esta dicotomía, pero existen evidencias que hacen suponer su existencia (Saalmueller *et al.*, 1998).

La población de linfocitos CD4⁻CD8⁺ se encarga de la citotoxicidad restringida por las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad clase I (MHC-I), y es importante en las infecciones por gérmenes intracelulares (Harty *et al.*, 2000). Al igual que los linfocitos CD4⁺CD8⁻, los linfocitos citotóxicos presentan una población Tc1 y Tc2 con el mismo patrón de citocinas que en el humano (Barker *et al.*, 1995). En diferentes estudios se ha demostrado la presencia de células citotóxicas en el cerdo, las cuales se encuentran restringidas por el MHC-I; al igual que en otras especies (Zuckermann *et al.*, 1990). Los linfocitos CD4⁺CD8⁺ varían de acuerdo con la edad del animal, y van desde el 1% en el primer mes hasta el 60% en animales mayores de 3 años (Zuckermann *et al.*, 1996)

Memoria Inmunológica

Una vez que los linfocitos CD4 reconocen un antígeno presentado por las células dendríticas, proliferan y se diferencian en células efectoras o de memoria con capacidad para producir citocinas Th1 o Th2 (Bradley *et al.*, 1998). La mayoría de estas células mueren por la activación, o por la ausencia de citocinas, y de estímulo antigénico (Lenardo *et al.*, 1999), responden más rápido cuando se estimulan con el mismo antígeno. Basándose en los marcadores de superficie los linfocitos T se puede distinguir un linfocito T virgen de uno de memoria. Estas células presentan diferentes comportamientos *in vivo*; los linfocitos con fenotipo virgen

persisten por largos periodos sin dividirse, mientras que los linfocitos con fenotipo de memoria presentan células en movimiento, capaces de activarse rápidamente.

Los marcadores que caracterizan a los linfocitos de memoria incluyen el CD45RO, CD44, CD29, CD27 y el CD62 (Tough *et al.*, 2000), así como la secreción de algunas citocinas tipo Th1 o Th2 (Carter *et al.*, 1998). El CD29 en los linfocitos humanos y porcinos se expresa en altos niveles en los linfocitos efectores de memoria y en niveles bajos en los linfocitos vírgenes (Zuckermann *et al.*, 1996; Morimoto *et al.*, 1985). Se ha observado que el 75% de los linfocitos porcinos CD4⁺CD8⁺ expresan elevados niveles de CD29 (CD29^{alto}), mientras que el 25% restante expresa niveles bajos (CD29^{bajo}). Por el contrario el 25% de los linfocitos CD4⁺CD8⁻ expresan altos niveles de CD29 y el 75% bajos. Las diferencias en la expresión de la molécula CD29 coinciden con la capacidad de estas células para proliferar en presencia del antígeno.

En el humano, los linfocitos T de sangre periférica generalmente se encuentran dentro de uno de los siguientes estados; virgen, memoria o efectora. Una célula virgen es un precursor en circulación que aún no ha tenido contacto con el antígeno específico. Una célula de memoria deriva de una célula virgen después de tener contacto con el antígeno en el contexto de una CPA, pero posteriormente regresa a su estado de reposo lista para

responder rápidamente en una respuesta secundaria (Croft *et al.*, 1994). En el cerdo se ha demostrado que la mayoría de los linfocitos CD4⁺CD8⁻ expresan marcadores que los asocian con un estado de células vírgenes (Zuckermann *et al.*, 1996), mientras que los linfocitos CD4⁺CD8⁺ son células en reposo que expresan marcadores de memoria (Zuckermann *et al.*, 1996; Mosmann *et al.*, 1986). Se ha descrito, que las células de memoria se presentan con una frecuencia más alta que las células vírgenes, sobreviviendo por más tiempo, pudiendo persistir por meses o años (Bradley *et al.*, 1998). Sin embargo, tanto las células efectoras como las de memoria son células con experiencia antigénica, que llevan a cabo las funciones especializadas de la célula T como secretar citocinas en la cooperación con la célula B o la eliminación de células infectadas por virus (Bradley *et al.*, 1998).

Las células efectoras se definen como células de vida corta que se generan de una célula de memoria o una célula virgen después de la estimulación. Los linfocitos CD4⁺CD8⁻ vírgenes producen únicamente IL-2 en una estimulación inicial, mientras que las células de memoria tienen capacidad de producir citocinas tipo Th1 (INF- γ y TNF- β) y Th2 (IL-4 e IL-5) (Croft *et al.*, 1994). Originalmente la IL-10 se describió como una citocina tipo Th2 que inhibía la síntesis de citocinas, particularmente el INF- γ de las respuestas Th1 (Forentino *et al.*, 1989). Aunque la IL-10 puede tener algunos

efectos directos en las células T, la principal actividad inhibitoria se ha asociado con las funciones de macrófagos y células presentadoras de antígeno (Moore *et al.*, 1993). En los humanos, la IL-10 regula negativamente la respuesta inmunológica de manera que no discrimina entre Th1 o Th2. De hecho, la IL-10 regula negativamente la síntesis de citocinas dependientes de CPA por células humanas Th0, Th1, Th2. De esta manera se ha propuesto que a diferencia de la regulación clásica de Th1/Th2, la IL-10 representa un agente anti-inflamatorio cuya función es modular negativamente las respuestas Th1 y Th2 (Muraille *et al.*, 1998).

La IL-10 también presenta propiedades proliferativas, activadoras y quimiotácticas sobre varios tipos de linfocitos T. En particular la IL-10 actúa como un quimioatrayente de los linfocitos CD8 (Jinquan *et al.*, 1993) y aumenta la diferenciación, crecimiento y actividad citotóxica de estos linfocitos (Chen *et al.*, 1991) y de las células NK (Carson *et al.*, 1995). Sobre las células B, induce la expresión de moléculas de clase II, favorece crecimiento y diferenciación, y las rescata de la apoptosis en los centros germinales (Levy *et al.*, 1994). Los linfocitos CD4⁺CD8⁺, además de cooperar con las células para la producción de anticuerpos, son capaces de regular las respuestas inflamatorias y favorecen la respuesta citotóxica durante las infecciones virales (Hernández *et al.*, 2001).

IV. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la respuesta inmune celular y humoral inducida contra *Taenia solium* por la inmunización de cerdos con tres péptidos de *Taenia crassiceps* GK-1, KETc1 y KETc12 en su forma sintética y expresados en el fago filamentoso M13.

V. OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Identificar las principales características de la respuesta inmune celular y humoral inducida por la inmunización de cerdos con los tres péptidos sintéticos administrados por vía subcutánea.
2. Identificar la posible relevancia de la respuesta de anticuerpos en la capacidad cisticida de la vacuna a base de péptidos sintéticos.
- 3.- Identificar las principales características de la respuesta inmune humoral y celular del cerdo inducida por su inmunización con los tres péptidos expresados en fagos filamentosos administrados por vía subcutánea y oral.

VI. MATERIALES Y METODOS

1. Vacuna sintética contra la cisticercosis porcina (S3Pvac)

La vacuna péptidica (SP3vac) contra la cisticercosis porcina está compuesta por los péptidos sintéticos: GK-1 de 18 amino ácidos (aa); (Gly Tyr Try Try Pro Ser Asp Pro Asn Thr Phe Thr Ala Pro Pro Try Ser **Ala**), KETc1 de 13

amino ácidos; (Ala Pro Met Ser Thr Pro Ser Ala Thr Ser Val Arg **Gly**) y KETc-12 de 9 amino ácidos; (Gly Asn Leu Leu Leu Ser Cys Leu **Gly**), incluyendo el aminoácido asociado a la resina que se utilizó para la síntesis, mismo que se señala en negritas. Los péptidos fueron preparados por síntesis en fase sólida con N-terbutiloxycarbonil derivados de L amino ácido en resina fenilacetamidometil (Sigma Chemical Co., St Louis, Mo.). Todos los péptidos presentaron una pureza de 95% por cromatografía líquida de alta presión con columnas de fase reversa C18. La secuencia de los amino ácidos de cada péptido fue confirmada en un secuenciador de proteínas de fase líquida (Applied Biosystems). La vacuna se mantuvo refrigerada (2-4° C) hasta su uso.

2. Inmunización de animales

Para realizar este experimento, se trasladaron a la Facultad de Medicina, Veterinaria y Zootecnia diez cerdos rústicos de 2 meses de edad, libres de cisticercosis determinado por inspección de la lengua y por medición del nivel de anticuerpos anticisticerco, de la comunidad de Huatlatlauca, Estado de Puebla, lugar en donde se realizaron los experimentos de protección. El mantenerlos en las instalaciones de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México permitió controlar las condiciones de manutención y alimentación así como la toma de muestras durante el experimento. Cinco cerdos fueron inmunizados por vía

subcutánea en la base de la oreja, con una dosis de 250 µg de cada uno de los péptidos y con 100 µg de saponina en agua destilada como adyuvante y cinco cerdos sólo con adyuvante. Ambos grupos recibieron 2 inmunizaciones a los tiempos 0 y 30 días de comenzado el experimento. Todos los cerdos fueron sangrados a los tiempos 0, 7, 14, 30, 37 y 51 días postinmunización, para obtención de suero y células, para estudiar el curso de la respuesta inmunológica humoral y celular inducida por la vacuna.

2a. Obtención de anticuerpos contra cada uno de los péptidos

Se inmunizaron 4 grupos de 5 cerdos cada uno, con un solo péptido (GK-1 o KETc-1 o KETc-12 o adyuvante solo), siguiendo un esquema similar al descrito para la obtención de anticuerpos específicos contra cada péptido. Estos anticuerpos se utilizaron para evaluar su funcionalidad en el bioensayo de transformación de cisticerco en taenia.

3. estudio de la Respuesta Inmune Celular

3a. Ensayos de proliferación de linfocitos

Para este ensayo se les tomó a todos los cerdos sangre venosa con anticoagulante en los tiempos 0, 7, 14, 30, 37 y 51 días posinmunización. Las células mononucleares (PBMC) de cada cerdo fueron aisladas de la sangre, por centrifugación en un gradiente de Ficoll-Hypaque 1.077 (Sigma, St.

Louis, MO) y cultivadas a una concentración de 2×10^5 células viables/pozo, en placas de 96 pozos en medio RPMI 1640 suplementado con L-glutamina (2mM), amino ácidos no esenciales (10%), penicilina (100 U/ml), estreptomycin (100 μ g/ml) y 10% suero fetal bovino (Kimman *et al.*,1995, Hernández *et al.*,1998).

Las células mononucleares fueron cultivadas con 10 μ g/ml de cada uno de los péptidos, con medio solo, como control negativo, y con phytohemagglutinin (10 μ g/ml) y concanavalin A (1 μ g/ml) (Sigma), como controles positivos de proliferación. Después de 5 días de cultivo a 37°C, en un incubador de humedad con 5% de CO₂, los cultivos fueron marcados con 1 μ Ci de [³H] timidina (Amersham Life Science Little Chalfont, England) por pozo. Después de 20 hr, las células fueron cosechadas. La radioactividad fue determinada en un contador Betaplate (Wallac Oy, 20101 Turku 10. Finland). Los resultados fueron expresados como índices de estimulación (S.I.); cpm de las células estimuladas/cpm de las células del mismo cerdo sin estimular.

3b. Análisis del perfil de citocinas

Se tomaron los sobrenadantes de los cultivos de linfocitos con péptidos a las 72 h de cultivo de los tiempos 7, 30, 37 días postinmunización, para determinación de IL-2, IFN- γ , IL-4, IL-10 por la técnica de ELISA, utilizando

Kits comerciales (Biosource, International) por la técnica de sandwich con anticuerpos monoclonales específicos para cada citocina.

4. Estudio de la Respuesta Inmune Humoral

4a. Determinación del nivel de anticuerpos IgG

Se determinó el nivel de anticuerpos IgG en las Igs purificadas a partir de los sueros de cerdo inmunizados y control de los tiempos 0, 7, 14, 30, 37 y 51 postinmunización, contra antígeno total de cisticerco y contra cada uno de los péptidos en todos los sueros utilizando la técnica de inmuno ensayo enzimático (ELISA). Se utilizaron placas de microtitulación de 96 pozos (Nunc, Roskilde, Denmark), que fueron cubiertas con 1µg/pozo de antígeno o de cada uno de los péptidos diluidos en buffer de carbonatos (0.1M pH 9.6), e incubadas toda la noche a 4º C (placas con antígeno) o a 37º C (placas con péptidos). Los purificados se diluyeron 1:200 en PBS con 1% de BSA. Y 100 µl de cada uno de ellos se agregaron a todos los pozos, incubando a 37ºc por una hora. Para detectar el complejo antígeno-anticuerpo, se agregó un anticuerpo de conejo anti-IgG de cerdo acoplada a peroxidasa (whole molecule; Sigma) en una dilución 1:1000 por 1 h a 37º C. La enzima fue detectada con 3, 3', 5, 5' tetrametilbencidina por 10 min a temperatura ambiente. La reacción se detubo con ácido sulfúrico 1 N y se determinó la D.O a 450 nm en un lector de ELISA (LP 400, Pasteur Diagnostics, Paris, France).

5. Construcción de fagos recombinantes para la vacuna fago anti-cisticerco (CPhV).

Con el propósito de evaluar formas alternativas eficientes y de menor costo de presentación de los péptidos, las respectivas secuencias fueron expresadas en fagos filamentosos (Manoutcharian *et al.*, 2004). Este procedimiento está basado (*phage Display*) en la expresión de un gran número de péptidos hasta de 10^9 o proteínas fusionados a la proteína 3 de la cubierta viral (cpIII) o proteína 8 (cpVIII) sobre la superficie del bacteriófago M13 (ver apéndice II).

El antígeno recombinante KETc-7 de 96 (aa) (Manoutcharian *et al.*, 1996), el péptido GK-1 (69-95 aa, GYYPSDPNTFYAPPYS) derivado del KETc-7, los péptidos derivados de los antígenos recombinantes de *Taenia crassiceps* KETc-1 (APMSTPSATSVR) y KETc-12 (GNLLLSCL) (Huerta *et al.*, 2002), fueron expresados en la superficie del fago M13, por clonación de los correspondientes fragmentos de DNA en vectores fago/fagémido. Todos los procedimientos de biología molecular fueron realizados, según protocolos estándar (Sambrook *et al.*, 1989) o siguiendo las recomendaciones de los proveedores. La producción de las partículas fago/fagémido fueron de 5×10^{11} y 5×10^{12} /ml de medio de cultivo respectivamente.

5a. Inmunización de cerdos

Doce cerdos criollos de 10 meses de edad, libres de cisticercosis fueron mantenidos en condiciones controladas de inmunizaciones y alimentación en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México durante todo el experimento. Los cerdos se dividieron en 4 grupos de 3 cerdos cada uno. El primer grupo fue inmunizado por vía subcutánea con CPhV en dosis baja (4×10^{11} fagos en 1.5 ml de TBS), el segundo y tercer grupo fueron inmunizados con CPhV en dosis alta (4×10^{12} fagos) por vía subcutánea y oral (pipeteando en su alimento 1 ml de fago en TBS) respectivamente. El cuarto grupo (grupo control) fue inmunizado por vía subcutánea, únicamente con fago M13 en dosis alta (4×10^{12} fagos). A todos los grupos se les administró 2 dosis de vacuna, separadas por 15 días. Todos los cerdos fueron sangrados por venipuntura de la yugular antes y a los 7, 15, 30 y 45 días posvacunación para la determinación y obtención de los diferentes parámetros inmunológicos (proliferación de linfocitos, concentración de citocinas y nivel de anticuerpos), siguiendo la misma metodología aplicada en la parte de inmunización con los péptidos.

VII. Resultados

Los principales resultados obtenidos en esta tesis se presentan en forma de artículos publicados. Los artículos de Díaz *et al.*, 2003, Manoutcharian *et al.*, 2004, describen la respuesta inmune de cerdos inducida por vacunación con los tres péptidos expresados en forma sintética o expresados en fagos filamentosos.

En un primer artículo referido como “Vaccination against *Taenia solium* cysticercosis in underfed rustic pigs of Mexico: roles of age, genetic background and antibody response” realizado en colaboración con Mirna Huerta, Edda Sciuto y col. Publicado en *Vet Parasitol* 2000; 90:209-219. Se describe la inmunización de cerdos rústicos de diferentes edades (40-70 días) libres de cisticercosis, con un extracto completo de cisticerco de *Taenia crassiceps*. Los cerdos vacunados se desafían con huevos de *Taenia solium*, y se determina el número de cisticercos por cerdo infectado, así como el estado histológico de ellos. Posteriormente se analiza el efecto cisticida de los anticuerpos de cerdo inducidos por la inmunización evitando la transformación de células de *Taenia crassiceps* a cisticercos en ratones. Se observa que hay una clara disminución de cisticercos regenerados, cuando los anticuerpos provienen de cerdos de 40 días.

En un segundo artículo titulado “Synthetic peptide vaccine against *Taenia solium* pig cysticercosis: successful vaccination in a controlled field trial in

rural Mexico. Realizado también en colaboración con el grupo de Sciutto y col. Publicado en *Vaccine*.2002; 20: 262-266. En este artículo se mencionan los resultados obtenidos al probar una vacuna contra la cisticercosis porcina constituida por tres péptidos sintéticos (KETc-1, 12 y GK-1) en una comunidad de elevada prevalencia de cisticercosis del Estado de Puebla, bajo condiciones realistas de exposición a la infección. Los cerdos vacunados y control fueron repartidos en pares (un vacunado y un control), en casas donde tenían animales contaminados con cisticercos. De 10 a 12 meses después de la vacunación se sacrificaron los cerdos y se cuenta el número total de cisticercos viables y necroticos de cada cerdo. Observando un mayor número de cisticercos vesiculares en los cerdos control comparado con los vacunados.

En el tercer artículo que es donde se mencionan los resultados de esta tesis, titulado "Th1 and Th2 indices of the immune response in pigs vaccinated against *Taenia solium* cisticercosis suggest various host immune strategies against the parasite". Publicado en *Vet Immunol Immunopatol*.2003; 93:81-90. En este artículo se estudia la respuesta inmune inducida por la inmunización de cerdos rústicos en cautiverio con los tres péptidos sintéticos (KETc-1, 12 y GK-1), enfocándonos a los marcadores Th1 (IL-2 e IFN- γ) y Th2 (IL-4 e IL-10) por la técnica de ELISA y de la cinética de anticuerpos inducida postinmunización. Observamos una producción de IL-2 e

IFN- γ antígeno específico pero no de IL-4 es decir una respuesta inmune Tipo Th1 que los anticuerpos inducidos en los cerdos vacunados se mantienen elevados durante los 51 días postinmunización y que reconocieron preferentemente a cada uno de los péptidos en forma aislada, mientras que el antígeno de *Taenia solium* es pobremente reconocido. Así mismo, se determinó el efecto cisticida de los anticuerpos inducidos por la inmunización bloqueando la transformación de cisticercos a *taenias* en Hámster dorados.

En el cuarto artículo titulado "Recombinant Bacteriophage-based multiepitope vaccine against *Taenia solium* pig cysticercosis". Publicado en Vet Immunol Immunopatol.2004; 99: 11-24. Realizado en colaboración con Manoutcharian. Aquí estudiamos la respuesta inmune inducida por la inmunización de cerdos rústicos en cautiverio por una vacuna constituida por el fago filamentoso M13 expresando en su superficie los antígenos GK-1, KETc-1, 7 y 12, administrada en forma subcutánea y oral; así como la inmunogenicidad propia del fago. Observamos que los cerdos inmunizados inducen una producción de anticuerpos específicos contra cada péptido determinados por ELISA, y que sus células mononucleares a los 15 días postinmunización inducen elevados índices de estimulación al estimularse con antígeno de *Taenia solium* y o con péptidos sintéticos. Se detectaron claros incrementos de INF- γ y de IL-4 en los sobrenadantes de estos cultivos

lo que sugiere una respuesta Tipo Th1/TH2. Al desafío con huevos de *Taenia solium*, los cerdos vacunados mostraron un reducido número de cisticercos comparado con los cerdos control, y el 75% de estos cisticercos obtenidos de cerdos inmunizados por vía oral eran no viables, determinado histológicamente.

VIII. Artículos que resumen los principales hallazgos de esta tesis y artículos en colaboración.



ELSEVIER

Veterinary Parasitology 90 (2000) 209–219

veterinary
parasitology

www.elsevier.com/locate/vetpar

Vaccination against *Taenia solium* cysticercosis in underfed rustic pigs of México: roles of age, genetic background and antibody response

M. Huerta^c, E. Sciutto^{a,*}, G. García^a, N. Villalobos^b, M. Hernández^a,
G. Fragoso^a, J. Díaz^c, A. Díaz^e, R. Ramírez^d, S. Luna^d, J. García^d,
E. Aguilar^d, S. Espinoza^d, G. Castilla^d, J.R. Bobadilla^a, R. Avila^d,
M.V. José^a, C. Larralde^a, A.S. de Aluja^b

^a Department of Immunology, AP 70228, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Mexico D.F. 04510, Mexico

^b Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Mexico D.F. 04510, Mexico

^c Facultad de Medicina, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, Mexico

^d Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, Mexico

^e Instituto Mexicano de Seguro Social, Puebla, Mexico

Received 9 July 1999; accepted 24 February 2000

Abstract

Vaccination of pigs of mixed genetic make-up, raised as rustically as done in rural Mexico, resulted in effective protection to experimental challenge against *Taenia solium* cysticercosis. Maximum protection was achieved if pigs were immunized at 70 days of age. There was large variation of viable parasite load within vaccinated pigs and controls, which is suggestive of significant genetic factors influencing susceptibility, besides immunization. Our results strengthen the advisability of pig vaccination for control of *T. solium* cysticercosis, since it lowers the number of viable cysticerci capable of transforming into tapeworms. © 2000 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: Porcine cysticercosis; Immunization; Vaccination; Antibodies; *Taenia solium*

1. Introduction

Taenia solium cysticercosis is highly prevalent in humans and pigs in developing countries of Latin America, Asia and Africa and has serious health and economic consequences (Sotelo et al., 1996). The life cycle of this parasite includes a larval (cysticercus) phase

* Corresponding author. Tel.: +5-6-22-38-18; fax: +5-6-22-33-69.

E-mail address: edda@servidor.unam.mx (E. Sciutto)

affecting both pigs and humans after ingestion of eggs present in feces of human tapeworm carriers.

Transmission is clearly related with rustic rearing of pigs in impoverished sectors of the rural population (Larralde et al., 1992). There is evidence that rustically reared pigs become infected during the initial days after birth (Aluja et al., 1998). Since the pig is an indispensable intermediate host, transmission could be reduced by lowering the prevalence of pig cysticercosis through effective vaccination. Development of an effective vaccine for pig cysticercosis is being pursued by a number of researchers (Molinari et al., 1993, 1997; Nascimento et al., 1995; Sciuotto et al., 1995).

Experimentation leading to a vaccine against porcine cysticercosis is hampered by the high cost and slow data retrieval involved in testing pigs. Therefore, another cestode, *Taenia crassiceps*, which exhibits extensive antigen similarities with *T. solium* (Larralde et al., 1989, 1990) and whose metacestodes easily and rapidly develop and proliferate in the peritoneal cavity of mice (Fragoso et al., 1998), has been used as an experimental model to select and test promising antigens before testing in pigs (Valdez et al., 1994; Manoutcharian et al., 1996). This approach led us to find that immunization of well-nourished adult York-Landrace pigs with total *T. crassiceps* antigens reduced almost 50% the expected parasite load in pigs experimentally challenged with *T. solium* eggs (Sciuotto et al., 1995; Manoutcharian et al., 1996). We set out to test the validity of such encouraging results under field conditions that approximate those prevailing in rural areas of Mexico. Thus, we measured the effect of the reported vaccination and challenging procedures but now applied to underfed rustic pigs of different ages, all taken from a mixture of different genetic backgrounds consistent with typical rural pig populations. Serological studies were also performed to test the cysticidal effect of the vaccinated pigs' antibodies as measured by the blocking of *T. crassiceps* cell transformation into cysts (García et al., 2000).

2. Material and methods

2.1. Pigs

We used 20 pigs chosen at a rural farm in Atlixco, in the state of Puebla, Mexico, which was shown to be free of cysticercosis. Pigs were transferred and kept in the farm at the Veterinary School of the Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, which was also free of cysticercosis. To simulate the nutritional deficiencies to which free-roaming pigs in rural areas are exposed, pigs were fed with only 50% of the recommended amount of commercial food which resulted in seriously reduced body weight (40%).

2.2. Experimental strategy

Two groups of 10 pigs each were used for immunization trials: one group was treated at 40 days of age and the other group at 70 days of age. Five pigs of each group were immunized with total *T. crassiceps* antigens in adjuvant and the other five were injected with adjuvant alone and used as controls.

2.3. Immunogen preparation and immunization schedule

The immunogen consisted of total antigens recovered from *T. crassiceps* (ORF) cysticerci obtained as previously described (Sciutto et al., 1995). Briefly, murine *T. crassiceps* cysticerci were collected from the peritoneal cavity of mice and placed in cold 0.01 M phosphate buffered saline, pH 7.2 (PBS). The metacestodes were repeatedly washed in ice cold PBS and then homogenized in a Polytron (Brinkmann Instruments); protein concentration was determined by the method of Lowry and adjusted to 9 mg/ml in PBS, and the samples were stored at -70°C until used. Pigs were immunized subcutaneously with one dose of 0.4 mg/kg in 2.5 ml of saline with 250 μg of saponin as adjuvant or with adjuvant alone (controls) at the base of the ear.

2.4. Experimental infection and assessment of parasite burden

A specimen of *T. solium* was obtained from a fully informed and consenting human carrier in a village (San Nicolás Tolentino) in the state of Puebla, Mexico, immediately after treatment with niclosamide (Yomesan, Bayer). The tapeworm was collected in saline. Under controlled laboratory conditions, the tapeworm was cut up with scissors to free eggs from gravid proglottids. Eggs were washed repeatedly with saline solution and kept at 4°C until used. Thirty days after collection, egg viability was confirmed by microscopic examination using the technique described by Aluja et al. (1998). Thirty days after immunization each pig was orally infected with 10^5 viable eggs of *T. solium*. Before immunization and at five different times thereafter, pigs were bled for antibody evaluation. Eighty days after infection, pigs were killed and cysticerci were counted after thoroughly dissecting skeletal muscles, tongue, heart and liver of all the animals. Samples of tissues containing metacestodes were fixed in 10% phosphate buffered formaline (pH 7.2) and processed for histological examination.

2.5. Histological examinations

Tissues containing metacestodes were sectioned (5 μ) and stained with hematoxylin-eosin as previously described (Aluja et al., 1998). Based on the microscopic appearance, cysticerci were classified according to the inflammatory reaction and to the degree of destruction in grades of 1–6 (Aluja and Vargas, 1988). A total of 693 cysticerci were analyzed in a blind evaluation from immunized and non-immunized pigs.

2.6. Distribution of cysticerci in experimentally infected pigs

All muscles, tongues, hearts and livers of the pigs were cut in slices of approximately 1 cm each and all metacestodes present in them were counted. A beta probability density function was used for the frequency distribution in order to fit the data. The STATGRAPHICS program was used for fitting procedures and for obtaining estimates of the two parameters ($\beta=35.73$ and $\alpha=1.84$) for the beta density.

2.7. Antibody detection by ELISA

Serum antibody levels were obtained by indirect ELISA using *T. solium* cyst fluid as antigen with minor modifications following a previously described procedure (Sciutto et al., 1998). After incubation with 100 μ l per well of *T. solium* cyst fluid (1 μ g/ml) in borate buffered saline (BBS), pH 9.6, for 60 min at 37°C, the wells were washed and incubated with 100 μ l of pig sera diluted in PBS-Tween, 1:100, for 60 min at 37°C. Antibodies were detected with 100 μ l of rabbit alkaline phosphatase anti-pig IgG (whole molecule) conjugate (Sigma), diluted to optimum concentration (1:1000) and followed by substrate (*para*-nitrophenylphosphate (Sigma, at 5 mg/ml). The color reaction was stopped using 50 μ l/well of 2 N NaOH and absorbance values were measured at 405 nm in an ELISA reader (Human GMBH, Humareader, Model 2106). A serum sample was considered to be positive when its ELISA optical density (OD) reading exceeded the 99% confidence interval (mean value of control (non-immunized) +3 standard deviations).

2.8. Relevance of the antibody response

To evaluate the anticysticercal properties of the antibodies induced by immunization and by the challenging infection, we used an experimental model of cysticercosis based on the infection of 4–6 weeks-old female BALB/cAnN mice with *T. crassiceps* cysticercus cells Freeman, 1962. This technique has as been recently developed as a bioassay for this purpose (Toledo et al., 1997; García et al., 2000). Cysticercus cells used for infection were obtained from cysticerci after extensively washing the parasites with sterile PBS, following the technique previously described (Toledo et al., 1997). Briefly, about 500 cysts were transferred to 50 ml RPMI 1640, supplemented with 10% fetal bovine serum, 1 mM sodium pyruvate, penicillin (100 U/ml)/streptomycin (100 μ g/ml), 0.01 mM non-essential amino acids, 0.2 mM L-glutamine, 1.6 μ M β mercaptoethanol, 25 mM HEPES, and 2 g/l NaHCO₃. Cysts were cut into small pieces with a scalpel and placed in 50 ml culture flasks (Falcon Labware, New Jersey) with 5 ml of culture medium. After 7 days of in vitro culture at 27°C, the fragments were transferred to fresh medium, containing 1% trypsin-EDTA (Gibco BRL, New York) and maintained at room temperature under strong shaking for 15 min. The trypsin digest was washed three times after 10 min centrifugation of lysate at 800 g and the pellet was resuspended in the supplemented culture medium. Infection of mice by isolated cysticercus cells was performed by intraperitoneal injection of 0.5 ml of the cell suspension (10⁶ cells per mouse). Mice were killed 30 days after infection and the number of cysts in the peritoneal cavity was determined (Fragoso et al., 1998).

To study the effect of antibodies upon *T. crassiceps* cysts regeneration from the cysticercus cells, Igs from both non-immunized (control) and immunized pigs were collected using the technique previously described (Sciutto et al., 1998) before the challenging infection (Table 2). In an additional experiment sera from four already infected control pigs were used (Table 3). Two of the four pigs developed few cysticerci after challenge (resistant), and two a high number of cysts (susceptible). Immunoglobulins concentration was calculated by Lowry technique (Lowry et al., 1951) and were adjusted to a concentration of 75 μ g/ml in RPMI 1640 and incubated in 1 ml with 10⁶ cysticercus cells during 30 min at room temperature under sterile conditions. After incubation, the cysticercus cells that had been

incubated with medium alone or with immunoglobulins in the same medium were injected into the peritoneal cavity of BALB/cAnN mice. After 30 days the mice were killed and the number of cysticerci recovered in their peritoneal cavities were counted.

2.9. Statistical analysis

The statistical significance of results was calculated with the non-parametric Mann–Whitney *U*-test, considering that parasite density is a discrete variable (i.e. 0, 1, 2, . . . , *n* parasites). Both the statistical analyses were performed with the INSTAT program (GraphPad, San Diego, CA). Differences were considered significant when *P* values were less than 0.05.

3. Results

3.1. Effect of immunization against pig cysticercosis

To evaluate the effect of immunization against cysticercosis, the number of cysts per pig as well as the histological state of the cysticerci recovered were determined. A total of 693 slices from cysticerci collected from infected pigs were analyzed and the histological state of cysticerci classified according to their degree of damage from 1 to 6, following the classification proposed by Aluja and Vargas, 1988. It is shown in Fig. 1 that the percentage of viable cysticerci (grades 1, 2, 3) present in immunized pigs was significantly lower ($P < 0.05$) than those in control pigs; likewise, the distribution of cysticercal viability classes in immunized pigs was shifted by several intervals towards severely damaged metacestodes (grades 4, 5 and 6). More importantly, in pigs immunized at 70 days of age, in comparison to that of controls, cysticerci were distributed mostly in the low viability classes (grades 4, 5, 6), although similar total numbers of *T. solium* cysticerci had entered and established in both immunized and control pigs (Table 1).

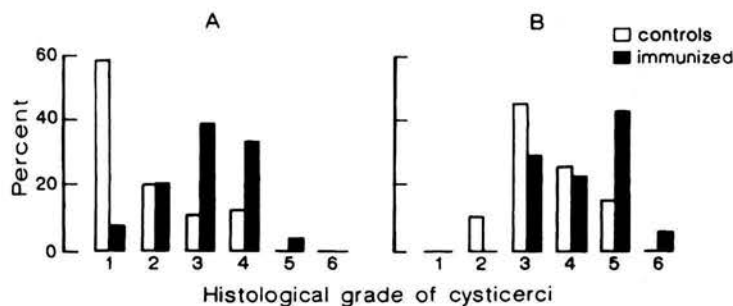


Fig. 1. Percentage distribution of cysticerci histologically classified according to the grade of damage in 693 parasites explored representative for non-vaccinated (controls) and pigs vaccinated at (A) 40 or (B) 70 days of age.

Table 1

Number of cysticerci recovered in immunized and controls pigs 80 days after challenge with *Taenia solium* eggs

	Total number of cysticerci/pig	Mean number of cysticerci/group \pm S.D.
Pigs immunized at the age of 40 days		
Controls	175, 198, 251, 375, 858	371.4 \pm 252.9
Immunized	87, 172, 362, 487, 631	347.8 \pm 199.3
70 days		
Controls	172, 178, 294, 323, 812	355.8 \pm 235.9
Immunized	176, 183, 234, 355, 1021	393.8 \pm 320.0

3.2. Relevance of the antibody response

None of the pigs immunized at 40 days of age had detectable serum antibodies by ELISA at the time of infection challenge, whereas in sera from pigs immunized at 70 days of age, a clear increase in the antibody levels after immunization was detected (Fig. 2). However, after 80 days of infection, all immunized and non-immunized pigs of both ages had detectable and similar serum antibody levels. Cysticerci from pigs immunized at 70 days of

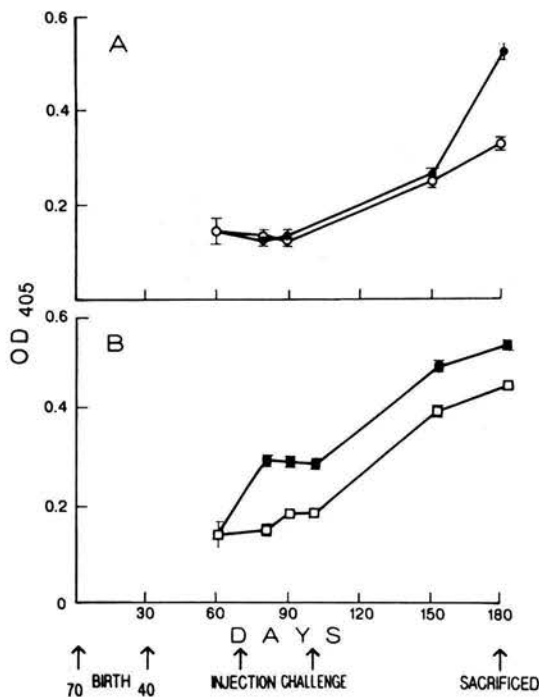


Fig. 2. Levels of antibodies determined by ELISA (O.D.) \pm S.D. in sera from non-vaccinated (○, □) and vaccinated (●, ■) pigs before and after challenge with *T. solium* eggs. Schemes of events in the protocol used are signaled: (A) 40 and (B) 70 correspond to the time of birth of pigs of each age group.

Table 2
Effect of pig anti-cysticercal antibodies in *Taenia crassiceps* cyst regeneration from isolated cysticercal cells

Immunoglobulins from pigs immunized at age of ^a	
40 days	
Non-immunized (0.18±0.03) ^c	69, 74, 89, 83, 79, 103, 88, 68, 79, 94 ^b (82.6±10.5) ^{ad}
Immunized (0.17±0.04)	96, 101, 104, 70, 78, 70, 93, 82, 79, 94 (86.7±11.8) ^a
70 days	
Non-immunized (0.19±0.04)	113, 99, 106, 86, 109, 125, 87, 98, 103, 99 (102.5±11.1) ^a
Immunized (0.32±0.05)	46, 36, 69, 53, 42, 59, 61, 54, 48, 58 (52.6±9.3) ^b

^a Immunoglobulins were purified from pig sera obtained 30 days after immunization with *T. crassiceps* total antigens (400 µg/kg).

^b Number of cysticerci recovered after infection of mice with 10⁶ *T. crassiceps* cysticercal cells incubated with purified immunoglobulins (70 µg/ 10⁶ in 1 ml).

^c Level of anti-cysticercal antibodies determined by ELISA (mean of the OD±S.D.). Data labeled with different letters are significantly different (non-parametric ANOVA test, *P*<0.001).

^d Mean of the number of cysticerci recovered per group ±S.D.

age exhibited greater histological damage than those immunized at 40 days of age. The effect of purified antibodies from the older pigs was tested with *T. crassiceps* cyst regeneration in BALB/cAnN recipient mice and compared with the cysticidal effect of purified Igs from the younger immunized pigs. As shown in Table 2, there was a reduction in the number of cysts recovered from the peritoneal cavity of mice when cysticercal cells were incubated with Igs from pigs immunized at 70 days, compared with Igs from 70 days non-immunized pigs (52.6 versus 102.5, *P*<0.001), whereas no effect was observed in cells incubated with Igs

Table 3
Effect of antibodies induced by susceptible or resistant pigs on *Taenia crassiceps* cyst regeneration from isolated cysticercal cells

Immunoglobulins from pigs:	Experiment 1	Experiment 2
Non-infected	78, 112, 118, 89, 95, 92, 103, 83, 90, 104 ^a (96.4±12.0) ^{a,b}	53, 101, 64, 78, 100, 50, 70, 80, 93, 93 (78.2±17.7) ^a
Infected		
Susceptible (858, 812) ^c	114, 99, 100, 86, 93, 78, 64, 94, 89, 103 (92±13.2) ^a	103, 59, 78, 93, 96, 118, 75, 88, 92, 86 (88.8±15.3) ^a
Resistant (175, 172)	42, 56, 69, 65, 79, 45, 58, 69, 70, 82 (63.5±13.6) ^b	38, 36, 48, 52, 46, 32, 48, 56, 43, 51 (45±7.2) ^b

^a Number of cysts recovered after infection of mice with 10⁶ *T. crassiceps* cysticercal cells incubated with purified immunoglobulins (75 µg).

^b Mean±S.D. of the number of cysticerci recovered.

^c Number of cysticerci determined per pig after infection with 10⁵ *T. solium* eggs. Genetically heterogeneous pigs were infected under the same conditions. Data labeled with different letters are significantly different from each other (non-parametric ANOVA test, *P*<0.05).

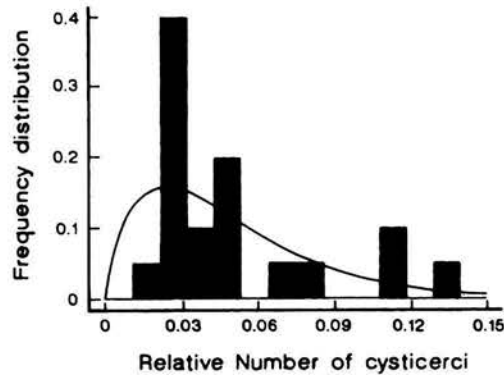


Fig. 3. Frequency distribution of metacestodes of *T. solium* in 20 experimentally infected pigs. The solid curve represents the best fit of the beta probability density function. The maximum likelihood estimates of the parameters are $\alpha=1.84$ and $\beta=35.73$. The number of cysticerci of each pig shown in Table 2, immunized and non-immunized pigs for 40 and 70 days, are normalized to 0 and 1. Then the relative number of cysticerci denoted by x is a random variable whose range goes from 0 to 1. The beta distribution is defined as: $F(x) = (\Gamma(\alpha + \beta) / (\Gamma(\alpha)\Gamma(\beta)))(x^{\alpha-1})(1-x)^{\beta-1}$ where Γ is the gamma function, α and β are shape parameters.

from pigs immunized at 40 days, or with sera from control pigs (86.7 versus 82.6, $P>0.4$). Using the same *T. crassiceps* murine model we analyzed the relevance of antibodies elicited by four experimentally infected pigs with *T. solium* eggs. As shown in Table 1, two of them were naturally more resistant (with 175 and 172 cysts) and two were more susceptible (with 858 and 812 cysts). When parasite cells were treated with antibodies from the resistant pigs, a significant reduction in the number of cysticerci was detected in two independent experiments (96.4 versus 63.5; 78.2 versus 45, $P<0.05$, Table 3). No effect was detected when antibodies from susceptible pigs were evaluated (96.4 versus 92, $P>0.5$; 78.2 versus 88.8, $P>0.3$, Table 3).

3.3. Distribution of cysticerci in experimentally infected pigs

The frequency distribution of cysticerci in the 20 experimentally infected pigs is shown in Fig. 3. This distribution clearly follows an overdispersed distribution of the number of cysticerci among the pigs. The solid curve represents a beta density, which is the best fit to experimental data. As shown, most of the pigs harbored low number of cysts and only a few pigs exhibited a clearly higher number of parasites.

4. Discussion

In this study we observed that immunization of rustic pigs with heterologous total *T. crassiceps* antigens reduced the viability of *T. solium* cysticerci that developed from experimental challenge with *T. solium* eggs. Protection by vaccination was more pronounced in older pigs (70 days of age), an effect possibly mediated in part by antibodies. In a previous study we had found that immunization with *T. crassiceps* total cysticercus antigens

significantly reduced the expected parasite load by almost 50% of experimentally infected York-Landrace pigs, kept in ideal conditions and fed ad libitum with fully balanced commercial food (Sciutto et al., 1995). In this study, we found that the same immunization protocol applied to genetically hybrid insufficiently fed pigs induced a cysticidal effect clearly observed in pigs immunized at 70 days of age (Fig. 1) although the total number of parasites found, dead or alive, was similar in both the groups of pigs (Table 1). The damage to cysticerci induced by vaccination is particularly relevant for practical reasons, as it strengthens the feasibility to control transmission of the infection by pig vaccination, even if applied to rustically reared pigs. The failure to detect an antibody response after immunization at 40 days of age could indicate that younger animals are still in the process of developing their immune system and perhaps precludes the use of early vaccination.

These results point to three main issues that merit comment. The first is the optimal age at which pigs should be vaccinated to induce an effective immune response, a very important issue to consider in vaccination protocols, particularly when taking into account that pigs come in contact with the parasite as early as a few days after birth (Aluja et al., 1998). Additionally, the higher viability of cysticerci in pigs immunized at 40 days of age and challenged at 70 days than of those from pigs immunized at 70 days and challenged at 100 days of age (Fig. 1) is of interest, as it suggests that once cysticerci are established the immune system has difficulties to damage them. The pig's slow development of effective immunity against cysticerci, combined with the early exposure to the infective eggs, may warrant the development of vaccination of pregnant sows for passive transfer of antibodies via colostrum. The second comment relates to the evaluation of vaccine protocols in cysticercosis and the relevance of assessing the total number of cysticerci that establish as a result of challenge as well as the histological degree of parasite damage. Counting only the total number of cysticerci found in the challenged host may be misleading (García et al., 2000). Antibodies that cripple biological functions of the parasite, such as development to reproductive or pathogenic stages, make antibodies important protagonists in pathogenesis and transmission of taeniosis/cysticercosis: thus, not all infected pigs, and perhaps not all cysticerci within the same pig participant, are equally capable of conversion to tapeworms (García et al., 2000).

The third issue pertains to the relevance of antibodies in the cysticidal effects of vaccination. A new more sensitive system has been used here, one based on the use of *T. crassiceps* cysticercus cells as challenge infection in murine hosts that regenerate to complete cysticerci (Toledo et al., 1997). When *T. crassiceps* cysticercus cells were previously incubated with antibodies purified from sera of pigs immunized at 70 days of age, a clear reduction in the number of regenerated cysticerci was observed, whilst no effect was detected when sera from control or 40 days immunized pigs were used. Thus, it would appear that antibodies might be involved in the protection conferred by vaccination.

Another interesting finding that emerged from this study is the overdispersed distribution, a beta density, of parasite loads in challenged hybrid pigs. The gamma distribution (see e.g. Medley et al., 1993) and in particular the negative binomial distribution (see e.g. Anderson and May, 1985) have been used several times for describing the distribution of helminth parasites among hosts. The fitted beta distribution describes better the aggregation of parasites among pigs, which had the same degree of exposure than the negative binomial distribution. Indeed, the distribution of the number of parasites harbored by each of the

20 pigs that were experimentally and simultaneously challenged with the same inoculum of eggs, indicated that 80% of the pigs contained less than 400 parasites and 20% carried more than 600 cysticerci (Fig. 3). As all the pigs were equally challenged with a thoroughly mixed population of eggs derived from a single harvest, this huge variation in the pigs' parasite load indicates that in *T. solium* cysticercosis there are important genetic differences in susceptibility within the pig population. This is of special interest considering recent findings in which at least one gene seems to be related with resistance to murine cysticercosis (Fragoso et al., 1998). Thus, it is of great interest to explore the involvement of some homologous gene in the genetic differences in susceptibility of pigs reported herein. The important genetic differences found in pig susceptibility to *T. solium* cysticercosis stresses the need for further research on genetic factors involved in transmission.

The results observed in this vaccine trial in which we used rustic pigs are clearly encouraging and offer the possibility of diminishing transmission of *T. solium*.

Acknowledgements

We would like to thank the authorities of the Secretaría de Salud del Estado de Puebla, Mercedes Baca and Tzipe Govezensky for technical assistance. Isabel Pérez Montfort corrected the English version of the manuscript. This work was supported by grants from DGAPA IN212798 and Intercambio Académico, UNAM, the European Union INCO-DC STD3 program, CONACyT 3989P-V, G25955m, the British Council and Fundación Miguel Alemán.

References

- Aluja, A.S.de, Vargas, G., 1988. The histopathology of porcine cysticercosis. *Vet. Parasitol.* 28, 65–77.
- Aluja, A.S., de Martínez, J.J., Villalobos, A., 1998. *Taenia solium* cysticercosis in young pigs: age at first infection and histological characteristics. *Vet. Parasitol.* 76, 71–79.
- Anderson, R.M., May, R.M., 1985. Helminth infections in humans: mathematical models, population dynamics and control. *Adv. Parasitol.* 24, 1–101.
- Freeman, R.S., 1962. Studies on the biology of *Taenia crassiceps* (Zeder, 1800), Rudolphi (1810). *Can. J. Zool.* 40, 969–990.
- Fragoso, G., Lamoyi, E., Mellor, A., Lomelí, C., Hernández, M., Sciutto, E., 1998. Increased resistance to *Taenia crassiceps* murine cysticercosis in Qa-2 transgenic mice. *Infect. Immun.* 66, 760–764.
- García, G., Sciutto, E., José, M.V., Fragoso, G., Cruz-Revilla, C., Toledo, A., Villalobos, N., Flores, I., Aluja, A., Larralde, C., 2000. Taeniasis-cysticercosis: GK1 antibodies inhibit development of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* towards reproductive and pathogenic stages. *J. Parasitol.*, in press
- Larralde, C., Montoya, R.M., Sciutto, E., Díaz, M.L., Govezensky, T., Coltorti, E., 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, 284–292.
- Larralde, C., Sotelo, J., Montoya, R.M., Palencia, G., Padilla, A., Govezensky, T., Díaz, M.L., Sciutto, E., 1990. Antigens from murine *Taenia crassiceps* effectively substitute those from porcine *Taenia solium* in immunodiagnosis for human neurocysticercosis. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 114, 926–928.
- Larralde, C., Padilla, A., Hernández, M., Govezensky, T., Sciutto, E., Gutiérrez, G., Tapia-Conver, R., Salvatierra, B., Sepulveda, J., 1992. Seroepidemiology of cysticercosis in Mexico. *Salud Pública Mex.* 34, 197–210.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.

- Medley, G.F., Guyatt, H.L., Bundy, D.A.P., 1993. A quantitative framework for evaluating the effect of community treatment on the morbidity due to ascariasis. *Parasitology* 106, 211–221.
- Manoutcharian, K., Rosas, G., Hernández, M., Fragoso, G., Aluja, A., Villalobos, M.N., Rodarte, L., Sciutto, E., 1996. Cysticercosis: identification and cloning of protective recombinant antigens. *J. Parasitol.* 82, 250–254.
- Molinari, J.L., Soto, R., Tato, P., Rodríguez, D., Retana, A., Sepúlveda, J., Palet, A., 1993. Immunization against porcine cysticercosis in an endemic area in México: a field and laboratory study. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 49, 502–512.
- Molinari, J.L., Rodríguez, D., Tato, P., Soto, R., Arechavaleta, F., Solano, S., 1997. Field trial for reducing porcine *Taenia solium* cysticercosis in Mexico by systematic vaccination of pigs. *Vet. Parasitol.* 69, 55–63.
- Nascimento, E., Costa, J.O., Guimaraes, M.P., Tavares, C.A., 1995. Effective immune protection of pigs against cysticercosis. *Vet. Immun. Immunopathol.* 45, 127–137.
- Sciutto, E., Hernández, M., García, G., Aluja de, A.S., Villalobos, A.N., Rodarte, L.F., Parkhouse, M., Harrison, L., 1998. Diagnosis of porcine cysticercosis: a comparative study of serological tests for detection of circulating antibody and viable parasites. *Vet. Parasitol.* 78, 185–194.
- Sciutto, E., Aluja de, A.S., Fragoso, G., Rodarte, L.F., Hernández, M., Villalobos, M.N., Padilla, A., Keilbach, N., Baca, M., Govezensky, T., Diaz, S., Larralde, C., 1995. Immunization of pigs against *Taenia solium* cysticercosis: factors related to effective protection. *Vet. Parasitol.* 60, 53–67.
- Sotelo, J.O., Del Brutto, O.H., Román, G., 1996. Cysticercosis. *Curr. Clin. Trop. Infect. Dis.* 16, 240–259.
- Toledo, A., Cruz, C., Fragoso, G., Lacleste, J.P., Merchant, M.T., Hernández, M., Sciutto, E., 1997. In vitro culture of *Taenia crassiceps* larval cells and cyst regeneration after injection into mice. *J. Parasitol.* 83, 189–193.
- Valdez, F., Hernández, M., Govezensky, T., Fragoso, G., Sciutto, E., 1994. Immunization against *Taenia crassiceps* cysticercosis. Identification of the most promising antigens in the induction of protective immunity. *J. Parasitol.* 80, 931–936.



ELSEVIER

Vaccine 20 (2002) 262–266

Vaccine

www.elsevier.com/locate/vaccine

Synthetic peptide vaccine against *Taenia solium* pig cysticercosis: successful vaccination in a controlled field trial in rural Mexico

M. Huerta^c, A.S. de Aluja^b, G. Fragoso^a, A. Toledo^a, N. Villalobos^b, M. Hernández^a, G. Gevorkian^a, G. Acero^a, A. Díaz^d, I. Alvarez^e, R. Avila^e, C. Beltrán^a, G. Garcia^a, J.J. Martinez^b, C. Larralde^a, E. Sciutto^{a,*}

^a Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, AP 70228, México, DF 04510, Mexico

^b Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, México, DF 04510, Mexico

^c Facultad de Medicina, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, Mexico

^d Instituto Mexicano del Seguro Social, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, Mexico

^e Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, Mexico

Received 30 November 2000; received in revised form 6 March 2001; accepted 4 June 2001

Abstract

Taenia solium cysticercosis seriously affects human health when localised in the central nervous system (CNS) and causes great economic loss in pig husbandry in rural areas of endemic countries. Increasing the resistance to the parasite in the obligatory host pig may help in curbing transmission. Three synthetic peptides based on protein sequences of the murine parasite *Taenia crassiceps*, which had previously been shown to induce protection in mice against homologous challenge, were tested as a vaccine against *T. solium* cysticercosis in pigs. Vaccinated and unvaccinated piglets (240 in all) were distributed in pairs among the peasants' households of two rural villages in Mexico in which 14% of the native pigs were cysticercotic. Ten to twelve months later, the effect of vaccination was evaluated at necropsy. Vaccination decreased the total number of *T. solium* cysticerci (98.7%) and reduced the prevalence (52.6%). The natural challenge conditions used in this field trial strengthen the likelihood of successful transmission control to both pig and human through a large-scale pig vaccination program. We believe this is a major contribution in anticysticercosis vaccine development as these rather simple yet protective peptides are potentially more cost-effective to produce and less variable in results than antigens that are more complex. © 2001 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

Keywords: Cysticercosis; Synthetic peptides; Vaccines

1. Introduction

Taenia solium cysticercosis is a common parasitic disease of the central nervous system (CNS) of humans and one of the most frequent neurological disorders in several countries of Latin America, Africa and Asia, where it causes enormous human suffering and great economic loss [1–3]. It is also considered a re-emerging disease in the USA because of immigration of tapeworm carriers from endemic areas [4,5]. Autochthonous cases are still recognised in some countries of eastern Europe, Spain and Portugal [6].

The life cycle of *T. solium* includes a larval phase (metacestode or cysticercus) that develops in both pigs and humans from ingested eggs contaminating the environment. When humans ingest improperly cooked pork meat infected with live cysticerci, the cysticerci develop to the stage of an

adult intestinal tapeworm, which produces millions of eggs that are then shed to the environment in human faeces.

The hope of controlling transmission by massively improving socio-economic standards of the very poor in the developing countries is not foreseeable in the near future. Nevertheless, since the pig is an indispensable intermediate host, it is conceivable to curb transmission by reducing pig cysticercosis through their effective vaccination. Vaccination against metacestode infections with what seems a wide and capricious variety of vaccine preparations has been surprisingly effective (relative to the difficulties found in other antiparasite vaccines) in a number of different cestodes and hosts [7–13].

Developing an effective vaccine against *T. solium* pig cysticercosis is also being pursued by a number of scientists with promising results. However, most reports are based on experimental trials with very few pigs, that do not represent realistic transmission conditions [9,10,12,13] (i.e. in dose and frequency of challenge, age of the host in initial and

* Corresponding author. Tel.: +52-5-6223818; fax: +52-5-6223369.
E-mail address: edda@servidor.unam.mx (E. Sciutto).

subsequent challenges, genetic and nutritional status of pigs). On the other hand, when performed in the field, results are expressed only as yearly changes of in vivo prevalence of pig cysticercosis in the region by tongue inspection [14,15], but do not measure the impact of vaccination upon infection intensity. In addition, changes in prevalence in the next couple of years after vaccination would imply an unlikely immediate and potent effect of vaccination upon the number of tapeworm-carriers in the rural communities. These experimental and preliminary field measurements of the promising effects of pig vaccination, demand a controlled field trial followed by thorough post-mortem counts of viable and damaged cysticerci to critically evaluate the vaccine's effects upon the prevalence and the intensity of pig cysticercosis in highly endemic rural areas.

The composition of the antigens to be included in a *T. solium* vaccine is a major issue. The use of crude antigen extracts from wild cysticerci collected haphazardly from naturally infected cysticercotic pigs can hardly be reproducible, as the mixtures usually include at least 20–50 or so different protein antigens recognisable in Western Blots [16], each carrying unknown numbers of peptidic and possibly glycosidic epitopes. Antigenic diversity among *T. solium*, although largely unexplored, has been shown to be significant [17] and could influence results. Further, some of the natural antigens have protective or infection-enhancing properties in murine *Taenia crassiceps* cysticercosis, whilst others are irrelevant [18,19]. With this in view, simplification of the vaccine composition was considered desirable. Purified natural antigens [9,18] and recombinant proteins of other cestodes [13,20] that have proved to be effective in homologous or heterologous systems are also being tried in *T. solium* pig cysticercosis. We have chosen to test synthetic peptides with a view of eventually expressing them in a more cost-effective biotech system (i.e. phage vectors, transgenic plant expression).

Because of the high costs and slow data retrieval involved in testing pigs in order to identify vaccine candidates, we first used the experimental disease caused in mice by another tapeworm (*T. crassiceps*) [21]. This murine parasite exhibits extensive antigen cross-reactivity [16] and cross-immunity with *T. solium* [22], and its metacestodes easily and rapidly develop in the peritoneal cavity of mice [21]. Thus, we identified and isolated antigens from *T. crassiceps* that effectively protect against experimental *T. crassiceps* murine and experimental *T. solium* porcine cysticercosis [18]. Antibodies against these protective protein fractions were then employed to identify three recombinant antigens in a cDNA library [20]. One of them, namely, KETc7, has been proved to effectively protect mice against *T. crassiceps* cysticercosis by DNA vaccination [23,24], via at least one known peptide stretch of 18 amino acids (GK-1) [25]. From the other two, KETc1 and KETc12, two additional peptides (KETc1/p of 13 and KETc12/p of 9 amino acids) were synthetically produced and confirmed in their capacity to protect mice [26]. The three protective peptidic epitopes identified were

expressed in the different stages of *T. solium*, and represent different immunological targets in the parasite [26].

Thus, we decided to evaluate a vaccine against porcine *T. solium* cysticercosis that is composed of these three chemically synthesised peptidic epitopes (GK-1, KETc1/p, KETc12/p), under realistic field conditions of exposure to infection and under thorough assessment of the infection's prevalence and intensity in vaccinated and control pigs.

2. Materials and methods

2.1. Experimental design

The experimental design is that of a vaccinated and control study with 120 and 120 pigs in each group, distributed in matching pairs (one vaccinated and one control) in 70 village households. The study was performed under the natural exposure conditions of two different rural villages of Mexico that are endemic for pig-cysticercosis (prevalence 14%). The response variables were prevalence (the number of pigs with at least one parasite/total number of pigs in the group) and intensity (the parasite load in each pig, classified as total cysticerci, viable or necrotic) collected from half the carcass of each pig in the study.

2.2. Selection of the communities

Two rural communities, Huatlatlauca and Tepetzintla, in the state of Puebla, Mexico, were selected. In both, the conditions which favour the transmission of *T. solium* were present, namely, the high prevalence of cysticercosis in live pigs (14%, determined by tongue inspection), open air faecalism, local pork meat consumption and extensive domestic pig slaughtering, low personal hygiene and low sanitary conditions in household and village.

2.3. Vaccine

This vaccine consists of the following synthetic peptides: GK-1 (amino acids [aa] from 69 to 85 of KETc7; (Gly Tyr Tyr Pro Ser Asp Pro Asn Thr Phe Thr Ala Pro Pro Tyr Ser **Ala**); KETc1 (Ala Pro Met Ser Thr Pro Ser Ala Thr Ser Val Arg **Gly**) and KETc12 (Gly Asn Leu Leu Leu Ser Cys Leu **Gly**). They were prepared by manual step-wise solid-phase synthesis with *N*-tertbutyloxycarbonyl derivatives of L-amino acids on phenylacetamidomethyl resin (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). Bold letters indicate the extra amino acids that were coupled to the commercial resin. All peptides were 95% pure as judged by high-pressure liquid chromatography on analytical C18 reversed phase columns (3.9 by 150 nm; Delta Park; Waters). The correct amino acid sequence of each peptide was confirmed by protein sequencing on a pulsed liquid-phase protein sequencer (Applied Biosystems). The vaccine was

transported refrigerated to the communities and immediately applied to the animals.

2.4. Pigs and vaccination

Previous research had shown that piglets in villages might be infected in the first few days after birth, as soon as they can follow their mothers in her search for food [27]. We were not certain that an incompletely developed immune system in newborn piglets would respond to vaccination, therefore, the sows of the piglets to be vaccinated were themselves vaccinated during gestation in the hope of reducing the risk of infection of the new-born. Thus, we purchased 49 pregnant sows in the selected communities. Twenty-five of these sows, those that were to breed the vaccinated piglets, were themselves vaccinated subcutaneously at the base of the ear during the last month of gestation with 500 µg of each peptide plus 300 µg of adjuvant (saponin). The remaining 24 pregnant sows, which were to breed the control piglets, were injected with 300 µg of adjuvant, at the same time and site of injection as the vaccinated sows. It was estimated that one hundred and twenty piglets per group (vaccinated and control) was adequate to evaluate the vaccine's effect with 95% confidence intervals at an expected prevalence of 14% of cysticercosis in the control group [28]. One hundred and thirty-eight piglets were vaccinated and 140 that received only adjuvant, served as controls. Of all these, 18 vaccinated and 20 control pigs died of causes not related to vaccination nor to cysticercosis and were excluded from the study. The piglets born to the vaccinated sows were vaccinated twice, at 60 and 90 days of age with 250 µg of each peptide plus 150 µg of saponin in saline isotonic solution at the base of the ear. Piglets born to the control sows received only 150 µg of saponin each at the same ages and under the same conditions as the vaccinated piglets and were kept as controls. After receiving the second dose of vaccine or adjuvant, the piglets were distributed in matched pairs (one vaccinated, one control) among 70 villagers' households, preference being given to those villagers that had been previously identified as having owned infected animals. Each household received one or two matched pairs, thus, possible variations in management and exposure levels among the different households were controlled for all pairs. Villagers were instructed to treat and feed the experimental pigs as they usually do with their own pigs.

2.5. Necropsies

All pigs were humanely killed between the ages of 10 and 12 months. Half the carcass of each animal, together with liver, tongue, masseter muscle and heart were carefully dissected and all parasites counted. Additionally, the cysticerci were macroscopically classified in either viable or necrotic according to their macroscopic aspect (viable cysticerci being those well-limited neatly conserved cystic structures containing clear vesicular fluid, whilst necrotic

cysticerci were no longer cystic but rather semi-solid caseous masses without discernible parasite structures). In addition, samples of parasitised tissues were fixed in buffered 10% formalin (pH 7.2). The samples were then processed for histological observation and stained with haematoxylin-eosin to confirm the macroscopic diagnosis by microscopy [27].

2.6. Statistical analysis

The statistical analyses used were the marginal χ^2 Mac Nemar test to compare the relative risk of being infected in vaccinated versus control pigs according to the results of necropsies in the 120 matched pairs. The non-parametric Mann-Whitney *U*-test was used to compare the number of cysticerci recovered in both groups. The statistical programmes of EPI-Info and SSPS were used.

3. Results

Table 1 shows the effect of vaccination on the reduction of the number of cysticerci in infected pigs (15.8–7.5%). Table 2 summarises the distribution of infected pigs among vaccinated and controls groups. It also shows the number of total, viable and necrotic cysticerci found in each pig. Of the 120 control pigs, 19 (15.8%) were infected: 2 (10.5%) of these with one parasite, 13 (68.4%) with less than 10, and 6 (31.6%) with thousands of cysticerci. From these control pigs, 66,565 cysticerci were collected, (63,951 vesicular and 2614 necrotic). From the 120 vaccinated animals, 9 (7.5%) were infected with at least one parasite: 6 (66%) of these with less than 10, 2 (22%) with less than 100, and only one with 1286 cysticerci. Of these vaccinated pigs, 1369 cysticerci were collected (806 vesicular and 563 necrotic). At 95% level of confidence, results indicate 52.6% efficiency of the vaccine in reducing the number of infected pigs and 97.9% reduction of the total parasite load. The vaccine's reduction of parasite load relevant for transmission would be closer to 99%, if the necrotic cysticerci were of no consequence for transmission. The skewed distribution of the number of cysticerci found in each group should be noted: there being a number of low intensity cases (<10 cysticerci

Table 1
Effect of pig vaccination against *T. solium* cysticercosis on the number of non-infected and infected pigs following field exposure

	Pigs inoculated with	
	Adjuvant (controls)	Adjuvant and peptides (vaccinated)
Non-infected	101 ^a	111
Infected	19	9
Percent	15.8% ^b	7.5%

^a Number of pigs per group.

^b Percent of infected pigs. The relative risk of being infected in vaccinated pigs was significantly lower than in controls ($P < 0.05$, χ^2 marginal test).

Table 2
Effect of pig vaccination against *T. solium* cysticercosis on the numbers of larvae found in the carcasses of infected pigs following field exposure^a

Experimental group	Number of infected pigs	Intensity class (number of cysticerci/pig)					Total (necrotic/vesicular)
		1–10	11–100	101–1000	1001–10000	>10000	
Control							
Number of infected pigs in each intensity class	19	13	0	0	2	4	
Number of cysticerci in each pig		1, 1, 2, 2, 2, 2, 2, 3, 3, 3, 3, 4, 9			2700, 3500	13000, 14950, 15000, 17378	66565 (2614/63951)
Vaccinated							
Number of infected pigs in each intensity class	9	6	2	0	1	0	
Number of cysticerci in each pig		1, 1, 2, 2, 4, 4	34, 35		1286		1364 (563/806)

^a The number of cysticerci recovered in controls was significantly higher than in vaccinated pigs ($P < 0.05$, Mann–Whitney *U*-test).

per pig) in both groups (15 in control and only 6 in vaccinated pigs), whilst massive intensities (>1000 cysticerci per pig) were more commonly found in the control pigs (6 versus 1).

4. Discussion

The prevalence of cysticercosis in the control pigs introduced in these rural villages very closely reproduced the previously estimated *in vivo* prevalence of pig cysticercosis, (15.8% obtained herein versus 14% reported by Huerta et al. [31]). This validates our approach and lends credence and significance to results in the vaccinated group.

The most direct and simple demonstration of the vaccine's effects is that it reduced the prevalence of cysticercosis among the vaccinated pigs by 52.6% and, most significantly, reduced the intensity of infection with viable cysts by 97.9%. That these potent effects were obtained with a mixture of synthetic peptides tested in realistic exposure conditions argues in favour of the effectiveness of vaccination against pig cysticercosis. It is also a strong technical argument towards the development of an effective, less variable, more stable and cost-effective vaccine based on peptides to be used on a wider scale. Even if it were the vaccine's only effects, the reduction in pig cysticercosis prevalence and parasite intensity is greatly beneficial for the villagers' economy because pork meat without cysticercosis sells at much higher prices. In addition, protecting pigs against cysticercosis by vaccination has the economic benefit of allowing the villagers' rustic low-cost form of rearing pigs to be the only one they can afford, to continue. On the other hand, whether pig vaccination actually reduces the number of tapeworms that would eventually develop from lightly parasitised pigs will have to be ascertained in a study designed differently, as there is no known clear-cut correlation between the number of viable cysts in a pig and their probability of becoming a tapeworm upon ingestion by a human host.

The vaccination protocol starting in the gestating sows of the vaccinated piglets leads to the question of which of the vaccinations is the one relevant for the protective effects: the sows' or the piglets' or both? While this point needs to be clarified, the success of the vaccination protocol suggests that vaccination of both pregnant sows and piglets should be considered. Experimentation is under way to determine the cellular and molecular immunological protagonists responsible for the vaccine's efficiency against pig cysticercosis. Should results from *T. crassiceps* murine cysticercosis hold for *T. solium* in pigs, one would expect the participation of TH1-mediated immune responses under the strong influence of genetic and endocrine factors of the host [29–31].

Finally, it is also worth noticing the over-dispersed distribution of parasite intensities in both vaccinated and control groups. There are at least two modes: one of very light intensity infections (<10 parasites per pig) that is sensitive to vaccination (approximately 50% reduction in the vaccinated group), and another of massive intensity infections (with thousands or tens of thousands of parasites per pig), the most vulnerable to vaccination. An over-dispersed distribution of parasite intensities in naturally acquired pig cysticercosis has been documented before [31] and has led to suspect the involvement of host genetics in susceptibility and resistance to *T. solium*, as shown for *T. crassiceps* in mice [29]. Advisability of an extensive pig vaccination program for public health reasons would be strengthened by evaluation of the differential transmission roles of the pigs afflicted with few cysticerci versus the massively infected ones. There would be no question about the public health benefits of vaccination if the total number of cysticerci were the only thing that mattered.

Acknowledgements

This project was performed under a collaborative agreement between Universidad Nacional Autónoma de México and the Benemérita Universidad Autónoma de Puebla,

and was supported by The Howard Hughes Medical Institute, USA, Intercambio Académico, UNAM, CONACyT 3989P-B9607, CONACYT G25955m, DGAPA 212798, UNAM, Fundación Miguel Alemán, Consejo Británico, and SSA Puebla Jurisdicción #9. The authors want to thank the generous support of Dr. Leopoldo Paasch, the technical support of Maribel Nieto Miranda, Jorge Díaz, Mercedes Baca and students of the Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la BUAP, Ms. Judith Zayzarabal who coordinated the daily field operations at the communities and the habitants of these rural communities for their generous support. Isabel Pérez Montfort corrected the English version of the manuscript.

References

- [1] Sciuotto E, Fragoso G, Fleury A, Lacleste JP, Sotelo J, Aluja A, et al. *Taenia solium* disease of humans and pigs: an ancient parasitic disease rooted in developing countries and emerging as a major health problem of global dimensions. *Microb Infect* 2000;2:1875–90.
- [2] Sotelo J, Del Brutto OH. Brain cysticercosis. *Arch Med Res* 2000;31:3–14.
- [3] White AC. Neurocysticercosis: updates on epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and management. *Annu Rev Med* 2000;51:187–206.
- [4] Rosenfeld EA, Byrd SE, Shulman ST. Neurocysticercosis among children in Chicago. *Clin Infect Dis* 1996;23:262–8.
- [5] Schantz PM, Wilkins P, Tsang VCW. Immigrants, imaging, and immunoblots: the emergence of neurocysticercosis as a major public health problem. In: *Proceedings of the American Society of Microbiology*, 1998; Washington, DC, USA. p. 213–42.
- [6] Font Puig C, Ruiz-Postigo JA, Munoz Batet C, Pardos Arnal F, Corachan-Cuyas M. Neurocysticercosis in Spain. Approximately four cases seen in immigrant patients from endemic countries. *Annu Med Int* 1999;16:89–91.
- [7] Lightowers MW. Eradication of *Taenia solium* cysticercosis: role for vaccination of pigs. *Int J Parasitol* 1999;29:811–7.
- [8] Fan PC, Chung WC, Eom KS, Ito A. Vaccination trial against *Taiwan Taenia* eggs in pigs injected with frozen oncospheres of *Taiwan Taenia*, *Korea Taenia*, *T. saginata* or *T. solium*. *Parasitology* 1999;114:541–4.
- [9] Johnson KS, Harrison GBL, Lightowers MW, O'Hoy KL, Dempster RP, Lawrence SB, et al. Vaccination against ovine cysticercosis using a defined recombinant antigen. *Nature* 1989;338:585–7.
- [10] Kumar D, Gaur SNS, Pathak KML. Immunization of pigs against the cysticercus of *Taenia solium* using fractionated first and second peaks of cysticercus cellulosae scolex antigen. *Indian J Anim Sci* 1987;57:932–5.
- [11] Pathak KM, Gaur SN. Immunization of pigs with culture antigens of *Taenia solium*. *Vet Parasitol* 1990;34:353–6.
- [12] Nascimento E, Costa JO, Guimaraes MP, Tavares CA. Effective immune protection of pigs against cysticercosis. *Vet Immunol Immunopathol* 1995;45:127–37.
- [13] Plancarte A, Flisser A, Gauci CG, Lightowers MW. Vaccination against *Taenia solium* cysticercosis in pigs using native and recombinant oncosphere antigens. *Int J Parasitol* 1999;29:643–7.
- [14] Molinari JL, Soto R, Tato P, Rodríguez D, Retana A, Sepulveda J, et al. Immunization against porcine cysticercosis in an endemic area in Mexico: a field and laboratory study. *Am J Trop Med Hyg* 1993;49:502–12.
- [15] Molinari JL, Rodríguez D, Tato P, Soto R, Arechavaleta F, Solano S. Field trial for reducing porcine *Taenia solium* cysticercosis in Mexico by systematic vaccination of pigs. *Vet Parasitol* 1997;69:55–63.
- [16] Larralde C, Montoya RM, Sciuotto E, Diaz ML, Govezensky T, Coltorti E. 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* 1989;40:282–90.
- [17] Yakoleff-Greenhouse V, Flisser A, Sierra A, Larralde C. Analysis of Antigenic variation in cysticerci of *Taenia solium*. *J Parasitol* 1992;68:39–47.
- [18] Valdez F, Hernández M, Govezensky T, Fragoso G, Sciuotto E. Immunization against *Taenia crassiceps* cysticercosis: identification of the most promising antigens in the induction of protective immunity. *J Parasitol* 1994;80:931–6.
- [19] Sciuotto E, Aluja A, Fragoso G, Rodarte LF, Hernández M, Villalobos MN, et al. Immunization of pigs against *Taenia solium* cysticercosis: factors related to effective protection. *Vet Parasitol* 1995;60:53–67.
- [20] Manoutcharian K, Rosas G, Hernández M, Fragoso G, Aluja A, Villalobos N, et al. Cysticercosis: identification and cloning of protective recombinant antigens. *J Parasitol* 1996;82:250–4.
- [21] Freeman RS. Studies on the biology of *Taenia crassiceps* (Zeder, 1800) Rudolphi, 1810 (Cestoda). *Can J Zool* 1962;40:969–90.
- [22] Sciuotto E, Fragoso G, Trueba L, Lemus D, Montoya RM, Diaz ML, et al. Cysticercosis vaccine: cross protecting immunity with *Taenia solium* antigens against experimental murine *Taenia crassiceps* cysticercosis. *Parasite Immunol* 1990;12:687–96.
- [23] Rosas G, Cruz-Revilla C, Fragoso G, Lopez-Casillas F, Perez A, Bonilla MA, et al. *Taenia crassiceps* cysticercosis humoral immune response and protection elicited by DNA immunization. *J Parasitol* 1998;84:516–23.
- [24] Cruz-Revilla C, Rosas G, Fragoso G, Lopez-Casillas F, Toledo A, Larralde C, et al. *Taenia crassiceps* cysticercosis: protective effect and immune response elicited by DNA immunization. *J Parasitol* 2000;86:67–74.
- [25] Toledo A, Larralde C, Fragoso G, Gevorkian G, Manoutcharian K, Hernández M, et al. Towards a *Taenia solium* cysticercosis vaccine: an epitope shared by *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* protects mice against experimental cysticercosis. *Infect Immun* 1999;67:2522–30.
- [26] Toledo A, Fragoso G, Larralde C, Rosas G, Hernández M, Gevorkian G, et al. Two epitopes shared by *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* confer protection against murine cysticercosis along with prominent T1 response. *Infect Immun* 2001;69:1766–73.
- [27] De Aluja AS, Martínez MJJ, Villalobos AN. *Taenia solium* cysticercosis in young pigs: age at first infection and histological characteristics. *Vet Parasitol* 1998;76:71–9.
- [28] Concato J, Shah N, Horwitz RI. Randomized, controlled trials, observational studies, and the hierarchy of research designs. *New Engl J Med* 2000;342:1887–92.
- [29] Fragoso G, Lamoyi E, Mellor A, Lomelí C, Hernández M, Sciuotto E. Increased Resistance to *Taenia crassiceps* Murine Cysticercosis in Qa-2 transgenic mice. *Infect Immun* 1998;66:760–4.
- [30] Terrazas LI, Bojalil R, Govezensky T, Larralde C. Shift from an early protective Th1-type immune response to a late permissive Th2-type response in murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). *J Parasitol* 1998;84:74–81.
- [31] Huerta M, Sciuotto E, García G, Villalobos N, Hernández M, Fragoso G, et al. Vaccination against *Taenia solium* cysticercosis in underfed rustic pigs of México: roles of age, genetic background and antibody response. *Vet Parasitol* 2000;90:209–19.



ELSEVIER

Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®

Veterinary Immunology and Immunopathology 93 (2003) 81–90

Veterinary
immunology
and
immunopathology

www.elsevier.com/locate/vetimm

Th1 and Th2 indices of the immune response in pigs vaccinated against *Taenia solium* cysticercosis suggest various host immune strategies against the parasite

María Alicia Díaz^a, Nelly Villalobos^b, Aline de Aluja^b, Gabriela Rosas^c,
Eduardo Gómez-Conde^a, Pablo Hernández^a, Carlos Larralde^{d,e},
Edda Sciutto^d, Gladis Fragoso^{d,*}

^aCentro de Investigación Biomédica de Oriente, Instituto Mexicano del Seguro Social, Puebla, Mexico

^bFacultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico, DF, Mexico

^cUniversidad del Estado de Morelos, Unidad de Medicina Molecular, Cuernavaca, Morelos, Mexico

^dInstituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico, DF, Mexico

^eCentro Internacional de Ciencias, A.C., Cuernavaca, Morelos, Mexico

Accepted 4 January 2003

Abstract

Kinetics of the production of serum antibody levels and Th1 (IL-2, IFN- γ) and Th2 (IL-4, IL-10) cytokines was studied in five pigs vaccinated with a synthetic tri-peptide vaccine (S3Pvac) against *Taenia solium*, a vaccine that has been shown protects pigs against naturally acquired infection. Healthy pigs of mixed genetic background, similar to those bred in rural villages of Mexico, were vaccinated with S3Pvac or with adjuvant alone, kept in sanitary conditions and bled at different times after vaccination to study the development of their specific immune response. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of vaccinated pigs showed a significant increment in the production of Th1 cytokines (IL-2 and IFN- γ) but not of Th2 cytokines (IL-4 and IL-10) after specific PBLs stimulation with all the individual peptides. A Th1-inclined cytokine profile leading to an exacerbated local inflammation at the early installation stage of the cysticercus may possibly interfere with their successful establishment in the serum antibodies against total cysticercus antigens and against each of the three different peptides comprising S3Pvac were detected 7–51 days after vaccination. Antibodies against GK-1 interfered with the cysticerci development into intestinal tapeworms in prednisolone-treated hamsters. The sub-lethal crippling effect of anti-GK-1 antibodies upon cysticerci indicates to a therapeutic application of S3Pvac in infected pigs having potential epidemiological consequences, as it could aid in decreasing the number of tapeworms expected to develop from the few cysticerci that survive in the vaccinated pigs.

© 2003 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: Vaccination; Immune response; Th1/Th2; Synthetic peptides; Pig cysticercosis; *Taenia solium*

Abbreviations: S3Pvac, synthetic tri-peptide vaccine; TsAg, total *Taenia solium* antigens; SI, stimulation index

* Corresponding author. Tel.: +5255-5622-3153.

E-mail address: gladis@servidor.unam.mx (G. Fragoso).

1. Introduction

Taenia solium taeniasis/cysticercosis is a major parasitic disease of global proportions that poses

serious threats to human health and economy in the third world (Del Brutto et al., 1998; Scitutto et al., 2000). The life cycle of this parasite includes a larval (cysticercus) phase affecting both pigs and humans after ingestion of eggs excreted in the faeces of human tapeworm carriers. The parasite's transmission strategy depends largely in rustic pig rearing, open-air defecation and low hygienic standards of the population (Schantz et al., 1993), and more profoundly in the very slow rate of social and educational development in rural areas of endemic countries. A number of control measures (i.e., meat inspection) have been tried in the third world. However, despite their past success in Europe and its reported effectiveness in local studies (i.e., treatment of tapeworm carriers, uplifting of sanitary conditions) (Hitchcock, 1987; Sotelo et al., 1996), the disease persists and extends worldwide, now threatening millions of poor people in Latin America, Asia and Africa and reemerging in the first world due to human migration (Schantz et al., 1998).

There have been several efforts to develop a vaccine against *T. solium* pig cysticercosis as a way to interfere with transmission. Different candidate immunogens have been tried with promising results in experimental disease (Molinari et al., 1993; Nascimento et al., 1995; Scitutto et al., 1995; Plancarte et al., 1999) or in rural conditions in naturally acquired disease (Molinari et al., 1997). Recently, we developed a synthetic tripeptide vaccine (S3Pvac) comprised of three synthetic peptides of 18, 12 and 8 amino acids present in a *Taenia crassiceps* cDNA library (Manoutcharian et al., 1996; Toledo et al., 1999, 2001) and also in *T. solium* (Huerta et al., 2001). S3Pvac was shown to be effective in a controlled field trial against naturally acquired pig cysticercosis, reducing prevalence (50%) and, more notably, intensity (98%) (Huerta et al., 2001).

The identification of the type and mechanisms of protection of the immune response induced in pigs by S3Pvac has been little explored. Gathering information from various taenia/host relationships, there is general agreement that antibodies can harm early cestode larvae but not developed metacestodes (cysticerci) because of the parasite not exposing vital molecules accessible to antibodies at the metacestode stage (Parkhouse and Harrison, 1989) or by inhibiting complement mediated damage (Laclette et al., 1992). Thus, the prevailing notion is that cysticerci may only

be damaged by cellular immune mechanisms if at all (Bojalil et al., 1993; Terrazas et al., 1999; Mooney et al., 2000). However, in many of the taenia/host relationships studied, an inflammatory process ensues in the host–parasite interface that includes all types of leukocytes responsive to immune signals and considered capable of exerting parasitocidal effects (de Aluja and Vargas, 1988; Padilla et al., 2001; Londono et al., 2002), as they stand or after activation by an additional signal from parasite or host (i.e., antigen liberation, drug treatment). More recently, a novel form of antibody anti-parasite action, characterized not by killing the cysticerci but by interfering with its transformation into tapeworm, has possible epidemiological consequences and brings back antibodies as effective immunological actors in cysticercosis control (García et al., 2001).

Advances in the understanding of the immunological response leading to protection in pigs could help devise strategies by which to enhance its effectiveness. Thus, we moved to characterize the immune response of pigs vaccinated with S3Pvac, focusing on only the most prominent of the Th1 and Th2 markers (IL-4, IL-10, IL-2 and TNF- γ production by PBLs) and serum antibody levels at different times after vaccination as assessed *in vitro* with each separate peptide comprised in the S3Pvac.

2. Materials and methods

2.1. *Anticysticercus* synthetic-peptide vaccine (S3Pvac), peptides and total antigen extract from *T. solium*

The vaccine against cysticercosis (S3Pvac) consists of a 1:1:1 mixture of the three following synthetic peptides: GK-1 (amino acids [aa], (GYYYPSDPN-TFFYAPPYSA), KETc1 (APMSTPSATSVR) and KETc12 (GNLLLSCL). The peptides were prepared in our laboratory by manual stepwise solid-phase synthesis with *N*-tertbutyloxycarbonyl derivatives of L-amino acids on phenylacetamidomethyl resin (Sigma Chemical, St. Louis, MO). All peptides were 95% pure as judged by high-pressure liquid chromatography on analytical C18 reversed phase columns. The correct amino acid sequence of each peptide was confirmed by protein sequencing on a pulsed

liquid-phase protein sequencer (Applied Biosystems). S3Pvac and the separate peptides were maintained refrigerated (2–4 °C) until they were used. For total antigen extract whole *T. solium* cysticerci were obtained from the skeletal muscle of infected pigs', washed with phosphate-buffered saline solution, homogenized, and centrifuged at 25 000 × *g* for 45 min at 4 °C. The soluble antigens in the supernatant were recovered; calcium was precipitated with ammonium oxalate 0.3 M and ammonium hydroxide 1:10 and centrifuged at 25 000 × *g* for further 40 min at 4 °C. The supernatant was recovered and filtered with 0.22 mm in sterile conditions, and protein content quantified by the method of Lowry, and frozen at –20 °C until used as a whole antigen fraction (*TsAg*).

2.2. Pigs and vaccination

To study the immune response induced by S3Pvac 10 piglets of both sexes of mixed genetic background, 2 months of age and free of cysticercosis, were purchased in a rural farm in the state of Puebla, transferred to Mexico City and kept in the farm of the Veterinary School of the Universidad Nacional Autónoma de México in controlled sanitary conditions to prevent infections. Five of the piglets were injected with S3Pvac twice, at 60 and 90 days of age, with 250 µg of each peptide plus 100 µg of saponin in distilled water, subcutaneously (s.c.) at the base of the ear. The other five piglets to be used as controls were also injected s.c. with only 100 µg of saponin at the same ages as were the vaccinated ones. Blood samples from all injected pigs were obtained by intravenous puncture before and at different days (7, 14, 30, 37 and 51) after vaccination to study the kinetics of the humoral and cellular immune responses induced by S3Pvac. To provide with antibodies for the bioassay of cysticerci–tapeworm transformation, four other additional groups of five piglets each were immunized three times at 0, 30 and 60 days with 250 µg of either GK-1, KETc1 or KETc12 mixed with 100 µg of saponin or with 100 µg saponin alone, and bled 30 days after last immunization.

2.3. Antibody detection by ELISA

Sera from pigs immunized with S3Pvac or with each peptide or saponin alone (controls), were processed to

measure specific antibodies by ELISA. To reduce unspecific binding of sera pig components, an enriched Ig fraction of the sera was precipitated by ammonium sulphate, chromatographed and rediluted in 0.15 M PBS before assessment of serum antibody levels by ELISA (Harrison et al., 1989). *T. solium* cyst fluid or each of the peptides (1 µg per well) were used as antigen in ELISA. Briefly, polycarbonate 96 well microtitration plates (Nunc, Roskilde, Denmark) were incubated with 100 µl per well of either *T. solium* cysticerci antigen (*TsAg*) or each of the peptides (1 µg per well of each one) in carbonate buffered saline, pH = 9.6, for 60 min at 37 °C. The wells were then washed and incubated for 60 min at 37 °C with 100 µl of the precipitated Ig fractions diluted in 0.03% PBS-Tween 1:200. Specific antibodies bound to the well were detected with 100 µl of rabbit anti-pig IgG (whole molecule) peroxidase conjugate (Sigma) diluted to optimum concentration (1:1000). The substrate used was 3,3',5,5'-tetra-methyl-benzidine, 5 mg/ml (Sigma). The reaction was stopped using 1 N H₂SO₄, 50 µl per well, and the absorbance values were measured at 450 nm in an ELISA reader (LP400, Pasteur Diagnostics, Paris, France).

2.4. Bioassay of the effects of anti-peptide antibodies on *T. solium* cysticercus-tapeworm transformation

T. solium cysticerci used to infect hamsters were dissected from the skeletal muscle of three different naturally infected pig carcasses, 2–4 h after slaughter in an abattoir of Zacatepec, Morelos. The cysticerci were extensively washed with sterile PBS and placed in RPMI 1640 at 37 °C during 1 h before use. Five cysticerci from each pig were incubated under sterile conditions with 200 µg/ml of enriched Ig fractions from the peptide vaccinated or control pigs in a total volume of 5 ml of RPMI 1640 for 30 min at room temperature. Afterwards, to evaluate the cysticerci capacity to transform into tapeworms (Verster, 1974; García et al., 2001), the cysticerci were orally administrated to five groups of immunodepressed golden hamsters, each group comprised of 4–5 hamsters. Hamsters were immunodepressed with 200 µl of Depo-Medrol (methyl prednisolone acetate, Upjohn, Mexico, 80 µg per hamster), as described (Allan et al., 1991). Hamsters were sacrificed 3 weeks later, and

their intestines were completely dissected to count the number of live tapeworms.

2.5. Proliferation assay and cytokine quantitation

PBMC were harvested from the blood of vaccinated and control pigs the day of immunization (day 0) and at 7, 14, 30, 37 and 51 days after immunization, and immediately passed through a Ficoll-Hypaque gradient 1.077 (Sigma, St. Louis, MO). PBMC were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with L-glutamine (0.2 mM), non-essential amino acids (0.01 mM), penicillin (100 U/ml), streptomycin (100 µg/ml) and FBS (10%). ConA (5 µg/ml) or each of the three peptides (10 µg/ml) or *TsAg* at 10 µg/ml were added to the culture wells containing 2×10^5 PBMC in 200 µl of culture medium and incubated at 37 °C in a 5% CO₂ humidified atmosphere, in flat-bottomed microtiter plates (Costar, Cambridge, MA). After 5 days of incubation, the cellular cultures were pulsed with 1 µCi per well of tritiated methyl thymidine (Amersham Life Science, UK) and incubated for 20 h more. Then, all cells were harvested and the amount of incorporated thymidine was measured in a 1205 β-plate liquid scintillation counter (Wallac Oy, 20101 Turku 10, Finland). Assays were done in triplicate and data are presented as stimulation indexes (SIs were calculated as ratios of cpm from Ag-stimulated cells to matched unstimulated cells from the same pig at the same time-point). Additionally, supernatants from replicate cultures were collected after 72 h of incubation with GK-1, KETc1, KETc12 or *TsAg* for cytokine determination. IL-2, IFN-γ, IL-4 and IL-10 were measured using the ELISA Kit following the recommendations suggested by the manufacturer (Biosource International, California). OD values are reported in pg/ml in a logarithmic scale.

2.6. Statistical analysis

All statistical analyses were performed using Spss 10.0. Although the design is multifactorial, the number of pigs employed is insufficient for a multifactorial analysis. Thus, we focused the analysis on whether there are immune response differences between pigs injected with S3Pvac plus saponin (vaccinated) and those injected with saponin alone (control) in the six different immunological parameters at five different

days after injection. The data for each immunological parameter was analyzed by two-way ANOVA, with treatments (vaccinated, control) and days after vaccination (0, 7, 15, 30, 37 and 51) as independent variables, and the average value of duplicate or triplicate measurements of each response parameter in each of the five pigs as the dependent variable.

3. Results

There is considerable variation in response between pigs in all graphs, more pronounced in the vaccinated group than in controls.

3.1. Antibody response

The levels of total antibodies elicited by vaccination against total *TsAg*, or GK-1, KETc1 and KETc12 peptide is shown in Fig. 1. Levels of antibodies against GK-1, KETc1 and KETc12 are significantly greater than those of controls after the first immunization ($P < 0.001$) and remain so throughout the experiment (51 days later). Antibodies against *TsAg* show a tendency to increase in the vaccinated pigs after day 14th but it is not statistically significant.

3.2. Cellular immune response

The proliferative responses of PBMC from vaccinated and control pigs throughout the experiment are shown in Fig. 2, and are expressed as the SI calculated as the ratio of cpm from stimulated to matched unstimulated cells in each pig at each day after vaccination and as elicited by each antigen or peptide. The PBMC response to *in vitro* stimulation with the peptides and with whole *TsAg* varied considerably among pigs and days after vaccination but there is a statistically significant trend to increased values in the vaccinated pigs for KETc12 and KETc1.

The levels of IL-2, IL-4, IL-10 and INF-γ were determined in the supernatant of PBLs from control and vaccinated pigs at 7, 30 and 37 days postimmunization and after inducing their specific proliferation with GK-1, KETc1 and KETc12 (Fig. 3). Here again there was considerable variation among pigs. IL-2 and INF-γ levels were significantly higher in vaccinated pigs than in controls ($P < 0.05$) when they were

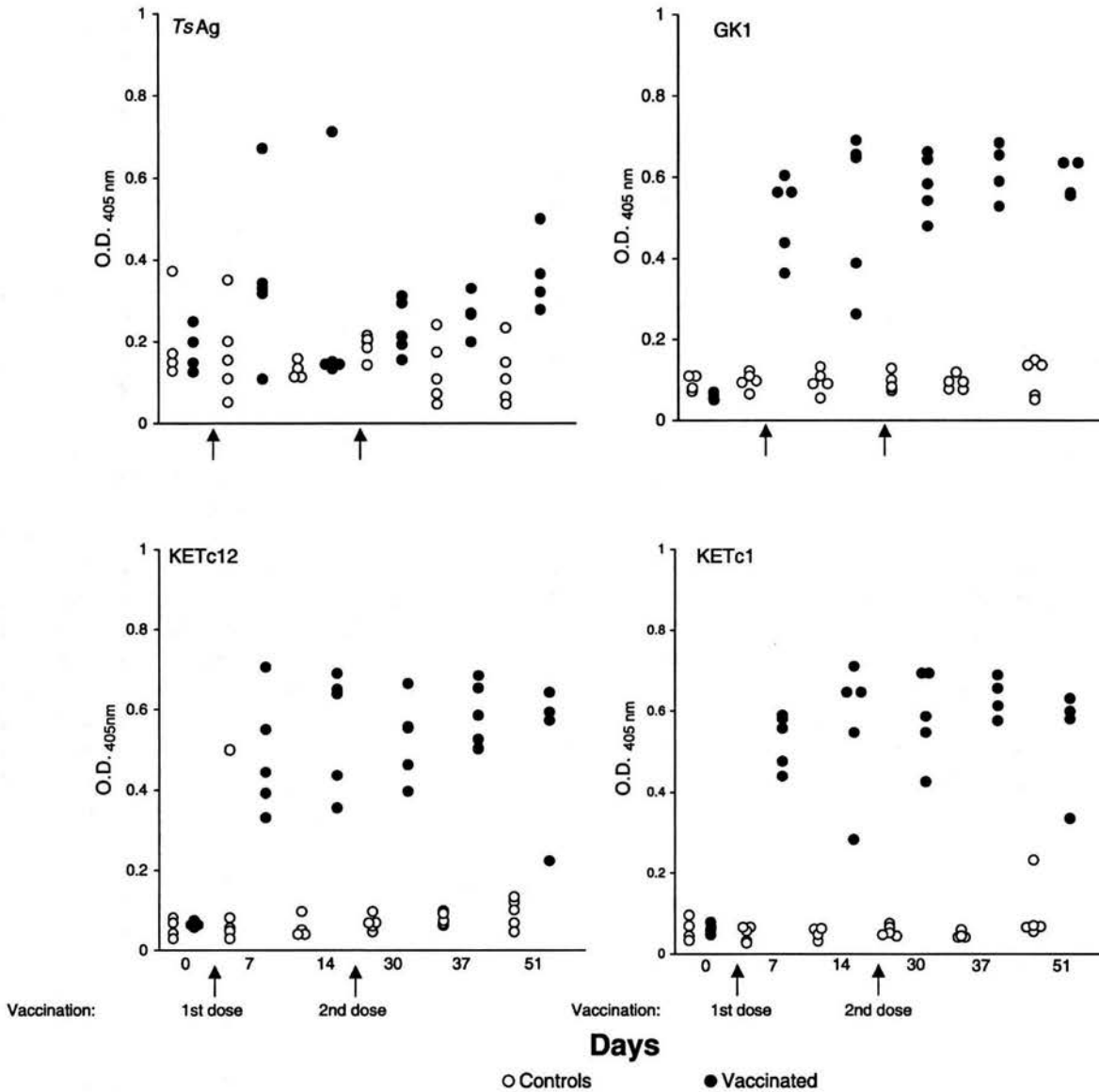


Fig. 1. Antibody response of pigs immunized with saponine (control) or S3Pvac against TsAg or GK-1, KETc1 and KETc12 peptides. Control and vaccinated pigs were bled before immunization and after the first and second dose of S3Pvac. The levels of antibodies were determined by ELISA in total Igs purified from sera. Each point represents the antibody level per pig.

stimulated *in vitro* with GK-1, KETc1 and KETc12. The increased levels of these cytokines did not change at the different days after vaccination. Thus, values for each cytokine from all days in each pig were pooled and then contrasted by two-way ANOVA (with *vaccinated* and *control* pigs and type of *interleukin* as independent variables and amount of cytokine

produced by each sample of each pig as dependent variable). IL-2 and INF- γ levels were significantly higher in vaccinated pigs than in controls ($P < 0.0001$) when they were stimulated *in vitro* with GK-1, KETc1 and KETc12 (Fig. 3) but no differences were detected neither in IL-4 ($P > 0.17$) nor in IL-10 ($P > 0.56$) cytokines.

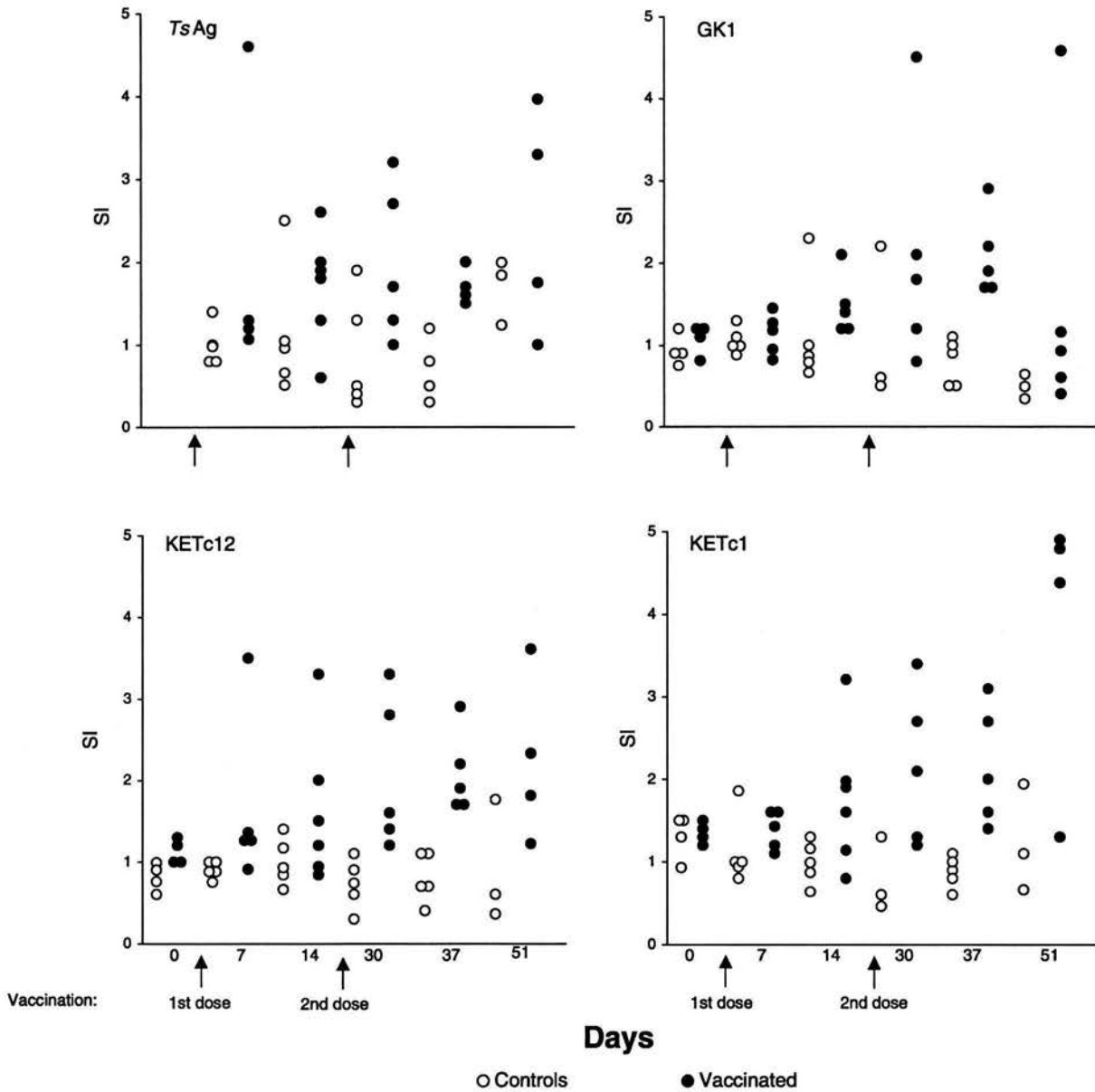


Fig. 2. Proliferative response of PBL cells from pigs immunized with saponine (control) or S3Pvac. Proliferation was measured by [methyl-³H] thymidine incorporation on day 5 of culture either with TsAg (10 µg per well) or with the peptide GK-1, KETc1 or KETc12 peptides (10 µg per well). Data is shown as SI (SI = cpm after vs. before stimulation from the same pig). Each point represents the SI of each individual pig.

3.3. Effect of anti-peptide antibodies on *T. solium* cyst transformation

Table 1 shows the number of cysticerci that transformed into tapeworms after preincubation with med-

ium, non-immune pig enriched-Igs and anti-peptide pig enriched-Igs. Transformation was tested in cysticerci collected from three different infected pigs, and each collection was tested in 4–5 different hamsters, 5 cysticerci per hamster per preincubation treatment.

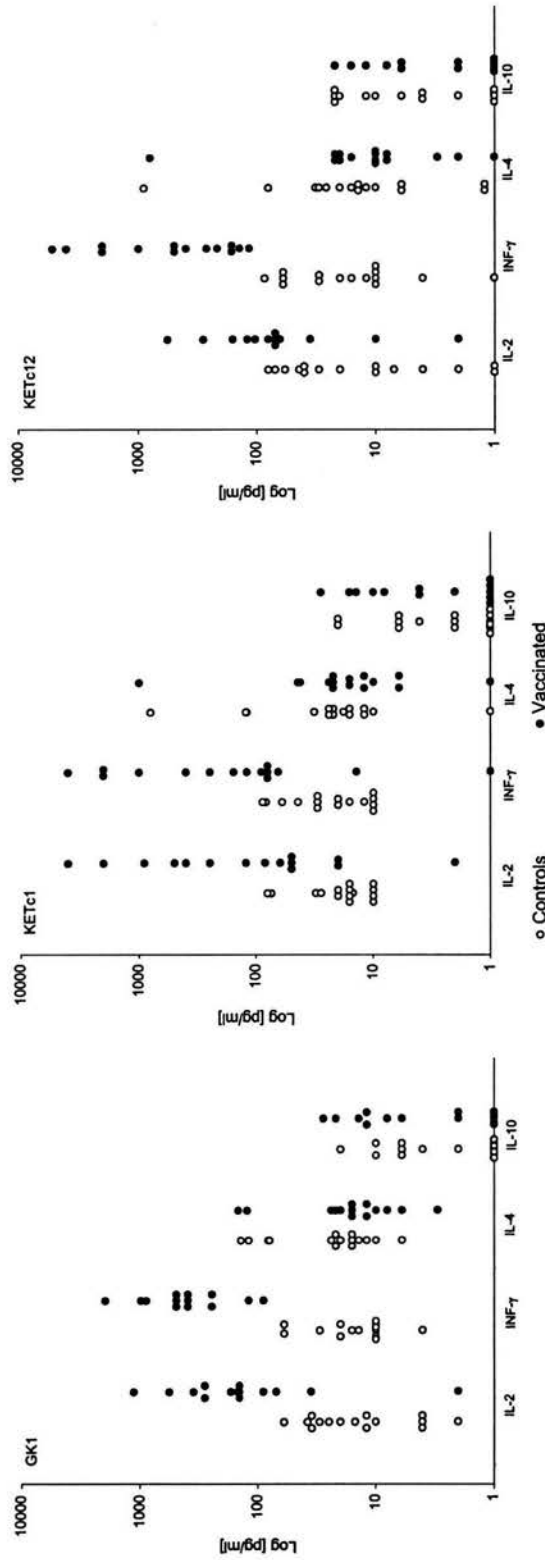


Fig. 3. Levels of IL-2, IL-4, IL-10 and INF- γ measured in the supernatant of cells from pigs immunized with saponine (control) or S3Pvac after 5 days of in vitro stimulation with the corresponding peptide GK-1, KETc1 or KETc12. All values from vaccinated pigs obtained at 7, 30 and 37 days postimmunization in each pig were pooled to illustrate the results. Statistically significant differences between vaccinated and control pigs were found in IL-2 and INF- γ responses ($P < 0.0001$), using the *t*-Student's test.

Table 1

Effect of antibodies induced by the immunization with each synthetic peptide that constitutes the S3Pvac vaccine on *T. solium* cysticerci

	Donor pig		
	1	2	3
Cysticerci were incubated with			
Medium	1, 2, 1, 1 ^a	3, 0, 1, 1	2, 1, 2, 0
Pigs immunized with ^b adjuvant (saponin)	1, 2, 0, 1	0, 1, 0, 1	1, 2, 0, 1
GK-1 ^c	0, 0, 0, 0	0, 0, 0, 0	0, 0, 0, 0
KETc1	2, 0, 0, 2	0, 2, 1, 2	2, 1, 4, 1
KETc12	0, 1, 4, 1	2, 5, 0, 1	1, 1, 4, 2

^a Number of tapeworm(s) found in each hamster 21 days after oral infection with five *T. solium* cysticerci per hamster. Cysticerci used in each experiment were from three different pigs. Cysticerci were previously incubated with medium or Ig-rich fraction (200 µg in 5 ml).

^b Igs were purified from pigs immunized with saponin (control) or saponin plus GK-1, KETc1 or KETc12, respectively.

^c The only preincubation treatment that ANOVA significantly contributed to variance ($F = 4.956, P < 0.002$).

There is no statistically significant transformation effect of preincubation of the cysticerci with medium alone, nor with anti-KETc1 and anti-KETc12 pig Igs. Only those cysticerci that were cultured with anti-GK-1 enriched-Igs were totally inhibited in their transformation to tapeworms in all the hamsters tested and in all three different collections of cysticerci. Statistical significance of these results was studied by two-way ANOVA, with preincubation treatment (five levels, rows) and identity of infected donor pigs from which cysticerci were collected (three levels, columns) as independent variables, and hamsters as replications (four replications). ANOVA revealed that only preincubation of cysticerci with GK-1 enriched-Igs had significantly contributed to the total variance in the number of tapeworms found in the intestines of the hamsters ($F = 4.956, P < 0.002$).

4. Discussion

A synthetic tripeptide vaccine (S3Pvac) against *T. solium* pig cysticercosis was recently shown to be effective in rural pigs exposed to naturally acquired infection in a field trial (Huerta et al., 2001). Herein, we report of the involvement of both Th1 and Th2

effectors in the vaccinated pigs reaction to infection and discuss the possible mechanisms involved in protection.

Firstly, we found considerable variation within pigs in the magnitude of their different responses. This is an important observation possibly related to the highly diverse genetic background of rural pigs in Mexico. This may explain the SP3vac's incomplete efficiency in the reduction of prevalence (50%), as well as the variable reductions in the individual pigs parasite intensities and in the proportions of damaged cysticerci that establish in each individual vaccinated pig (Huerta et al., 2001).

Despite between pigs variation, statistically significant higher levels of antibodies were found in the group of vaccinated pigs compared with controls. The higher levels of anti-GK-1, KETc1 and KETc12 antibodies, SI and Th1 cytokines were observed as early as 7 days after S3Pvac immunization in all pigs and remained unchanged until the end of the experiment (51 days), in spite of the booster given in the 30th day. Differences in antibody levels between vaccinated and control pigs are more evident when using as ligand the isolated peptides than when using the complete antigen preparation, a fact we suspect results from the peptides low relative concentration in the complete antigen preparation and from the high background of non-specific binding that is common when complex antigen mixtures are used in ELISA (Toledo et al., 1999).

Thus, our results of increased levels of specific anti-peptide antibodies and higher PBMC stimulation indexes in vaccinated pigs, with and emphasis in Th1 cytokine production resembles that induced in mice by S3Pvac (Toledo et al., 1999, 2001). A Th1 response is also implicated in early experimental infection of mice as the immune mechanism that limits parasite successful establishment and eventual multiplication (Villa and Kuhn, 1996; Terrazas et al., 1998). In our study of pigs vaccinated with S3Pvac, results also indicate to a strong Th1 response, in at least IFN-γ, IL-2, and to no response of Th2, as measured by IL-4 and IL-10, other than antibody production. Enhanced lymphocyte proliferation to the three peptides, GK-1, KETc1 and KETc12, and TsAg occurred in pigs as early as 14 days after vaccination and remained at similar high levels for the rest of the study (51 days), and so did the Th1 cytokines

(IL-2 and IFN- γ) but not the Th2 cytokines that did never exceed the control values.

With respect to the biological activity of the anti-peptide antibodies elicited by S3Pvac, our results show that pig anti-GK-1 antibodies but not the other anti-peptide antibodies block *T. solium*'s transformation from cysticerci to tapeworm in prednisolone-treated hamsters (a model of *T. solium* taeniasis developed in immunodeficient hamsters (Verster, 1974)). It would seem that the pigs' anti-GK-1 antibodies do just as the mice anti-GK-1 antibodies did when this crippling effect was first described: a subtle yet effective antiparasite activity blocking its reproduction, as opposed to the more ostensible killing effects (García et al., 2001). The crippling function of pigs anti-GK-1 antibodies has possible application as a way to lower the transmission potential of *T. solium* cysticerci of S3Pvac vaccinated pigs. Anti-parasite activity differences among the anti-peptide Igs could relate with the localization of the native antigen bearing the peptide epitopes in the live cysticerci and with the varying consequences for the parasite of the binding of antibody to each epitope (Toledo et al., 1999, 2001).

The between pigs variability in the immune response induced by the different peptides comprised in the S3Pvac follows from so complicated a parasite as *T. solium* and from so diverse a genetic background as that of the rural pigs in Mexico, and is possibly enhanced by varying degrees of exposure to infection. Nonetheless, naturally occurring infection is the real scenario where vaccines have to show their real worthiness. The description of the immune response of vaccinated pigs contained in this paper is far from complete, we dealt here with some of the more conspicuous indices. But even at this level of simplification, the complexity of this host–parasite relationship is already showing and would advise to consider the use of multiepitope vaccines as a way to complement a more effective defense strategy against the parasites various stages and multifaceted strategies (Toledo et al., 1999, 2001; Shi et al., 1999).

Acknowledgements

The authors thank Gema Aguilar, Andrea Toledo, Rubén Aquino, Marisela Hernández, Gonzalo Acero, Samuel Cruz, Marisela Hernández and Mercedes Baca

for their technical support, Felipe Massó for performing the peptides' sequence analysis, Elvira Salazar for helping in the English version of the manuscript. This investigation was partially supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, G25955m, Fundación Miguel Alemán, México, Dirección General de Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México, IN212401, Coordinación de Investigación Médica del IMSS FOFOI 1213, The British Council and by the Howard Hughes Medical Institute.

References

- Allan, J.C., Garcia-Dominguez, C., Craig, P.S., Rogan, M.T., Lowe, B.S., Flisser, A., 1991. Sexual development of *Taenia solium* in hamsters. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 85, 573–576.
- de Aluja, A., Vargas, G., 1988. The histopathology of porcine cysticercosis. *Vet. Parasitol.* 28, 65–77.
- Bojalil, R., Terrazas, L.I., Govezensky, T., Sciutto, E., Larralde, C., 1993. Thymus-related cellular immune mechanisms in sex-associated resistance to experimental murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). *J. Parasitol.* 79, 384–389.
- Del Brutto, O.H., Sotelo, J., Roman, G.C., 1998. Neurocysticercosis. A Clinical Handbook. Swets & Zeitlinger, Lisse, The Netherlands.
- García, G., Sciutto, E., Fragoso, G., Cruz, C., Toledo, A., Villalobos, N., Flores, I., Aluja, A., José, M.V., Larralde, C., 2001. Inhibitory role of antibodies in the development of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* towards reproductive and pathogenic stages. *J. Parasitol.* 87, 582–586.
- Harrison, L.J.S., Joshua, G.W.P., Wright, S.H., Parkhouse, R.M.E., 1989. Specific detection of circulating surface/secreted glycoproteins of viable cysticerci in *Taenia saginata* cysticercosis. *Parasite Immunol.* 11, 351–370.
- Hitchcock, E.R., 1987. Cysticercosis in the UK. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 50, 1080–1081.
- Huerta, M., de Aluja, A.S., Fragoso, G., Toledo, A., Villalobos, N., Hernández, M., Gevorkian, G., Acero, G., Díaz, A., Alvarez, I., Avila, R., Beltrán, C., García, G., Martínez, J.J., Larralde, C., Sciutto, E., 2001. Synthetic peptide vaccine against *Taenia solium* pig cysticercosis: successful vaccination in a controlled field trial in rural Mexico. *Vaccine* 20, 262–266.
- Laclette, J.P., Shoemaker, C.B., Richter, D., Arcos, L., Pante, N., Cohen, C., Bing, D., Nicholson-Weller, A., 1992. Paramyosin inhibits complement C1. *J. Immunol.* 148, 124–128.
- Londono, D.P., Alvarez, J.I., Trujillo, J., Jaramillo, M.M., Restrepo, B.I., 2002. The inflammatory cell infiltrates in porcine cysticercosis: immunohistochemical analysis during various stages of infection. *Vet. Parasitol.* 109, 249–259.
- Manoutcharian, K., Rosas, G., Hernandez, M., Fragoso, G., Aluja, A., Villalobos, N., Rodarte, L.F., Sciutto, E., 1996. Cysticercosis: identification and cloning of protective recombinant antigens. *J. Parasitol.* 82, 250–254.

- Molinari, J.L., Soto, R., Tato, P., Rodriguez, D., Retana, A., Sepulveda, J., Palet, A., 1993. Immunization against porcine cysticercosis in an endemic area in Mexico: a field and laboratory study. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 49, 502–512.
- Molinari, J.L., Rodriguez, D., Tato, P., Soto, R., Arechavaleta, F., Solano, S., 1997. Field trial for reducing porcine *Taenia solium* cysticercosis in Mexico by systematic vaccination of pigs. *Vet. Parasitol.* 69, 55–63.
- Mooney, K.A., Spolski, R.J., See, E.J., Kuhn, R.E., 2000. Immune destruction of larval *Taenia crassiceps* in mice. *Infect. Immun.* 68, 2393–2401.
- Nascimento, E., Costa, J.O., Guimaraes, M.P., Tavares, C.A., 1995. Effective immune protection of pigs against cysticercosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 45, 127–137.
- Padilla, A., Govezensky, T., Sciutto, E., Jimenez-Garcia, L.F., Gonshebbat, M.E., Ramirez, P., Larralde, C., 2001. Kinetics and characterization of cellular responses in the peritoneal cavity of mice infected with *Taenia crassiceps*. *J. Parasitol.* 87, 591–599.
- Parkhouse, R.M., Harrison, L.J., 1989. Antigens of parasitic helminths in diagnosis, protection and pathology. *Parasitology* 99, S5–S9.
- Plancarte, A., Flisser, A., Gauci, C.G., Lightowlers, M.W., 1999. Vaccination against *Taenia solium* cysticercosis in pigs using native and recombinant oncosphere antigens. *Int. J. Parasitol.* 9, 643–664.
- Schantz, P.M., Cruz, M., Sarti, E., Pawlowski, Z., 1993. Potential eradicability of taeniasis and cysticercosis. *Bull. Pan. Am. Health Organ.* 27, 397–403.
- Schantz, P.M., Wilkins, P.P., Tsang, V.C.W., 1998. Immigrants, Imaging and Immunoblots: the Emergence of Neurocysticercosis as a Major Public Health Problem. American Society for Microbiology, Washington, DC.
- Sciutto, E., Aluja, A., Fragoso, G., Rodarte, L.F., Hernández, M., Villalobos, M.N., Padilla, A., Keilbach, N., Baca, M., Govezensky, T., Díaz, S., Larralde, C., 1995. Immunization of pigs against *Taenia solium* cysticercosis: factors related to effective protection. *Vet. Parasitol.* 60, 53–67.
- Sciutto, E., Fragoso, G., Fleury, A., Lacleite, J.P., Sotelo, J., Aluja, A., Vargas, L., Larralde, C., 2000. *Taenia solium* disease of humans and pigs: an ancient parasitic disease rooted in developing countries and emerging as a major health problem of global dimensions. *Microbes Infect.* 2, 1875–1890.
- Shi, Y.P., Hasnain, S.E., Sacci, J.B., Holloway, B.P., Fujioka, H., Kumar, N., Wohlhueter, R., Hoffman, S.L., Collins, W.E., Lal, A.A., 1999. Immunogenicity and in vitro protective efficacy of a recombinant multistage *Plasmodium falciparum* candidate vaccine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 16, 1615–1620.
- Sotelo, J., Del Brutto, O., Roman, G., 1996. Cysticercosis: current clinical topics in Infectious Diseases. In: Remington, J., Swartz, M. (Eds.), Blackwell Science, pp. 240–259.
- Terrazas, L.I., Bojalil, R., Govezensky, T., Larralde, C., 1998. Shift from an early protective Th1-type immune response to a late permissive Th2-type response in murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). *J. Parasitol.* 84, 74–81.
- Terrazas, L.I., Cruz, M., Rodriguez-Sosa, M., Bojalil, R., Garcia-Tamayo, F., Larralde, C., 1999. Th1-type cytokines improve resistance to murine cysticercosis caused by *Taenia crassiceps*. *Parasitol. Res.* 85, 135–141.
- Toledo, A., Larralde, C., Fragoso, G., Gevorkian, G., Manoutcharian, K., Hernández, M., Acero, G., Rosas, G., López-Casillas, F., Kubli, C., Vázquez, R., Terrazas, I., Sciutto, E., 1999. Towards a *Taenia solium* cysticercosis vaccine: an epitope shared by *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* protects mice against experimental cysticercosis. *Infect. Immun.* 67, 2522–2530.
- Toledo, A., Fragoso, G., Larralde, C., Rosas, G., Hernández, M., Gevorkian, G., López-Casillas, F., Hernández, B., Acero, G., Huerta, M., Sciutto, E., 2001. Two epitopes shared by *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* confer protection against murine *T. crassiceps* cysticercosis along with a prominent T1 response. *Infect. Immun.* 69, 1766–1773.
- Verster, A., 1974. The golden hamster as a definitive host of *Taenia solium* and *Taenia saginata*. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 41, 23–28.
- Villa, O.F., Kuhn, R.E., 1996. Mice infected with the larvae of *Taenia crassiceps* exhibit a Th2-like immune response with concomitant energy and downregulation of Th1-associated phenomena. *Parasitology* 112, 561–570.



ELSEVIER

Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®

Veterinary Immunology and Immunopathology 99 (2004) 11–24

Veterinary
immunology
and
immunopathology

www.elsevier.com/locate/vetimm

Recombinant bacteriophage-based multiepitope vaccine against *Taenia solium* pig cysticercosis

Karen Manoutcharian^{a,*}, Alicia Díaz-Orea^b, Goar Gevorkian^a, Gladis Fragoso^a, Gonzalo Acero^a, Erik González^a, Aline de Aluja^c, Nelly Villalobos^c, Eduardo Gómez-Conde^b, Edda Sciutto^a

^aInstituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México CP 04510, D.F., Mexico

^bCentro de Investigación Biomédica de Oriente, Instituto Mexicano del Seguro Social, Cerrada 16 Sur #10, CP 72540 Puebla, Mexico

^cFacultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, México CP 04510, D.F., Mexico

Received 22 August 2003; received in revised form 26 November 2003; accepted 22 December 2003

Abstract

The aim of this study was to test the capacity of recombinant phages to deliver antigens for vaccination against porcine cysticercosis. Thus, three peptides (KETc1, KETc12, GK1) and a recombinant antigen KETc7, previously proven to induce high levels of protection against pig cysticercosis, were expressed on the surface of the M13 bacteriophage at multiple copies. The pool of these four recombinant phages induced high levels of protection against an experimental murine cysticercosis. The immunogenicity of the phage vaccine preparation was therefore, tested in pigs, the natural host of *Taenia solium*. Subcutaneous or oral vaccination with these phages induced antigen-specific cellular immune responses in pigs. Preliminary data also points to the protective capacity of this recombinant phage vaccine against pig cysticercosis. The immunogenicity of these recombinant phages, together with the low cost of their production, make them a realistic candidate to be tested in pigs as an anti-cysticercus phage vaccine for field trials. This is the first report describing the application of a filamentous bacteriophage as a vaccine in large animals such as pigs, the only intermediate hosts of *T. solium*, a parasite of major medical importance in developing countries. The potential application of phages as a modern platform for vaccines for human and animal diseases is discussed. © 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Phage display; Vaccination; *Taenia solium*; Pig cysticercosis; Synthetic vaccine

1. Introduction

Phage display is based on the fusion of foreign peptides/proteins to bacteriophage coat proteins and

their expression on the surface of phage (generally, M13, fd or λ). Since the DNA fragments or genes encoding expressed molecules are fused to coat protein genes of phages, a physical linkage is established between phage phenotype and genotype. Phage libraries displaying large repertoires (up to 10^{11} members) of peptides, antibody fragments or cDNAs allow in vitro and in vivo characterization of virtually any

* Corresponding author. Tel.: +52-55-56-22-38-69;

fax: +52-55-56-22-38-55.

E-mail address: karman@servidor.unam.mx (K. Manoutcharian).

protein–protein, enzyme–substrate, receptor–ligand, protein–DNA or even protein–non-protein interaction using bioselection (biopanning) procedures (Rodi and Makowski, 1999; Sidhu, 2000; Manoutcharian et al., 2001). In numerous studies, antibody specificities have been characterized by this powerful system in various diseases including viral infections, cancer and autoimmune disorders (Rodi and Makowski, 1999; Sidhu, 2000; Manoutcharian et al., 2001). Also, the immunogenic features of the phage expressing peptides of interest have been extensively studied in mice and rabbits (De la Cruz et al., 1988; Manoutcharian et al., 2001). In addition, it has been shown that phage particles were highly immunogenic and were capable of inducing antigen-specific Abs without the requirement of adjuvants (Willis et al., 1993; Meola et al., 1995), due to the ability of the phage to recruit helper T-cells. Also, induction of a cytotoxic-T-lymphocyte immune response has been reported with phage particles. Indeed, we have previously shown the generation of protective cellular immune response against murine cysticercosis using recombinant phage expressing T-cell epitopes as immunogens (Manoutcharian et al., 1999). Recently, the induction of HIV-1-specific cytotoxic-T-lymphocyte immune response in mice immunized with a cytotoxic-T-lymphocyte epitope displayed on phages was reported (De Berardinis et al., 2000). Phages were used as immunogens to confer antibody-mediated protection in mice against human respiratory syncytial virus (RSV) (Bastien et al., 1997), HSV-2 (Grabowska et al., 2000) and against streptococcal infection (Magliani et al., 1998). Surprisingly, despite these data showing the strong immunogenic potential of the phage, there have been very few studies describing the application of phage as vaccines.

Neurocysticercosis caused by *Taenia solium* is a most common parasitic disease of the central nervous system (CNS) and it seriously affects human health at a worldwide scale (White, 1997; Scitutto et al., 2000). The indispensable role of pigs as an obligatory intermediate host in the life cycle of the parasite offers the possibility of interfering with transmission through the vaccination of pigs. Therefore, the development of anti-cysticercosis vaccine was pursued by a number of research groups (Nascimento et al., 1995; Molinari et al., 1997; Toledo et al., 1999; Lightowers et al., 2000; Lightowers, 2003). Murine cysticercosis caused

by *Taenia crassiceps*, a cestode that exhibits antigen similarities with *T. solium*, has been extensively used to test different vaccine candidates and vaccination approaches (Manoutcharian et al., 1999; Toledo et al., 1999). Protective recombinant *T. crassiceps* antigens which cross react with *T. solium* were isolated from a cDNA expression library (Manoutcharian et al., 1996) and three epitopes from these antigens named GK1, KETc1 and KETc12 were used in the form of synthetic peptides as a three peptide-synthetic vaccine (S3Pvac) against murine (Toledo et al., 1999) and porcine cysticercosis (Huerta et al., 2001). S3Pvac has been successfully evaluated in a field trial in 240 pigs (120 vaccinated and 120 controls) naturally exposed to the parasite during 12 months. However, the high costs of production of synthetic peptides limit their widespread use. In the present study, we propose the use of an antigen delivery system based on the use of phage display to improve the immunogenicity of this synthetic peptide vaccine and to reduce the costs of its production. Our results demonstrate the immunogenic potential of recombinant phages in pigs and their feasibility to be used as valuable molecular vaccine carriers.

2. Materials and methods

2.1. Construction of recombinant phages for anti-cysticerci phage vaccine (CPhV)

T. crassiceps 96 aa long antigen KETc7 (Manoutcharian et al., 1996), KETc7-derived peptide GK1 (aa 69–95, GYYPSDPNTFYAPPYSA), *T. crassiceps* recombinant antigen-derived peptides KETc1 (APMSTPSATSVRG) and KETc12 (GNLLSCLG) (Huerta et al., 2001) were expressed on the phage surface by cloning the corresponding DNA fragments in phage/phagemid vectors. Bold letters indicate the additional amino acids which were coupled to the commercial resin. All molecular biology procedures were carried out using standard protocols (Sambrook et al., 1989) or as recommended by manufacturers. Restriction enzymes, DNA purification kits, DNA polymerase, T4 DNA ligase and helper phage were obtained from Invitrogen, CA, USA. The synthetic oligonucleotides (oligos) were synthesized at Invitrogen. The DNA fragment coding for KETc7 was

generated by PCR from pTc-sp7 plasmid (Rosas et al., 1998), using the primers 5'K7: TTA₂CTCGAATTCTCGGCCAGCCGGCCGCACGAGCATTTATGCAG and 3'K7: CTCAAGGATCCGCGCCCGCAAGATTCTTCTTATCTTCTGGTTC introducing *Eco*RI and *Bam*HI restriction sites at 5 and 3' ends of the DNA fragment, respectively. The DNA fragments coding for GK1 and KETc12 were generated by combining two pairs of oligos 5'GK1: AATTAGGTTATTACTATCCATCTGATCCAAATACCTTCTACGCTCCACCCTACAGC and 3'GK1: GATCGCTGTAGGGTGAGCGTAGAAGGTATTTGGATCAGATGGATAGTAATAACCT for GK1 and 5'KETc12: AATTAGGCAACCTCTTATTGAGTTGTTTG and 3'KETc12: GATCCCAACAACCTCAATAAGAGGTTGCCT for KETc12, respectively, in two separate annealing reactions as described (Manoutcharian et al., 1999) introducing flanking *Eco*RI and *Bam*HI sites. These three DNAs were digested with *Eco*RI/*Bam*HI and purified from agarose gel or ethanol precipitate. About 1 µg of each DNA sample was ligated with T4 DNA ligase to approximately 0.5 µg of similarly digested pF8 phagemid vector DNA, which is similar to the previously described pF3 vector (Manoutcharian et al., 1999), except that foreign peptides are fused to M13 cpVIII. The ligation mixtures were used to transform *Escherichia coli* TG-1 cells and resultant recombinant phagemids FK7, FGK1 and FKETc12 were rescued and amplified by superinfection with M13KO7 helper phage (Invitrogen) as described previously (Manoutcharian et al., 1999).

The PhD Peptide Display Cloning System (New England Biolabs, Beverly, MA, USA) was used to construct FKETc1 recombinant phage. The primer 3'KETc1: ATGTTTCGGCCGACCGAACCAGATGTAGCCGATGGTGTAGATGGAGCAGAGTGAGAA-TAGAAAGGT and the extension primer EP: CATGCCGGGTACCTTTCTATTCTC were used to synthesize a DNA fragment coding for KETc1 and carrying *Acc*I/*Eag*I restriction sites according to manufacturer's instructions. This DNA was cloned into the M13KE phage vector, and the recombinant phage clone FKETc1 was amplified by infecting TG-1 cells. The correct PCR and cloning were verified by dideoxy DNA sequencing using [α -³⁵S] dATP (Amersham-Life Science) and Sequenase Quick-Denature plasmid sequencing kit (Amersham). Recombinant phage particles were purified from 2 l of 2 × YT by double

PEG/NaCl (20% (w/v) polyethylene glycol-8000, 2.5 M NaCl) precipitation and resuspended in Tris-buffered saline (TBS). Typical yields of phagemid/phage particles were 5×10^{11} and 5×10^{12} ml⁻¹ of culture medium, respectively.

2.2. Immunization of mice

Six-week-old female BALB/cAnN mice, bred in our animal facilities by brother–sister mating for over 20 generations, were used. All mice were housed, fed and handled under standard conditions according to current institutional guidelines. Three groups of six mice each were s.c. immunized with CPhV (5×10^{10} phage in 100 µl of TBS), M13 phage (5×10^{10} phage particles in TBS) or with TBS alone, respectively, on days 0, 12, 23 and 34.

2.3. Experimental challenge of mice with *T. crassiceps cysticerci*

The ORF strain of *T. crassiceps* (Manoutcharian et al., 1999) has been maintained by serial passage in BALB/cAnN female mice for over 15 years in our animal facilities. Metacystodes used in challenge infections were harvested from the peritoneal cavity of BALB/cAnN female mice. Ten small (diameter of approximately 2 mm), non-budding larvae were suspended in PBS and injected i.p. into each of the mice using a 27-gauge needle. Mice were challenged 15 days after the booster injection and 7 weeks after infection the parasite load in each mouse was counted as described previously (Manoutcharian et al., 1999).

2.4. Immunization of pigs

Twelve piglets of mixed genetic background were produced and kept free of cysticercosis in the Facultad de Veterinaria y Zootecnia, UNAM, under controlled conditions.

Four groups of three pigs each at 10 months of age (at the beginning of the experiments) were used in the immunization trial. Four recombinant phages were pooled to obtain CPhV and used to immunize pigs s.c., or orally two times at 15-day intervals. One group was immunized with CPhV at a low dose (4×10^{11} phage in 1.5 ml of TBS) s.c., and the other two groups with CPhV, at a high dose (4×10^{12} phage)

administered s.c. or orally by pipette-feeding with phage in 1 ml of TBS. As controls, three pigs were each immunized s.c. with M13 phage at a high dose (4×10^{12} phage). Additional five 2-month-old piglets (kept separately from the 12 pigs) were each immunized with M13 phage at a high dose (4×10^{12} phage) s.c. and used as control to assess challenge assay.

Blood samples from all pigs were obtained from the jugular vein of each immunized pig before and at different days after vaccination (days 0, 7, 15, 30 and 45) to study the course of the humoral and cellular immune responses induced by the vaccine. To assess the persistence of phage in the gastrointestinal tract of pigs, phages were isolated from pig feces (days 15 and 45) by infecting TG-1 cells with 10–50 μ l of TBS containing freshly isolated fecal material after vortexing and microcentrifugation (total volume 0.5 ml). The phage titers, as colony-forming units (cfu), were determined by plating infected TG-1 cells on LB plates containing ampicillin and the phage identity was established by DNA sequencing.

The experiments reported herein were conducted according to the principles set forth in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, Institute of Laboratory Animal Resources, National Research Council, Washington, DC, 1996.

2.5. Antibody detection by ELISA

The levels of antigen-specific antibodies (Abs) in immune sera from three individual pigs within each group were measured. To reduce non-specific binding of sera pig components, an enriched immunoglobulin fraction of the sera was precipitated by ammonium sulfate, chromatographed and diluted in 1 ml of 0.15 M phosphate buffered saline (PBS), pH 7.2, before assessment of serum antibody levels by ELISA (García et al., 2001). *T. solium* cyst fluid (TsAg) or the respective peptides (1 μ g per well) were used as an antigen. For TsAg collection, the cysticerci were dissected from skeletal muscle of pigs and collected in ice-chilled phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4). Immediately afterwards, the cysts were ruptured with scissor and vesicular fluid was collected. Calcium was removed by adding 50 μ l of ammonium oxalate (0.3 M) and 25 μ l of ammonia (1:3 v/v, in water) to each milli liter of vesicular fluid, centrifuging (2000 \times g, 4 min, at 20 °C), and discarding all precipitated

material. The supernatant was then collected and aliquoted and stored in liquid nitrogen. Final protein concentrations in the processed fluid were measured by the method of Lowry.

Flat-bottomed microtitration plates (96 well; Nunc, Roskilde, Denmark) were coated with antigens diluted in 0.2 M carbonate–bicarbonate buffer, pH = 9.6, for 60 min at 37 °C (each serum was tested in duplicate). The wells were washed and incubated with 100 μ l of porcine purified immunoglobulins diluted in 0.03% PBS–Tween (1:200), for 60 min at 37 °C. Abs were detected with 100 μ l of rabbit anti-pig IgG (whole molecule) peroxidase conjugate (Sigma, St. Louis, MI, USA) diluted to optimum concentration (1:1000). As a substrate 3,3',5,5'-tetrametilbenzidine (TMB, from Sigma) was used at 5 mg/ml. The color reaction was stopped using 1N H₂SO₄, 50 μ l per well, and absorbance values were measured at 450 nm in an ELISA reader (LP400, Pasteur Diagnostics, Paris, France).

To test whether pigs had anti-M13 Abs, ELISA was also performed. Plates were coated overnight with M13 phage solution in PBS (10^{10} pfu/ml). After blocking with PBS/3% BSA, pig sera were added (1:100) in duplicate and incubated 1 h at 37 °C. Alkaline phosphatase-conjugated rabbit anti-porcine IgG (Zymed, San Francisco, CA, USA) was added to the wells at 1:1000 and incubated for 1 h at 37 °C. The reaction was developed with *para*-nitrophenylphosphate and absorbance was determined at 405 nm.

2.6. Cell proliferation assay and cytokine quantitation

PBMC were harvested from vaccinated and control pigs before (time 0) and 30 days after the second immunization using Ficoll-Hypaque gradient 1.077 (Sigma). Cells were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with L-glutamine (0.2 mM), non-essential amino acids (0.01 mM), penicillin (100 U/ml), streptomycin (100 mg/ml) and FBS (10%). Cells were cultured with ConA (5 μ g/ml), with each of the three peptides (10 μ g/ml) or with TsAg at 10 μ g/ml and incubated at 37 °C in a 5% CO₂ humidified atmosphere in flat-bottomed microtiter plates, using 2×10^5 cells per 200 μ l of final volume. After 5 days, the cultured cells were pulsed for a further 20 h with 1 μ Ci per well of methyl [³H] thymidine (Amersham

Pharmacia Biothec, UK). Then the cells were harvested and the amount of incorporated label was measured in a 1205- β spectrometer (Wallac Oy, 20101 Turku 10, Finland). Assays were performed in triplicate and data are presented as stimulation indices (SI: the ratios of cpm from antigen-stimulated to matched, unstimulated cells). Supernatants from replicate cultures corresponding to samples from days 0 and 30 were collected after 72 h for cytokine determination. IFN- γ and IL-4 were measured by sandwich ELISA according to the manufacturer of the kit (Biosource International, CA). Absorbance values are reported in pg/ml.

The synthetic peptides prepared by stepwise solid-phase synthesis were purified as described previously (Manoutcharian et al., 1999; Huerta et al., 2001).

2.7. Experimental challenge of pigs with *T. solium* eggs

A specimen of *T. solium* was obtained from a fully informed and consenting human carrier in a village of Yucatán, Mexico, immediately after treatment with niclosamide (Yomesan, Bayer). Eggs for challenge were collected as previously reported (Huerta et al., 2001). Those pigs which received low doses of s.c. or oral vaccine (at 12 months of age), and the additional M13 phage immunized piglets (at 3.5 months of age) maintained separately and used as controls, were infected orally with 17,000 eggs per pig 45 days after the second dose of the vaccine. Two months later, number of cysticerci per pig was determined at necropsy as described previously (Huerta et al., 2001).

2.8. Histological examinations

Tissues containing cysticerci were sectioned (5 μ m) and stained with hematoxylin-eosin and the cysticerci were classified according to the inflammatory reaction and the magnitude of destruction as previously described (Aluja and de Vargas, 1988).

2.9. Statistical analysis

All statistical analysis were performed using GraphPad, Version 2.05 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA). Differences between groups were analyzed by *t*-test or chi-square test when appropriate.

3. Results

3.1. Construction of recombinant phage and evaluation of its protective capacity against murine cysticercosis

To generate recombinant M13 phage expressing KETc1, KETc12, GK1 (Huerta et al., 2001) and KETc7 peptides (Manoutcharian et al., 1996), the DNA fragments coding for the corresponding sequences were cloned in phage/phagemid expression vectors. The KETc1 was displayed on M13 phage as a cpIII fusion at three to five copies per virus particle, while the three other antigens were expressed on the hybrid phage as M13 cpVIII fusions at 300–900 copies per phage (Willis et al., 1993). These phage clones designated as FKETc1, FKETc12, FGK1 and FKETc7 were purified separately, pooled and then used as an anti-cysticerci phage vaccine (CPhV) in immunization trials. To increase the representation of KETc1 peptide, FKETc1 was included in the mixture 30 times more than other constructs.

First, the protective capacity of CPhV vaccine was tested against experimental murine cysticercosis. There were significant differences in the total number of cysticerci recovered between control mice which received M13 only (990 cysts) and CPhV-immunized mice (338 cysts). Interestingly, no cysticerci were found in four of the six vaccinated mice.

3.2. Immune response to phage vaccination in pigs

Two groups of pigs were immunized with CPhV containing 4×10^{12} phage (high dose) in TBS by s.c. injection or were orally pipette-fed, two times at 15-day intervals. Another group was immunized s.c. with a low dose of CPhV (4×10^{11} phage) and the control group received 4×10^{12} M13 phages s.c.

To test whether phage displayed antigens induced the production of specific Abs against peptides as well as against *T. solium* total antigens (*TsAg*), the porcine sera were tested for IgG by ELISA. No specific antibodies were detected against *TsAg*, KETc1, GK1 or KETc12 (data not shown). Phage-specific Abs in the sera of all pigs were also measured to determine the immunogenicity of M13 phage itself and high level of anti-M13 antibodies were detected

Table 1
Antibody levels against M13 phage detected by ELISA^a

Days after immunization	Pigs immunized with			
	M13 phage	CPhV		Oral
		Subcutaneous		
		Low dose	High dose	
0	0.25 ± 0.007	0.29 ± 0.006 ^b	0.37 ± 0.005	0.34 ± 0.029
7	0.56 ± 0.016*	0.58 ± 0.005*	1.17 ± 0.006*	0.49 ± 0.019
15	1.17 ± 0.001*	0.47 ± 0.006*	1.25 ± 0.009*	0.51 ± 0.002*
30	1.19 ± 0.004*	1.12 ± 0.014*	1.17 ± 0.004*	1.09 ± 0.079*
48	0.89 ± 0.062*	1.20 ± 0.072*	1.25 ± 0.077*	0.65 ± 0.082*

^a Four groups of pigs were immunized s.c. or orally with 4×10^{12} of CPhV two times at 15-day intervals or with M13, s.c. Anti-M13 phage Abs were measured in pooled sera of each group of the immunized pigs. Data are the mean ± S.D. of two determinations, each one tested in duplicate.

^b Pigs from this group received low dose (4×10^{11} phage) of CPhV.

* Significantly increased responses ($P < 0.05$) compared with the values before the immunization (Student's *t*-test).

in all pigs albeit with some differences (Table 1). The s.c. immunization at a high dose (4×10^{12}) induced high levels of Abs as soon as 7 days after immunization. To assess the persistence of phages in gastrointestinal tract of the pigs, cell-free phage particles from the feces of immunized animals were isolated on days 15 and 45. Surprisingly, recombinant phages were found not only in the samples of orally immunized pigs, but also in samples from animals of other groups. The phage titers tended to decline from 10^4 cfu/ml to 50–100 cfu/ml and at day 45 the titers of phage from CPhV-immunized pigs were 10–100 times higher compared to those from M13-immunized control group. Phage clones from individual pigs (five pigs in total) were sequenced: all eight clones were FGK1 obtained from two s.c. low dose CPhV-immunized animals, the same eight clones were found in two pigs from the control group and 4 FKETc12 clones were detected in one orally immunized pig (data not shown). This evidence suggests that the close contact of orally immunized pigs with control pigs relates to the finding of recombinant phages in the gastrointestinal tracts of control pigs.

To study the cellular immune responses, PBMCs were collected from vaccinated pigs before and at different times after immunization and tested in a lymphoproliferation assay. The stimulation index was calculated as the mean cpm of stimulated cells per mean of non-stimulated control cells. Peptide and TsAg-specific lymphocyte proliferation was detected

when PBMCs from CPhV-immunized pigs were stimulated by the different antigens tested. No specific proliferative response was observed in pigs immunized with only M13 phage. The highest stimulation index induced by TsAg or synthetic peptides was observed 15 days after the boost with CPhV (Fig. 1). To further analyze the elicited immune response, the levels of IL-4 and IFN- γ cytokines were measured in supernatants 3 days after in vitro stimulation of cultured PBMCs. A clear increase in IFN- γ was detected in the supernatants after specific stimulation. IFN- γ was not detected in supernatants from cells obtained before immunization or cells from control pigs (Fig. 2). In the same supernatants, increased levels of IL-4 were detected in most of the pigs immunized both with M13 and with the recombinant phages (Fig. 3). Thus, these data suggest that immunization with CPhV induced a mixed Th1/Th2-type response.

3.3. Effect of phage immunization on *T. solium* challenge

To test the protective capacity of phage vaccine against pig cysticercosis, pigs immunized either with oral or low dose s.c. CPhV vaccine, were experimentally challenged with *T. solium* eggs. Only these two groups were infected because of the limited number of *T. solium* eggs available and because of our intent to determine whether low dose s.c. immunization could

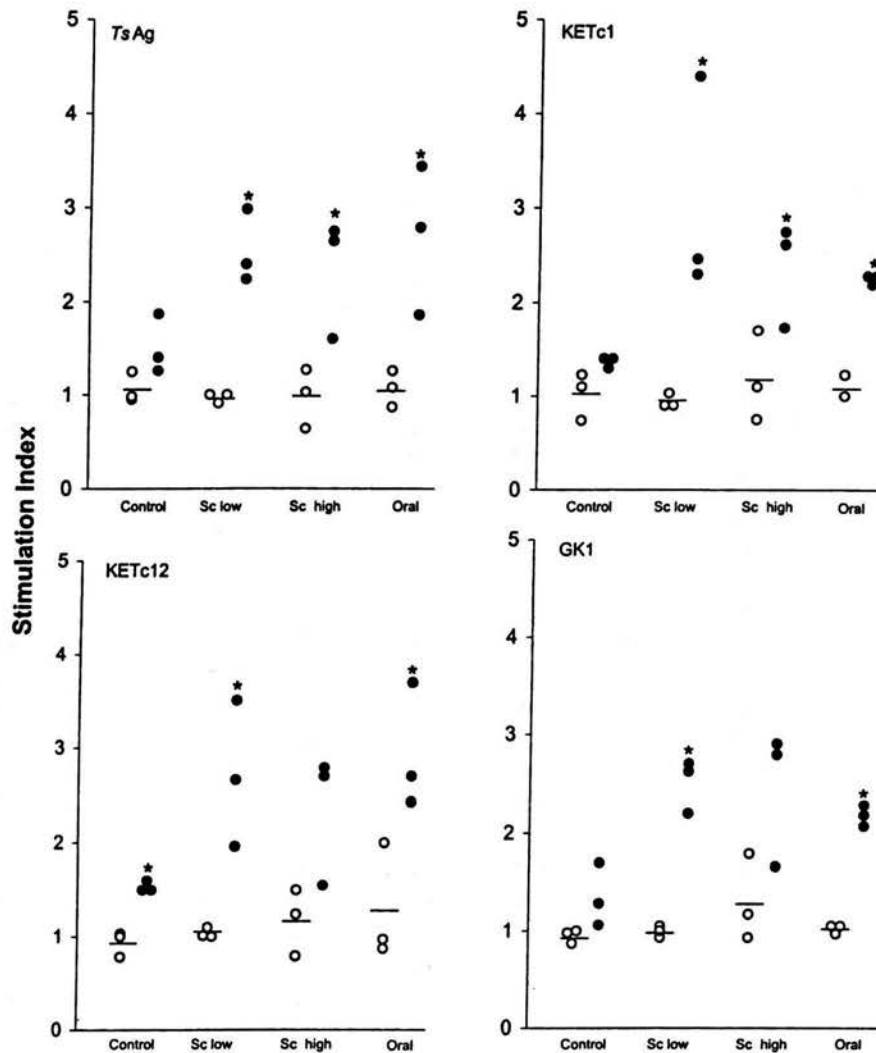


Fig. 1. PBMC proliferative responses in control and vaccinated pigs. Two groups of pigs (three animals in each) were immunized with 4×10^{12} of CPhV phage s.c. (Sc high) or orally, one group received low dose (4×10^{11}) of CPhV (Sc low) and the control group received high dose (4×10^{12}) of M13 phage. PBMCs were collected from each pig before priming (day 0, blank circles) and 15 days after boosting (day 30, filled circles) and cultured 5 days in the presence of TsAg and three peptides (10 μ g/ml). Labeled thymidine incorporation was measured and stimulation indexes were calculated as the ratios of the mean cpm from antigen-stimulated to matched non-stimulated cells. Assays were performed in triplicate. The bars indicate median cell values of cpm from pigs before vaccination (day 0). * $P \leq 0.05$ in relation to the index before immunization.

be sufficient to induce protection and whether oral immunization could be equally effective. An additional group of five pigs maintained separately from phage immunized animals was used as a control. As shown in Table 2, s.c. immunized pigs showed reduced number of cysticerci compared with control animals, and one of them was completely protected. Two out

of three orally immunized pigs exhibited reduced number of cysticerci and 474 cysticerci were recovered from the third pig. However, 86% of them were macroscopically damaged. Despite the small number of pigs tested, these results point to a protective immunity induced in pigs against cysticercosis by the CPhV vaccine.

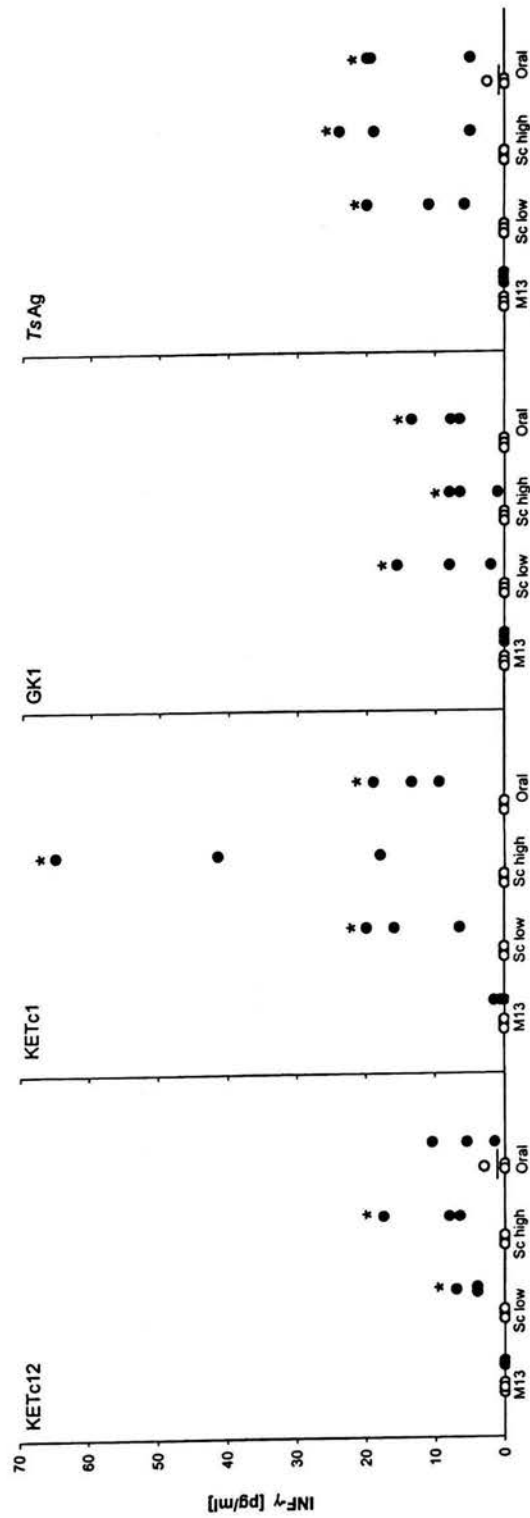


Fig. 2. Detection of IFN- γ in cultured PBMCs. The levels of IFN- γ were measured in supernatants from cultured PBMCs collected from each pig before priming (day 0, blank circles) and 15 days after boosting (day 30, filled circles). Cells were cultured 5 days in the presence of TsAg and three peptides (10 μ g/ml). Groups and symbols correspond to those described in the Fig. 1. The bars indicate median values of IFN- γ from pigs before vaccination (day 0). * $P \leq 0.05$ in relation to the IFN- γ levels before immunization.

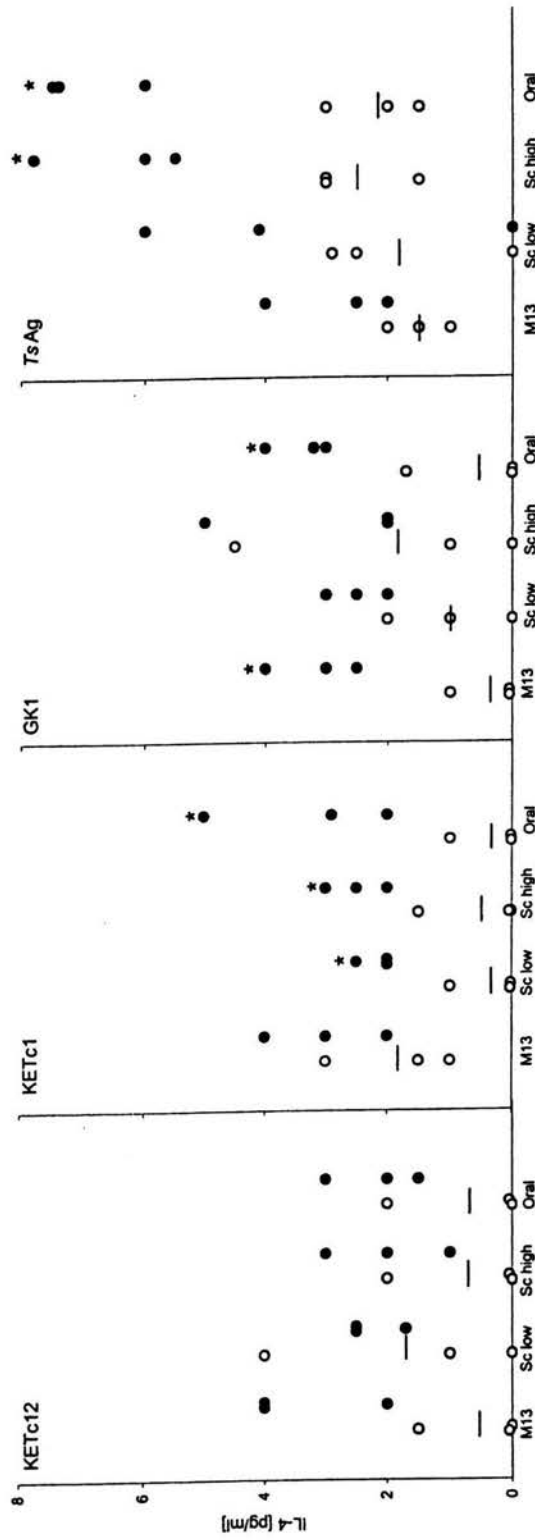


Fig. 3. Detection of IL-4 in cultured PBMCs. The levels of IL-4 were measured in supernatants from cultured PBMCs collected from each pig before priming (day 0, blank circles) and 15 days after boosting (day 30, filled circles). Cells were cultured 5 days in the presence of TsAg and three peptides (10 µg/ml). Groups and symbols correspond to those described in the Fig. 1. The bars indicate median values of IL-4 from pigs before vaccination (day 0). * $P \leq 0.05$ in relation to the IL-4 levels before immunization.

Table 2
Effect of phage immunization upon the parasite load^a

Pigs immunized with		
M13	CPhV	
	Oral	Subcutaneous (low dose)
Subcutaneous		
91 ^b (73/18) ^c	31 (3/28)	11 (1/10)
164 (154/10)	474 (65/409)	0
246 (57/189)	53 (24/29)	36 (23/13)
514 (512/2)		
580 (580/0)		

^a Three pigs from each group were s.c. or orally immunized twice at 15-day intervals with CPhV. Control group received only the M13 phage. Forty five days after the second application of phage, pigs were orally challenged with 17,000 *T. solium* eggs. Two months later, pigs were sacrificed and the parasite load was counted.

^b Individual number of cysticerci recovered from each pig.

^c Number of vesicular/necrotic cysticerci.

3.4. Histological examination

Cysticerci in different stages of viability were recovered from skeletal muscle and liver including adjacent tissues of control and immunized infected pigs. Cysticerci recovered from CPhV-immunized pigs were histologically examined and were found to be at different degrees of degeneration (Fig. 4). Considering the severity of the tissue inflammatory response and the state of the larval degeneration, most inspected lesions were scored as grades 4 or 5 according to the previously published classification (Aluja and de Vargas, 1988). Cysticerci found in the liver of vaccinated pigs were shown to be completely destroyed within a granulomatous zone (grade 6). Cysticerci from control pigs were surrounded by a discrete to moderate inflammatory response mainly based on lymphocytes, plasma cells and eosinophils and were scored as grades 1–3 according to the previous classification reports (Aluja and de Vargas, 1988).

4. Discussion

Herein, we showed the protective capacity of a vaccine based on recombinant M13 phage expressing KETc1, KETc12, KETc7 and GK1 sequences (CPhV)

against experimental murine cysticercosis. It was also demonstrated that CPhV could effectively elicited specific cellular but not humoral immune response, the former seems to be protective in pigs against *T. solium* cysticercosis.

The antigen delivery on M13 phages has important advantages compared with synthetic peptide vaccine reported by our group previously (Huerta et al., 2001; Sciutto et al., 2000): they can be easily and cost-effectively produced in large-scale since they are secreted from the infected bacterial cells nearly free of intracellular components; the phage surface density is 200–400 m²/g and the fusion peptides comprise up to 25% by weight of the phage and subtend up to 50% of its surface area (Petrenko and Smith, 2000). Furthermore, phages are resistant to heat and to many organic solvents and chemicals as well as other stresses (Petrenko and Smith, 2000) and, most importantly, phage particles are highly immunogenic not requiring of adjuvant for their application as immunogens. All these properties are important for the development of vaccines for large-scale application. Considering these properties, phage display has recently called attention of research groups working in the field of vaccine development against many diseases, such as infections with HIV-1 (Scala et al., 1999; De Berardinis et al., 2000), hepatitis C virus (HCV) (Puntoriero et al., 1998) or Alzheimer's disease (Frenkel and Solomon, 2002). In addition, it is possible to improve phages as antigen delivery systems given that significant progress has been made in the engineering of M13 phage mutant coat proteins, including completely artificial ones, thus expanding the utility of phage display technology in general and the phage vaccine concept, in particular (Roth et al., 2002; Sidhu, 2000).

Cysticercosis is a highly prevalent disease that causes a severe neurological illness in humans in the developing world (White, 1997; Sciutto et al., 2000). In order to prevent this disease different strategies have been considered based on social development (Joshi et al., 2001; Vazquez-Flores et al., 2001) and/or biological interventions (Pawlowski, 1990; Nascimento et al., 1995; Molinari et al., 1997; Lightowlers et al., 2000). During the last two decades, our research group has focused on the development of an effective, stable and low-cost vaccine against porcine cysticercosis. Clearly, vaccination of the pigs (the intermediate hosts of *T. solium*) could hinder the

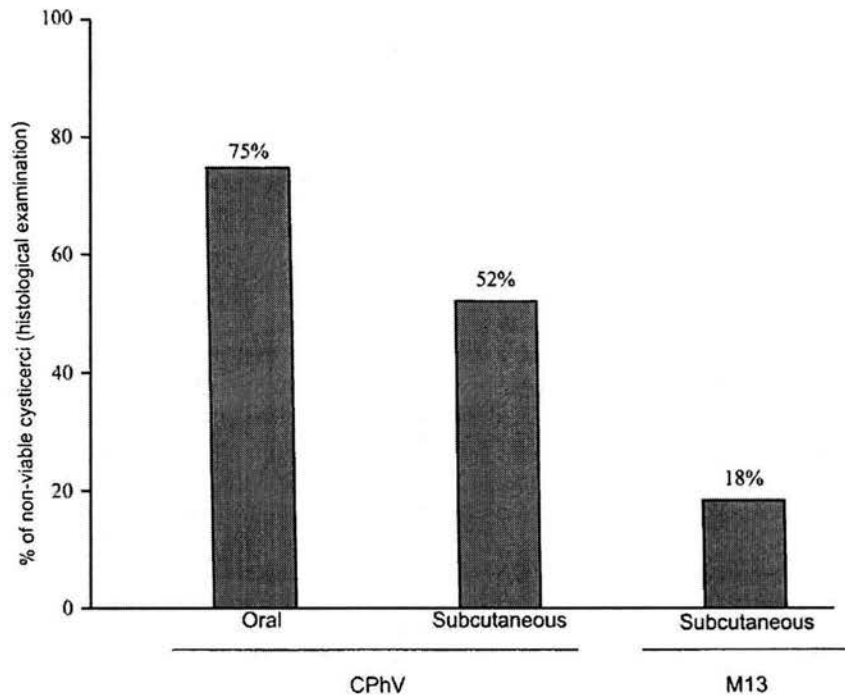


Fig. 4. Percentage of non-viable cysticerci detected by histological examinations. Cysticerci were classified according to the inflammatory response surrounding them and the different degrees of degeneration. Non-viable cysticerci were surrounded by a severe inflammatory response. Pigs were immunized with 4×10^{12} of CPhV phage orally, 4×10^{11} of CPhV s.c. and 4×10^{12} of M13 phage s.c. (control group). Percentage of damaged cysticerci were significantly lower in those subcutaneously or orally immunized ($P < 0.0001$, chi-square test).

transmission cycle of the parasite and thus reduce the infection pressure upon humans and improve the economy of rural pig rearing. Different complex antigen mixtures from cysticerci and oncosphere have been proposed as a source of vaccine (Lightowlers et al., 2000). However, limitations on the supply and quality control of these antigens prevent the broad application of such vaccines. On the other hand, the use of defined recombinant antigens offers the greatest potential for overcoming these limitations. We report in this article the immunogenic and protective properties of the CPhV vaccine with the perspective of application of phage particles as vaccines against porcine cysticercosis. Importantly, CPhV vaccine induced strong protection against *T. crassiceps* cysticercosis and showed promising results against porcine cysticercosis. However, this experimental trial with very few pigs can hardly claim to represent realistic transmission conditions (i.e. in dose and frequency of challenge, heterogeneous genetic background, nutritional status of pigs, heterogeneous

stress). After these experimental measurements of the effects of vaccination, a controlled field trial followed by a thorough post-mortem study of viable and damaged cysticerci was considered mandatory to evaluate the effect of the vaccine on the prevalence and intensity of pig cysticercosis in highly endemic rural areas.

Regarding the immunogenic capacity of the CPhV vaccine, we showed that it elicited a mixed Th1/Th2 immune response with a peptide/antigen-specific proliferative responses and the production of IFN- γ and IL-4 in supernatants from cultured PBMCs from immunized pigs (Figs. 1–3). This mixed Th1/Th2 response elicited by phage immunization has been further confirmed by detailed analysis of Ig subtypes in mice immunized with wild type M13 as well as recombinant M13 bearing different peptides (our unpublished data). However, in our recent study of the immune response in pigs immunized with tripeptide synthetic vaccine using saponin as adjuvant we demonstrated a strong Th1 response but not Th2

response (Diaz et al., 2003), and these results point to the role of the phage in inducing a mixed Th1/Th2 response in pigs immunized with phage.

The immunogenicity of the phage could be the result of the display of peptides/proteins in the context of the highly ordered array of repetitive elements on the phage surface similar to human papillomavirus-like particles, which are currently under development as vaccine vehicles (Schiller and Lowy, 2001). It should be possible to improve vaccine potency considering recently published results in which much higher doses of phages were used (2×10^{14} particles) in five applications with QS21 adjuvant to protect the animals against AIDS-like disease progression (Chen et al., 2001).

An interesting finding was the persistence of the recombinant phage in the gastrointestinal tract of pigs 45 days after the immunization. These phages were found not only in orally vaccinated pigs, but also in some pigs in other groups, indicating an active dissemination of phage through those orally infected, since all pigs were in close contact during the experiment. Although further research is needed to propose the use of the infective recombinant phages in field trials, this result points to the possibility of an easy alternative to effectively disseminate the vaccine in the exposed population of pigs, thus increasing the possibility of the success of control programs. However, one should also consider the possible negative effects of dissemination of phage between animals in uncontrolled ways. The possibility of application of recombinant phages without undesirable effects seems feasible considering the extensive experience of the application of human phage therapy in several European countries for many decades (Sulakvelidze et al., 2001; Summers, 2001). For instance, lytic phages, capable of completely lysing the bacteria being treated, such as *Staphylococcus*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Shigella* and *Salmonella* species, have been used as antibacterial agents in humans in the past and there is an interest and clear need for the development of antibacterial phages (Biswas et al., 2002). Moreover, bacteriophage phiX174 was recently used to immunize HIV-infected patients for the evaluation of CD4+ T-cell function in vivo (Fogelman et al., 2000). Nevertheless, we are currently using in all trials UV-treated non-infective phage according to our institutional guide.

In summary, the present work points toward the use of modified phage particles as powerful recombinant vaccine components, although their application deserves further studies. Currently, a large-scale vaccination field trial using ultraviolet-inactivated recombinant phages is under way to determine whether CPhV can be used as an accessible vaccine to be included in a control program against pig cysticercosis in endemic rural areas of Mexico.

Acknowledgements

This study was supported by CONACyT, Mexico, 3581-M and G25955, DGAPA, Mexico, 212401, Coordinación de Investigación Biomédica del Instituto Mexicano del Seguro Social, The International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology (ICGEB), Trieste, Italy, CRP/MEX02-01 and The Howard Hughes Medical Institute. The authors thank the support received from Dr. Pablo Hernández Jauregui and the technical assistance of Natalia Copitin, Marisela Hernández and Marco Ambriz.

References

- Aluja, A.S., de Vargas, G., 1988. The histopathology of porcine cysticercosis. *Vet. Parasitol.* 28, 65–77.
- Bastien, N., Trudel, M., Simard, C., 1997. Protective immune responses induced by the immunization of mice with a recombinant bacteriophage displaying an epitope of the human respiratory syncytial virus. *Virology* 234, 118–122.
- Biswas, B., Adhya, S., Washart, P., Paul, B., Trostel, A.N., Powell, B., Carlton, R., Merrill, C.R., 2002. Bacteriophage therapy rescues mice bacteremic from a clinical isolate of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Infect. Immun.* 70, 204–210.
- Chen, X., Scala, G., Quinto, I., Liu, W., Chun, T.W., Justement, J.S., Cohen, O.J., vanCott, T.C., Iwanicki, M., Lewis, M.G., Greenhouse, J., Tarry, T., Venzon, D.A., Fauci, A.S., 2001. Protection of rhesus macaques against disease progression from pathogenic SHIV-89.6PD by vaccination with phage displayed epitopes. *Nat. Med.* 7, 1225–1231.
- De Berardinis, P.D., Sartorius, R., Fanutti, C., Perham, R.N., Pozzo, G.D., Guardiola, J., 2000. Phage display of peptide epitopes from HIV-1 elicits strong cytolytic responses. *Nat. Biotech.* 18, 873–876.
- De la Cruz, V.F., Lal, A.A., McCutchan, T.F., 1988. Immunogenicity and epitope mapping of foreign sequences via genetically engineered filamentous phage. *J. Biol. Chem.* 263, 4318–4322.

- Diaz, M.A., Villalobos, N., de Aluja, A., Rosas, G., Gomez-Conde, E., Hernández, P., Larralde, C., Scitutto, E., Fragoso, G., 2003. Th1 and Th2 indices of the immune response in pigs vaccinated against *Taenia solium* cysticercosis suggest various host immune strategies against the parasite. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 93, 81–90.
- Fogelman, I., Davey, V., Ochs, H.D., Elashoff, M., Feinberg, M.B., Mican, J.A., Siegel, J.P., Sneller, M., Lane, H.C., 2000. Evaluation of CD4+ T-cell function in vivo in HIV-infected patients as measured by bacteriophage phiX174 immunization. *J. Infect. Dis.* 182, 435–441.
- Frenkel, D., Solomon, B., 2002. Filamentous phage as vector-mediated antibody delivery to the brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 16, 5675–5679.
- García, G., Scitutto, E., Fragoso, G., Cruz, C., Toledo, A., Villalobos, N., Flores, I., Aluja, A., José, M.V., Larralde, C., 2001. Inhibitory role of Abs in the development of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* towards reproductive and pathogenic stages. *J. Parasitol.* 87, 582–586.
- Grabowska, A.M., Jennings, R., Laing, P., Darsley, M., Jameson, C.L., Swift, L., Irving, W.L., 2000. Immunisation with phage displaying peptides representing single epitopes of the glycoprotein G can give rise to partial protective immunity to HSV-2. *Virology* 269, 47–53.
- Huerta, M., de Aluja, A.S., Fragoso, G., Toledo, A., Villalobos, N., Hernández, M., Gevorkian, G., Acero, G., Díaz, A., Alvarez, I., Avila, R., Beltrán, C., García, G., Martínez, J.J., Larralde, C., Scitutto, E., 2001. Synthetic peptide vaccine against *Taenia solium* pig cysticercosis: successful vaccination in a controlled field trial in rural Mexico. *Vaccine* 20, 262–266.
- Joshi, D.D., Poudyal, P.M., Jimba, M., Mishra, P.N., Neave, L.A., Maharjan, M., 2001. Controlling *Taenia solium* in Nepal using the PRECEDE–PROCEED model. *Southeast Asian J. Trop. Med. Publ. Health* 32 (Suppl. 2), 94–97.
- Lightowers, M.W., Flisser, A., Gauci, C.G., Heath, D.D., Jensen, O., Rolfe, R., 2000. Vaccination against cysticercosis and Hydatid disease. *Parasitol. Today* 16, 191–196.
- Lightowers, M.W., 2003. Vaccines for prevention of cysticercosis. *Acta Trop.* 87, 129–135.
- Magliani, W., Polonelli, L., Conti, S., Salati, A., Rocca, P.F., Cusumano, V., Mancuso, G., Teti, G., 1998. Neonatal mouse immunity against group B streptococcal infection by maternal vaccination with recombinant anti-idiotypes. *Nat. Med.* 4, 705–709.
- Manoutcharian, K., Gevorkian, G., Cano, A., Almagro, J.C., 2001. Phage displayed biomolecules as preventive and therapeutic agents. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 2, 217–223.
- Manoutcharian, K., Rosas, G., Hernandez, M., Fragoso, G., Aluja, A., Villalobos, N., Rodarte, L.F., Scitutto, E., 1996. Cysticercosis: identification and cloning of protective recombinant antigens. *J. Parasitol.* 82, 250–254.
- Manoutcharian, K., Terrazas, L.I., Gevorkian, G., Acero, G., Petrossian, P., Rodríguez, M., Govezensky, T., 1999. Phage displayed T-cell epitope grafted into immunoglobulin heavy-chain complementarity-determining regions: as effective vaccine design tested in murine cysticercosis. *Infect. Immun.* 67, 4764–4770.
- Meola, A., Delmastro, P., Monaci, P., Luzzago, A., Nicosia, A., Felici, F., Cortese, R., Galfrè, G., 1995. Derivation of vaccines from mimotopes. *J. Immunol.* 154, 3162–3172.
- Molinari, J.L., Rodriguez, D., Tato, P., Soto, R., Arechavaleta, F., Solano, S., 1997. Field trial for reducing porcine *Taenia solium* cysticercosis in Mexico by systematic vaccination of pigs. *Vet. Parasitol.* 69, 55–63.
- Nascimento, E., Costa, J.O., Guimaraes, M.P., Tavares, C.A., 1995. Effective immune protection of pigs against cysticercosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 45, 127–137.
- Pawlowski, Z.S., 1990. Efficacy of low doses of praziquantel in taeniasis. *Acta Trop.* 48, 83–88.
- Petrenko, V.A., Smith, G.P., 2000. Phage from landscape libraries as substitute antibodies. *Protein Eng.* 13, 589–592.
- Puntoriero, G., Meola, A., Lahm, A., Zucchelli, S., Ercole, B.B., Tafi, R., Pezzanera, M., Mondelli, M.U., Cortese, R., Tramontano, A., Galfrè, G., Nicosia, A., 1998. Towards a solution for hepatitis C virus hypervariability: mimotopes of the hypervariable region 1 can induce antibodies cross-reacting with a large number of viral variants. *EMBO J.* 17, 3521–3533.
- Rodi, D.J., Makowski, L., 1999. Phage display technology-finding a needle in a vast molecular haystack. *Curr. Opin. Biotechnol.* 10, 87–93.
- Rosas, G., Cruz-Revilla, C., Fragoso, G., Lopez-Casillas, F., Perez, A., Bonilla, M.A., Rosales, R., Scitutto, E., 1998. *Taenia crassiceps* cysticercosis: humoral immune response and protection elicited by DNA immunization. *J. Parasitol.* 84, 516–523.
- Roth, T., Weiss, G., Eigenbrot, C., Sidhu, S., 2002. A minimized M13 coat protein defines the requirements for assembly into the bacteriophage particles. *J. Mol. Biol.* 13, 357–367.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Scala, G., Chen, X., Liu, W., Telles, J.N., O’Cohen, J., Vaccarezza, M., Igarashi, T., Fauci, A.S., 1999. Selection of HIV-specific immunogenic epitopes by screening random peptide libraries with HIV-1 positive sera. *J. Immunol.* 162, 6155–6161.
- Schiller, J.T., Lowy, D.R., 2001. Papillomavirus-like particle based vaccines: cervical cancer and beyond. *Expert. Opin. Biol. Ther.* 1, 571–581.
- Scitutto, E., Fragoso, G., Fleury, A., Lacleste, J.P., Sotelo, J., Aluja, A., Vargas, L., Larralde, C., 2000. *Taenia solium* disease in humans and pigs: an ancient parasitosis disease rooted in developing countries and emerging as a major health problem of global dimensions. *Microbes Infect.* 2, 1875–1890.
- Sidhu, S.S., 2000. Phage display in pharmaceutical biotechnology. *Curr. Opin. Biotechnol.* 11, 610–616.
- Sulakvelidze, A., Alavidze, Z., Morris, J.G., 2001. Bacteriophage therapy. *Antimicrob. Agents Chem.* 45, 649–659.
- Summers, W.C., 2001. Bacteriophage therapy. *Annu. Rev. Microbiol.* 55, 437–451.
- Toledo, A., Larralde, C., Fragoso, G., Gevorkian, G., Manoutcharian, K., Hernández, M., Acero, G., Rosas, G., Lopez-Casillas, F., Garfias, C.K., Vazquez, R., Terrazas, I., Scitutto, E., 1999. Towards a *Taenia solium* cysticercosis vaccine: an epitope shared by *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* protect mice

- against experimental cysticercosis. *Infect. Immun.* 67, 2522–2530.
- Vazquez-Flores, S., Ballesteros-Rodea, G., Flisser, A., Schantz, P.M., 2001. Hygiene and restraint of pigs is associated with absence of *Taenia solium* cysticercosis in a rural community of Mexico. *Salud Publica Mex.* 43, 574–576.
- White Jr., A., 1997. Neurocysticercosis: a major cause of neurological disease worldwide. *Clin. Infect. Dis.* 24, 101–113.
- Willis, A.E., Perham, R.N., Wraith, D., 1993. Immunological properties of foreign peptides in multiple display on a filamentous bacteriophage. *Gene* 128, 79–83.

IX. Discusión

En este trabajo se analizó la respuesta inmune celular y humoral inducida por la inmunización con tres péptidos protectores en contra de la cisticercosis porcina. Estos péptidos fueron identificados en una librería de cDNA de *Taenia crassiceps* y se han encontrado compartidos por *Taenia solium*. En efecto, a través de inmuno fluorescencia se identificaron los tres péptidos expresados en diferentes estructuras y en todas las fases del parásito (huevo, cisticerco, tenia) (Toledo *et al.*, 1999, 2001).

En el ratón ya ha sido descrita la respuesta inmune inducida por los péptidos. Se ha reportado que los tres péptidos inducen una respuesta de muy bajos niveles de anticuerpos y una exacerbada respuesta celular con altos niveles de IFN- γ e IL-2 (Toledo *et al.*, 1999; 2001). Esta respuesta se ha observado en cepas murinas de diferente haplotipo de histocompatibilidad (Toledo *et al.* en preparación). Esto nos hace suponer que estos péptidos son probablemente muy promiscuos o presentados en el contexto de otras moléculas presentadoras. La respuesta observada en el modelo murino, aunada a que los sueros de aproximadamente el 50% de los pacientes neurocisticercosos (Hernández *et al.*, 2000) son capaces de reconocer los tres péptidos mencionados y que su uso para la inmunización del cerdo reduce el número de cerdos infectados, la cantidad total de cisticercos

instalados y su viabilidad (Huerta *et al.*, 2002), nos señalan la importancia de conocer la respuesta inmune que son capaces de inducir en el cerdo.

Para este estudio se utilizaron cerdos rústicos provenientes de una granja de la Comunidad de Huatlatlauca y se trasladaron a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, con el propósito de realizar un estudio longitudinal de la respuesta inmune inducida por la vacunación (Díaz-Orea *et al.*, 2003). Los resultados indican que estos péptidos también en cerdos inducen una pobre respuesta de anticuerpos de clase IgG, a excepción de GK-1. Esta observación resulta de especial interés considerando que se ha reportado que los anticuerpos anti-GK-1 tienen capacidad de dañar al cisticerco de *Taenia solium*, inhibiendo su capacidad de transformarse en el estado adulto, después de ser administrados a hámsters en forma oral (García *et al.*, 2001). La ausencia de incrementos en IL-10 e IL-4 justifican los bajos niveles de anticuerpos encontrados.

Mientras tanto, al respecto de la respuesta celular, parecen ser KETc1 y 12 son los péptidos más efectivos. Basándose en el perfil de citocinas encontrado, también en el cerdo podemos sostener que inducen una respuesta especialmente inflamatoria con claros incrementos de IL-2 e IFN- γ (Díaz *et al.*, 2003).

Es factible que la exacerbada respuesta inflamatoria pueda dañar desde la oncosfera en su establecimiento hasta el cisticerco en especial en

formas tempranas cuando aún pueda ser más susceptible de la liberación de radicales libres superóxidos, óxido nitroso, componentes que se ha descrito tienen capacidad de dañar aún endotelios vasculares durante un proceso inflamatorio. Sería de interés considerar si estos mediadores de inflamación pudieran inducir a componentes celulares del parásito hacia apoptosis. En este sentido muy recientemente en una evaluación de un antígeno candidato a vacuna utilizando inmunización con DNA los autores describen que se encuentran signos claros de aumento de apoptosis en los cisticercos provenientes de animales vacunados (López-Briones *et al.*, 2003). Este fenómeno podría ser también inducido por la S3PV considerando que en la evaluación de SPVac en campo observamos que en los cerdos vacunados se recuperaba un porcentaje mayor de cisticercos no viables (4 vs 40% en vacunados, Huerta *et al.*, 2002). Este efecto fue aún más claro cuando se observaron histológicamente las muestras de cisticercos tomados de cerdos vacunados y controles. El efecto de daño mayor sobre parásitos instalados señala el interés de evaluar la capacidad terapéutica de esta vacuna.

Si bien los resultados indican que esta vacuna pudiera ser una herramienta útil para el control de la teniasis cisticercosis, queda aún un obstáculo por resolver, y es el alto costo de la vacuna para la población a la que está dirigida. Considerando esta limitante se están evaluando en nuestro laboratorio diferentes alternativas para su expresión. Una de ellas la

constituye el uso de fagos filamentosos como acarreadores de los antígenos vacunales. Los fagos poseen propiedades que los hacen muy atractivos para este fin como se describe extensamente en el Anexo II. El principal atractivo es que presentan en su superficie proteínas repetidas en múltiples copias a las que se pueden adicionar los péptidos por tecnología de DNA recombinante logrando entonces expresarlos en la superficie de los fagos. Adicionalmente estos vehículos crecen en *E. coli* lo que su costo de producción es reducido y poseen por si mismos capacidad adyuvante lo que permite suponer que no requieren adyuvantes adicionales. Además por tratarse de DNA son moléculas muy estables que no requieren de red fría para su distribución.

En este trabajo se incluye una primera evaluación de la capacidad inmunogénica de la vacuna expresada en fagos filamentosos (CPhV) y evaluado en forma experimental en ratones y en cerdos. Los resultados indican que la CPhV es capaz de inducir altos niveles de protección en contra de la cisticercosis murina e induce una respuesta similar a la inducida por la inmunización con la vacuna producida en forma sintética. La diferencia principal radica en que el fago por si mismo exagera una respuesta de tipo TH2 que aunada a la respuesta TH1 inducida por los antígenos específicos resulta en una respuesta mixta TH1/TH2. Aunque

preliminares, en este trabajo también se reportan resultados que indican la posible capacidad protectora de CPhV en contra de la cisticercosis porcina. En resumen, en este estudio se describe la respuesta inmune asociada a la vacunación con tres péptidos expresados en forma sintética y en fagos filamentosos y se discuten los posibles mecanismos inmunológicos que pudieran subyacer en el efecto protector de la vacuna. Esta información es importante, para designar un mejor protocolo de vacunación en contra de la cisticercosis porcina. Además cabe señalar que la evaluación de las diferentes estrategias propuestas permitirá enriquecer el área de la vacunología y considerar las observaciones obtenidas para el desarrollo de vacunas contra otros padecimientos.

X. Conclusiones

1. La inmunización de los cerdos con la vacuna S3Pvac estimula la respuesta inmune celular promoviendo una respuesta preferencialmente Th1 con incrementos en los niveles de IL-2 e IFN- γ , con respuestas proliferativas péptido-antígeno específicas con bajos y heterogéneos índices de estimulación.
2. Induce una respuesta inmune humoral con producción de bajos niveles de anticuerpos específicos contra cada uno de los péptidos.
3. Los anticuerpos anti-Gk-1 inducidos por vacunación son capaces de inducir algún grado de daño en los cisticercos, por la inhibición de su capacidad de transformación de cisticerco a taenia en hámsters dorados.
4. El futuro de esta vacuna es muy promisorio, porque no solo induce una respuesta inmune humoral y celular protectora comprobada por los resultados presentados a lo largo de esta tesis, sino que además se está buscando la mejor forma de presentación para que se pueda adquirir a un precio muy accesible y otros posibles usos de los péptidos integrantes de la vacuna S3Pvac relacionados con la prevención, detección y destrucción del parásito, y de esta forma, disminuir la cisticercosis porcina y por consiguiente la humana.

XI. BIBLIOGRAFÍA

Abbas A.K., Williams M.E., Burstein H.J. Chang T.L., Bossu P., Lichtman A.H. Activation and functions of CD4+ T cell subsets. *Immunol Rev.* 1991; 23: 4-22.

Abuladze K I.1964 . Taeniata of man animals and the diseases caused by them. In:Essentials of Cestodology (K I Skrjabin, ed), vol. 4.

Álvarez JI, Londoño DP, Alvarez AL, Trujillo J, Jaramillo MM, Restrepo BI. Granuloma Formation and Parasite Disintegration in Porcine Cysticercosis: Comparison with Human Neurocysticercosis. *J Comp Path.* 2002; 127: 186-193.

Aluja AS, Escobar A, Escobedo F, Flisser A, Laclette JP, Larralde C, Madrazo I, Velázquez V, Willms K. 1987 p. 20. Cisticercosis una recopilación actualizada de los conocimientos básicos para el manejo y control de la cisticercosis causada por *Taenia solium*. Fondo de la Cultura Económica, México, D. F.

Aluja, A. Frequency of porcine cysticercosis in Mexico. In: Flisser A, Willms K, Laclette J P, Larralde C, Ridaura C, Beltrán, F. (Ed.) Cysticercosis: present stage of knowledge and perspectives. New York, N. Y. *Academic Press*, 1982; 53-62.

Aluja AS, Villalobos AN, Plancarte A, Rodarte LF, Hernandez M, Sciutto E. Experimental *Taenia solium* cysticercosis in pigs: characteristics of the infection and antibody response. *Vet Parasitol.* 1996; 61(1-2): 49-59.

Aluja AS, Villalobos AN, Plancarte A, Rodarte LF, Hernandez M, Zamora C, Sciutto E. *Taenia solium* cysticercosis: immunity in pigs induced by primary infection. *Vet Parasitol.* 1999; 81(2): 129-35.

Ambrosio J, Landa A, Merchant MT and Laclette JP. Protein uptake by cysticerci *Taenia crassiceps*. *Arch Med Res.* 1994; 25: 325-330.

Arechaleta F, Molinari JL, Tato P. A *Taenia solium* metacestode factor nonspecifically inhibits cytokine production. *Parasitol Res.* 1998; 84: 117-122.

Barker E, Mackewicz CE, & Levy JA. Effects of Th1 and Th2 cytokines on CD8+ cell response against human immunodeficiency virus: implications for long-term survival. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1995; 92: 1135-9.

- Binns RM. The Null/gamma delta TCR+ T cell family in the pig. *Vet. Immunol Immunopathol.* 1994; 43(1-3): 69-77.
- Bogan A A, & Thorn K S. Anatomy of hot spots in protein interfaces. *J Mol Biol.* 1998; 280: 1-9.
- Bojalil R, Terrazas LI, Govezensky T, Sciutto E, Larralde C. Thymus-related cellular immune mechanisms in sex-associated resistance to experimental murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). *J Parasitol* 1993; 79(3): 384-9.
- Botero D, Castano S. Treatment of human cysticercosis with praziquantel in Colombia]. *Sal Pub Mex.* 1982 Nov-Dec; 4(6):91-9.
- Bradley LM., & Swain SL. T cell memory. *Annu Rev Immunol.* 1998; 16: 201-223.
- Bundy DA. Control of intestinal nematode infections by chemotherapy: mass treatment versus diagnostic screening. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1990; 84(5): 622-5.
- Burger C j, Rkihisa Y, Lin Y C. *Taenia taeniaeformis* inhibition of mitogen induced proliferation and interleukin-2 production in rat splenocytes by larval *in vitro* products. *Exp Parasitol.* 1986; 62: 216-222.
- Cantú C, and Barínagarrementeria F. Cerebrovascular complications of neurocysticercosis clinical and neuroimaging spectrum. *Arch Neurol* 1996; 53: 233-39.
- Cañedo L, Laclette JP and Morales E. 1982. Evagination of the metacestode of *Taenia solium*. Pp 363-374. En : A Flisser, K Willms, JP Laclette, C Larralde, C Ridaura and F Beltran (ed). Cysticercosis : present state of Knowledge and perspectives. *Academic Press.* New York, U. S. A.
- Carson W.E., Lindemann M.J., Baiocchi R., et al. The functional characterization of interleukin-10 receptor expression on human natural killers cell. *Blood.* 1995; 12: 3577-3582.
- Carter L L, Zhang X, Dubey C, Rogers P, Tsui L, Swain S L. Regulation of T cell subsets from naive to memory. *J Immunother.* 1998; 21: 181-7.
- Chavarria A, Roger B, Fragoso G, Tapia G, Fleury A, Dumas M, Dessein A, Larralde C, Sciutto E. TH2 profile in asymptomatic *Taenia solium* human neurocysticercosis. *Microbes Infect.* 2003 ; 5(12): 1109-15.

- Chen W. F. & Zlotnik A. IL-10: a novel cytotoxic T cell differentiation factor. *J Immunol.* 1991; 147: 528-536.
- Chung PR, Asch HL, Bruce JI. Antibody-dependent murine macrophage-mediated damage to *Schistosoma mansoni* schistosomula in vitro. *Cell Immunol.* 1982 Dec; 74(2): 243-59.
- Clackson T., & Wells J.A. A hot spot of binding energy in hormone receptor interface. *Sci* 1995; 267: 383-386.
- Craig PS, Rogan MT, Allan JC. Detection, screening and community epidemiology of taeniid cestode zoonoses: cystic echinococcosis, alveolar echinococcosis and neurocysticercosis. *Adv Parasitol.* 1996; 38: 169-250.
- Constant S L., & Bottomly K. Induction of Th1 and Th2 CD4⁺ T cell responses: The alternative approaches. *Annu Rev Immunol.* 1997; 15: 297-322.
- Croft M. Activation of naive, memory and effector T cells. *Curr Opin Immunol.* 1994; 6: 431-437.
- Cumminghan BC., & Wells JA. High-resolution epitope mapping of hGH-receptor interactions by alanine-scanning mutagenesis. *Sci.* 1989; 244: 1081-85.
- Cruz M, Davis A, Dixon H, Pawlowski ZP. Operational studies on the control of *Taenia solium* taeniasis/cysticercosis in Ecuador. *Bull WHO.* 1989; 67:563-6.
- Cruz-Revilla, C., Rosas, G., Fragoso, G., López-Casillas, F., Toledo, A., Larralde, C., Sciutto, E. *Taenia crassiceps* cysticercosis: protective effect and immune response elicited by DNA immunization. *J Parasitol* 2000; 86: 67-74.
- Cuetter AC, Guerra LG, Meza AD, et al. Neurocysticercosis: a special problem in the southwestern United States. *J Trop Geogr Neurol* 1992; 2: 172-176.
- Del Bruto OH, Rajshechar V, White AC, Tsang VC, Nash TE, Takayanagui OM, Schantz PM, Evans CA, Flisser A, Correa D, Botero D, Allan JC, Sarti, E, González AE, Gilman RH, García HH. Proposed diagnostic criteria for neurocysticercosis. *Neurol* 2001; 57(2): 177-183.

Diaz Camacho SP, Candil Ruiz A, Suate Peraza V, Zazueta Ramos ML, Felix Medina M, Lozano R, Willms K. Epidemiologic study and control of *Taenia solium* infections with praziquantel in a rural village of Mexico. *Am J Trop Med Hyg.* 1991 ; 45(4): 522-31.

Díaz-Orea MA, Villalobos N, Aluja A, Rosas G, Gómez-Conde E, Hernández P, Sarralde C, Sciutto E, Fragoso G. Th1 and Th2 indices of the immune response in pigs vaccinated against *Taenia solium* cysticercosis suggest various host immune strategies against the parasite. *Vet Immunol Immunopathol.* 2003; 93: 81-90.

Dixon H and Hardgroves W. A further ten years Clinical study covering 248 cases. *Quart. J Med.* 1944; 13: 107-121.

Dixon H and Lipscomb F 1961. Cysticercosis: An analysis and follow-up of 450 cases stationery office. Medical Research Council Special Report series, 229,58: London.

Doherty PC, Topham D J, Tripp R A, Cardin RD, Brooks J W, Stevenson P G. Effector CD4⁺ and CD8⁺ T cell mechanisms in the control of respiratory virus infections. *Immunol Rev.* 1997; 159:105-117.

Dybwad A, Bogen B, Natvig J B, Forre O. and Sioud M. Peptide phage libraries can be an efficient tool for identifying antibody ligands for polyclonal antisera. 1995. *Clin Exp Immunol*; 102: 438-442.

Escobar A. The Pathology of Neurocysticercosis. In: Cysticercosis of the Central Nervous System. E. Palacios. J Rodríguez-Carvajal and J M Taveras. Eds Charles C. Thomas, Springfield. 1983, pp. 27-54.

Evans CA, Garcia HH, Hartnell A, Gilman RH, Jose PJ, Martinez M, Remick DG, Williams TJ, Friedland JS. Elevated concentrations of eotaxin and interleukin-5 in human neurocysticercosis. *Infect Immun.* 1998; 66(9):4522-5.

Finkelman FD, Holmes J, Katona IM, Urban JF Jr, Beckmann MP, Park LS, Schooley KA, Coffman RL, Mosmann TR, Paul WE. Lymphokine control of in vivo immunoglobulin isotype selection. *Annu Rev Immunol.* 1990; 8: 303-33

- Finkelman FD, Wynn TA, Donaldson DD, Urban JF. The role of IL-13 in helminth-induced inflammation and protective immunity against nematode infections. *Curr Opin Immunol*. 1999; 11(4): 420-6.
- Fiorentino D:F., Bond M.W. Mosmann T.R. Two Types of mouse helper T cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med*. 1989; 170: 2081-92.
- Fleury A, Gomez T, Alvarez I, Meza D, Huerta M, Chavarria A, Carrillo Mezo RA, Lloyd C, Dessein A, Preux PM, Dumas M, Larralde C, Sciutto E, Fragoso G. High prevalence of calcified silent neurocysticercosis in a rural village of Mexico. *Neuroepidemiol*. 2003 Mar-Apr; 22(2): 139-45.
- Flisser A, Gonzalez D, Rodriguez-Carbajal J, Shkurovich M, Cohen S, Fernandez B, Fernandez E, Collado MA, Madrazo I, Plancarte A, Ostrosky P, Montero R, Correa MD, Rodríguez-del-Rosal, Aline A. Swine cysticercosis treated with praziquantel, a short report. *Acta Leiden*. 1989; 57(2): 255-8.
- Flisser A, Sarti E, Lightowers M, Schantz P. Neurocysticercosis: regional status, epidemiology, impact and control measures in the Americas. *Acta Trop*. 2003 Jun; 87(1):43-51.
- Flores-Perez I, Gonzalez GF, Sciutto E, De Aluja AS. Apoptosis induced by gamma irradiation of *Taenia solium* metacestodes. *Parasitol Res*. 2003; 90(3): 203-8.
- Fragoso G, Lamoyi E, Mellor A, Lomeli C, Govezensky T. and Sciutto E. Genetic control of susceptibility to *Taenia crassiceps* cysticercosis. *Parasitol*. 1996; 112: 119-124.
- Fragoso G, Lamoyi E, Mellor A, Lomeli C, Hernandez M, Sciutto E. Increased resistance to *Taenia crassiceps* murine cysticercosis in Qa-2 transgenic mice. *Infect. Immun*. 1998; 66: 760-764.
- Freemann, R. S. Studies on the biology of *Taenia crassiceps* (Zeder, 1800) Rudolphi, 1810 (cestoda). *Can J Zool*. 1962; 40: 969-990.
- Freeman R S, Fallis A M, Shea M, Maberley A L, Walters J. Intraocular *Taenia crassiceps* (Cestoda). II. The parasite. *Am J Trop Med Hig*. 1973; 22: 493-5

Garattini S, Goldin A, Hawking F, Kopin IJ. Chemotherapy of human intestinal helminthiasis: A review, with particular reference to community treatment. *Adv Pharmacol Chem.* 1982; 19: 128-154.

García H, Martínez S. *Taenia solium, Taeniasis/Cysticercosis*, 2nd Edit, H.H. García and M Martínez, Eds, Editorial Universo, Lima. 1999.

García G, Sciutto E, Fragoso G, Cruz-Revilla C, Toledo A, Villalobos N, Flores I, Aluja A, Jose MV, Larralde C. Inhibitory role of antibodies in the development of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* toward reproductive and pathogenic stages. *J Parasitol.* 2001, 87(3): 582-6.

Gemmel MA, and Lawson R. 1982. Ovin Cysticercosis. I. The free living phase, pp 87-98: En: A Flisser, K Willms, JP Laclette, C Larralde, C Ridaura and F Beltran (ed). *Cysticercosis: present state of Knowledge and perspectives.* Academic Press. New York, U. S. A.

Gevorkian G, Manoutcharian K, Larralde C, Hernández M, Almagro J C, Viveros M, Sotelo J, García E. and Sciutto E. Immunodominant synthetic peptides of *Taenia crassiceps* in murine and human cysticercosis. *Immunol lett.* 1996; 49: 185-189.

Glucksman M.J., Bhattcharjee S.& Makouski I. Three-dimensional structure of a cloning vector. X-ray diffraction studies of filamentous bacteriophage M13 at 7 Å resolution. *J Mol Biol.* 1992; 226: 455-470.

Gonzalez AE, Falcon N, Gavidia C, Garcia HH, Tsang VC, Bernal T, Romero M, Gilman RH. Time-response curve of oxfendazole in the treatment of swine cysticercosis. *Am J Trop Med Hyg.* 1998 Nov; 59(5): 832-6.

González LM, Montero E, Harrison LJ, Parkhouse RM, Garate T. Differential diagnosis of *Taenia saginata* and *Taenia solium* infection by PCR. *J Clin Microbiol.* 2000; 38(2): 737-44.

Gonzalez AE, Gavidia C, Falcon N, Bernal T, Verastegui M, Garcia HH, Gilman RH, Tsang VC; Cysticercosis Working Group in Peru. Protection of pigs with cysticercosis from further infections after treatment with oxfendazole. *Am J Trop Med Hyg.* 2001 Jul;65(1):15-8.

Good AH, Miller KL. Depression of the immune response to sheep erythrocytes in mice infected with *Taenia crassiceps* larvae. *Infect Immun.* 1976 ; 14(2): 449-56.

Grihalde, N.D., Chen, Y.C.J., Golden, A., Gubbins, E. and Mandecki, W. Epitope mapping of anti-HIV and anti-HCV monoclonal antibodies and characterization of epitope mimicks using a filamentous phage. *Gene*. 1995; 166: 187-195.

Harty J.T., Tvinnereim A.R., White D.W. CD8⁺ T cell effector mechanisms in resistance to infection. *Ann Rev Immunol*. 2000; 18: 275-308.

Hernandez J, Garfias Y, Nieto A, Mercado C, Montano LF, Zenteno E. Comparative evaluation of the CD4⁺CD8⁺ and CD4⁺CD8⁻ lymphocytes in the immune response to porcine rubulavirus. *Vet Immunol Immunophatol*. 2001; 79(3-4): 249-259.

Hennecke M, Kola A, Baensch M, Wrede A, Klos A, Bautsch W, and Kohl J. A selection system to study C5A-C5A-receptor interactions-phage display of a novel C5A anaphylatoxin, FOS-C5A (ALA27). *Gene*. 1997; 184: 263-272.

Hernández J., Reyes-Leyva J., Zenteno R., Ramírez H., and Zenteno E. Immunity to porcine rubulavirus infection in adult pigs. *Vet Immunol Immunophatol*. 1998; 64: 367-381.

Hernandez M, Beltran C, Garcia E, Fragoso G, Gevorkian G, Fleury A, Parkhouse M, Harrison L, Sotelo J, Sciutto E. Cysticercosis: towards the design of a diagnostic kit based on synthetic peptides. *Immunol Lett*. 2000; 71(1):13-7.

Hoberg EP, Jones A, Rausch RL, Eom KS, Gardner SL. A phylogenetic hypothesis for species of the genus *Taenia* (Eucestoda : Taeniidae). *J Parasitol*. 2000; 86(1): 89-98.

Hoover DL, Nacy CA. Killing of *Leishmania tropica* amastigotes by factors in normal human serum. *J Immunol*. 1984; 132: 893-897.

Hoover DL, Berger M, Oppenheim M, Hockmeyer W, Metzger M. Cytotoxicity of human serum for *Leishmania donovani* amastigotes; Antibody facilitation of alternate complement pathway-mediated killing. *Infect Immun*. 1985;47(1): 247-252.

Huerta M, Aluja A, Fragoso G, Toledo A, Villalobos A, Hernández M, Gevorkian G, Acero G, Díaz A, Alvarez L, Avila R, Beltrán C, García G,

Martínez JJ, Larralde C, Sciutto E. Synthetic peptide vaccine against *Taenia solium* pig cisticercosis successful vaccination in a controlled field trial in rural México. *Vaccine*. 2002; 20: 262-266.

Huerta M, Aluja A, Fragoso G, Toledo A, Villalobos A, Hernández M, Gevorkian G, Acero G, Díaz J, Díaz A, Alvarez L, Avila R, Beltrán C, García G, Martínez JJ, Larralde C, Sciutto E. Vaccination against *Taenia solium* cisticercosis in underfed rustic pigs of México: roles of age, genetic background and antibody response. *Vet Parasitol*. 2000; 90: 209-19.

Janeway C, & Travers P. Immunobiology. 3rd ed singapure. Stanford Press, 1997.

Jinquan T., Larse C.G., Gesser B., Matsushima K., Thestrup-Petersen K. Human IL-10 is a chemoattractant for CD8⁺, T lymphocytes an inhibitor of IL-8 inducer CD4⁺ Tlymphocyte migration. *J Immunol*. 1993; 151: 4545-4557.

Jones L.A, Chin LT, Longo D L, and Krusisbeek M K. Peripheral Clonal elimination on functional T cell. *Science* 1990; 250: 1726-1729.

Kimman TG, De Bruin TM, Voermans JJ, Peeters BP, Bianchi AT. Development and antigen specificity of the lymphoproliferation responses of pigs to pseudorabies virus: dichotomy between secondary B-cell and T-cell responses. *Immunology*. 1995; 86(3):372-8.

Keilbach NM, de Aluja AS, Sarti E. A programme to control taeniasis-cysticercosis (*Taenia solium*) experiences in a Mexican village. *Acta Leiden*.1989; 57:181-189.

Kumar V, Gaur SNS, Pathak KLM. Immunization of pigs against the cysticercosis of *Taenia solium* using fraccionated first and second peaks of *Cysticercus cellulosae* scolex antigen. *Indian J Anim Sci*.1993; 57: 932-35.

Laclette JP, Ornelas Y, Merchant MT, Willms K. Ultrastructure of surrounding envelopes of *Taenia solium* eggs. 1982 Pp. 375-388. En: A. Flisser, K Willms, J Laclette, C Larralde, R Riadura and F Beltran (ed), Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives. *Academic Press*. New York, USA.

Larralde C, Pasilla A, Govezensky T, Sciutto E, Gutierrez G, Tapia-Conyer, Salvatierra B, Sepúlveda J. Seroepidemiología de la cisticercosis en México. *Sal Púb de Méx.* 1992; 34(2): 197-210.

Larralde C, Morales J., Terrazas I., Govezensky T. and Romano M. C. Sex hormone changes induced by the parasite lead to feminization of the male host in murine *Taenia crassiceps* cysticercosis. *J. Steroid. Biochem. Molec. Bio.* 1995; 52: 575-580.

Larralde C, Montoya RM, Sciutto, E, Díaz ML, Govezensky T, and Coltorti. Dechiphering 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* 1989; 40 (3): 284-292.

Larralde C, Padilla A, Hernández M, Govezensky T, Sciutto E, Gutiérrez E, Tapia-Conver R, Salvatierra y Sepúlveda J, Seroepidemiología de la cisticercosis en México. *Sal Púb Mex.* 1992; 34: 197-210.

Larralde C, Sotelo J, Montoya RM, et al.. Immunodiagnosis of human cysticercosis in cerebrospinal fluid: antigens from murine *Taenia crassiceps* cysticerci effectively substitute those from porcine *Taenia solium*. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 1990; 114: 926-928.

Lederman S., Suciú-Foca. Antigen Presenting cells integrate opposing signals from CD4⁺ and CD8⁺ regulatory T lymphocytes to arbitrate the outcomes of immune responses. *Hum Immunol.* 1999; 60: 533-61.

Leid RW, Suquet CM, Perryman LE. Inhibition of antigen- and lectin-induced proliferation of rat spleen cells by a *Taenia taeniaeformis* proteinase inhibitor. *Clin Exp Immunol.* 1984; 57(1): 187-94.

Lenardo M, Ka-Ming F, Hormung F, Mc Farland H, Siegel R, Wang J, and Zheng L. Mature T lymphocytes Apoptosis-immune regulation in a dynamic and unpredictable antigen environment. *Annu Rev Immunol.* 1999; 17: 221-253.

Levy Y., & Brouet J-C. Interleukin-10 prevents spontaneous death of germinal center B cells by induction of BCL-2 protein. *J Clin Invest.* 1994; 93: 424-430.

Lopez-Briones S, Sciutto E, Ventura JL, Zentella A, Fragoso G CD4+ and CD19+ splenocytes undergo apoptosis during an experimental murine infection with *Taenia crassiceps*. *Parasitol Res.* 2003 Jun; 90(2): 157-63.

López J, Webster RE. Morphogenesis of filamentous bacteriophage (1: orientation of extrusion and production of polyphage. *Virology.* 2001; 127: 177-193.

Manoutcharian K, Larralde C, Aluja A, Fragoso G, Rosas G, Hernández M, Villalobos N, Rodarte L P, Govezensky T, Baca M and Sciutto E. Advances in the Development of a Recombinant vaccine against *Taenia solium* pig cysticercosis. *Vaccines.* 1995; 95: 63-68.

Manoutcharian K, Rosas G, Hernández M, Fragoso G, Aluja A, Villalobos N, Rodarte L F, and Sciutto E. Cysticercosis: Identification and cloning of protective recombinant antigens. *J. Parasitol.* 1996; 82(2): 250-254.

Manoutcharian K, Diaz-Orea A, Gevorkian G, Fragoso G, Acero G, Gonzalez E, De Aluja A, Villalobos N, Gomez-Conde E, Sciutto E. Recombinant bacteriophage-based multiepitope vaccine against *Taenia solium* pig cysticercosis. *Vet Immunol Immunopathol.* 2004 May; 99(1-2): 11-24.

Maravilla P, Avila G, Cabrera V, Aguilar L, Flisser A. Comparative development of *Taenia solium* in experimental models. *J Parasitol.* 1998 Oct; 84(5):882-6.

Marvin D.A. Filamentous phage structure, infection and assembly. *Curr Opin Struct Biol.* 1998; 8: 150-158.

Marciano DK, Russel M, Simon SM. An aqueous channel for filamentous phage export. *Science.* 1999 May 28; 284(5419): 1516-9.

- McCornick GF, Zee C_S, Heiden J. Cysticercosis cerebral: a review of 127 cases. *Arch Neurol* 1982; 39:540
- Meola A, Delmastro P, Monaci P et al. Derivation of vaccines from mimotopes. *J Immunol*. 1995; 154: 3162-3172.
- Meola A, Delmastro P, Monaci P et al. Derivation of vaccines from mimotopes. *J Immunol* 1995; 154: 3162-3172.
- Merchant MT, Aguilar L, Avila G, Robert L, Flisser A, Willms K. *Taenia solium*: description of the intestinal implantation sites in experimental hamster infections. *J Parasitol*. 1998; 84(4): 681-5.
- Molinari JL, Soto R, Tato P, Rodriguez D, Retana A, Sepulveda J, Palet A. Immunization against porcine cysticercosis in an endemic area in Mexico: a field and laboratory study. *Am J Trop Med Hyg* 1993; 49: 502-512.
- Molinari JL, Rodriguez D, Tato P, Soto R, Arechavaleta F, Solano S. Field trial for reducing porcine *Taenia solium* cysticercosis in Mexico by systematic vaccination of pigs. *Vet Parasitol*. 1997; 69(1-2): 55-63.
- Moore KV, O'Garra A, de Waal Mlafty R, Vieira P. And Mosmann T.R. Interleukin-10 *Annu Rev Immunol*. 1993; 11: 165-85
- Morimoto C., Letvin N.L. Boyd A.W., et al. The isolation and characterization of the human helper inducer T cell subset. *J Immunol*. 1985; 134: 3762-3770.
- Mosmann T R, Cherwinski HM, Bond MW Geidlin MA, Coofman RL. Two Types of murine helper T cell Clones. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol*. 1986; 136: 2348-2354.
- Muraille E.& Leo O. Revisiting the Th1/Th2 paradigm. *Scand J Immunol*. 1998; 47:1-9.
- Murrell KD. Economic losses resulting from food-borne parasitic zoonoses. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 1991; 22 Suppl: 377-81.

Nascimento E, Costa JO, Guimaraca MP, Tavares CAP. Effective immune protection of pigs against cys-ticercosis. *Vet Immunol Immunoparasitol* 1995; 45: 127-137.

Nabors GS, Nolan T, Croop W, Li J, Farrell JP. The influence of the site of parasite inoculation on the development of Th1 and Th2 type immune responses in (BALB/c x C57BL/6) F1 mice infected with *Leishmania major*. *Parasite Immunol.* 1995 ; 17(11): 569-79.

Ong S, Talan DA, Moran GJ, Mower W, Newdow M, Tsang VCW, Pinner RW. Neurocysticercosis in Radiographically Imaged Seizure Patients in U.S. Emergency Departments. *Emerg Infect Dis.* 2002; 8(6): 608-613.

Pescovitz MD., Lunney JK., & Sachs DH. Murine anti-swine T4 and T8 monoclonal antibodies: distribution and effects on proliferative and cytotoxic T cell. *J Immunol.* 1985; 134: 37-44.

Pearson RD; Dumonde DC. Steighigel RT, Mechanism of lethal effect of human serum upon *Leishmania donovani*. *J Immunol.* 1980; 125: 2195-2201.

Phatak KLM, Gaur SNS. Immunization of pigs with Culture Antigens of *Taenia solium*. *Vet Parasitol.* 1990; 34: 352-56.

Plancarte A, Flisser A, Gaucchi CG, Lightowlers MW. Vaccination against *Taenia solium* cysticercosis in pigs using native and recombinant oncosphere antigens. *Intl J Parasitol* 1999; 29: 643-647.

Pumarola A, Rodríguez-Torres A, García-Rodríguez JA, Piédrola-Angulo G. Microbiología y Parasitología Medica. Ed. Salvat. 1984, p 820. Barcelona, España.

Puré E, Cuff CA. A crucial role for CD44 in inflammation. *Trens Mol Med.* 2001;7: 213-221.

Rabiela –Cervantes M T, Rivas-Hernández A, Rodríguez-Ibarra J, Castillo-Medina S, Canción FM. Anatomopathological aspects of human brain cysticercosis. In: *Cysticercosis: Present Stage of the Knowledge and Perspectives*, A Flisser, K Willms, JP Laclette, C Larralde, C Ridaura, F Beltran, Eds, *Academic Press*, New York. 1982, pp.179-200.

Rakonjak J., Model P. Roles of pIII in filamentous phage assembly. *J. Mol Biol.* 1998; 282: 25-41.

Restrepo BI, Llaguno P, Sandoval MA, Enciso JA, Teale JM. Analysis of immune lesions in neurocysticercosis patients: central nervous system response to helminth appears Th1-like instead of Th2. *J Neuroimmunol.* 1998 Aug 14; 89(1-2): 64-72.

Restrepo BI, Alvarez JI, Castano JA, Arias LF, Restrepo M, Trujillo J, Colegial CH, Teale JM. Brain granulomas in neurocysticercosis patients are associated with a Th1 and Th2 profile. *Infect Immun.* 2001; 69(7): 4554-60.

Rickard, M D and Williams, J. F., Hydatidosis/cysticercosis: immune mechanisms and immunization against infection. *Adv. Parasitol.* 1982; 21: 229-296.

Robinson M, Gustad TR, Erickson MR. Immunological interactions between *Trichinella spiralis* and *Heligmosomoides polygyrus*: cross reactivity between muscle larvae and antibodies raised to unrelated antigens. *Int J Parasitol.* 1997; 27(7): 865-872.

Rosas G, Cruz-Revilla C, Fragoso G, López-Casillas F, Pérez A, Bonilla MA, Rosales R, Sciutto E. *Taenia crassiceps*: Humoral Immune Response and Protection elicited by DNA Immunization. *J Parasitol.* 1998; 84(3): 516-523.

Rosenfeld EA, Byrd SE, Shulman ST. Neurocysticercosis among children in Chicago. *Clin Infect Dis.* 1996; 23(2): 262-8.

Rosenfeld E. Neurocysticercosis Update *Ped Infect Dis J.* 2003; 22(2): 181-182.

Russel M. Protein-protein interactions during filamentous phage assembly. *J Mol Biol.* 1993; 231: 689-697.

Saalmuller A, Redehasse MJ, Buhring HJ, Jonjic S, Koszinowski UH. Simultaneous expression of CD4 and CD8 antigens by a substantial proportion of resting porcine T lymphocytes. *Eur J Immunol*. 1987; 17: 1297-1301.

Saalmuller A. Antigen-specific immune response of porcine T lymphocytes to various pathogens. *Rev Sci Tech*. 1998 Apr;17(1): 71-83.

Sachdev S.S. Engineering M13 for phage display. *Biol Engin*. 2001; 18: 57-63.

Sanchez AL, Ljungstrom I, Medina MT. Diagnosis of human neurocysticercosis in endemic countries: a clinical study in Honduras. *Parasitol Int*. 1999; 48(1):81-9.

Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

Sarti E, Schantz PM, Plancarte A., Wilson M, Gutierrez IO, López AS, Roberts J, Flisser A. Prevalence and risk factor for *Taenia solium* taeniasis and cysticercosis in human and pigs in Village in Morelos, Mexico. *Am J Trop Med Hyg*. 1992 ; 88: 49-52.

Sarti E, Schantz PM, Plancarte A., Wilson M, Gutierrez IO, Aguilera J, Roberts J and Flisser.. Epidemiologic investigation of *Taenia solium* taeniasis and cysticercosis in rural village of Michoacan State, Mexico. *Trans Royal Soc. Trop Med Hyg*. 1994; 88: 49-52.

Sarti E, Flisser A, Schantz PM, Gleizer M, Loya M, Plancarte A, Avila G, Allan J, Craig P, Bronfman M, Wijeyaratne P. Development and evaluation of a health education intervention against *Taenia solium* in a rural community in Mexico. *Am J Trop Med Hyg*. 1997 Feb; 56(2): 127-32.

Sarti E, Rajshekhar V. Measures for the prevention and control of *Taenia solium* taeniosis and cysticercosis. *Acta Trop*. 2003; 87(1): 137-43

Scala G, Chen X, Liu W, Telles JN, Cohen OJ, Vaccarezza M, Igarashi T, Fauci AS. Selection of HIV-specific immunogenic epitopes by screening random peptide libraries with HIV-1-positive sera. *J Immunol* 1999; 162: 6155-6161.

Schantz PM, Cruz M, Sarti E, Pawlowski Z. Potential eradicability of taeniasis and cysticercosis. *Bull Pan Am Health Organ.* 1993; 27(4): 397-403.

Schantz PM, Sarti E, Plancarte A, Wilson M, Criales JL, Roberts J and Flisser A.. Community-Based epidemiological investigations of cysticercosis due to *Taenia solium* comparison of serological screening tests and clinical findings in two populations in Mexico. *Clin Infect Dis.* 1994; 18: 879-885.

Sciutto E, Aluja A, Fragoso G, Rodarte L F, Hernández M, Villalobos N, Padilla A, Keilbach N, Baca M, Govezensky T, Díaz S. and Larralde C. Immunization of pigs against *Taenia solium* cysticercosis. Factors related to effective protection. *Vet. Parasitol.* 1995; 60: 53-67.

Sciutto E, Fragoso G, Díaz M L, Valdez F, Montoya R M, Govezensky T, Lomelí C. and Larralde C. Murine *Taenia crassiceps* cysticercosis: H-2 complex and sex influence on susceptibility. *Parasitol. Res.* 1991; 77: 343-346.

Sciutto E, Fragoso G, Trueba D, Lemus D, Montoya RM, Díaz ML, Govezensky T, Lomelí T, Tapia R. and Larralde C. Cisticercosis vaccine: cross protecting immunity with *T. solium* antigens against experimental murine *T. crassiceps* cysticercosis. *Parasite Immunol.* 1990; 12: 687-696.

Sciutto E, Fragoso G, Fleury A, Laclette JP, Sotelo J, Aluja A, Vargas-Rueda L, Larralde C. *Taenia solium* disease in humans and pigs: an ancient parasitosis rooted in developing countries and emerging as a major health problem of global dimensions. *Microb Infect.* 2000; 2: 1-17.

Scott, J.K., and Smith, G.P. Searching for peptide ligands with epitope library. *Science* 1990; 249:386-390.

Secretaría de Salud. Boletín Semanal de Epidemiología. 1994-1996. México, D. F. Dirección General de Epidemiología, 1996.

Silverman P. Studies on the biology on some Tapeworms of the genus *Taenia*. I. Factors affecting hatching and of taeniid ova , and some criteria of their viability. 1954; 48: 207

Slais J. Functional morphology of cestode larvae. *Adv Parasitol.* 1973;11:395-480

Sotelo, J. and Larralde, C. Immunodiagnosis of Neurocysticercosis. *Arch. Neurol.* 1992;48:633-636.

Sotelo J, Del Brutto OH. Brain cysticercosis. *Arch Med Res.* 2000 Jan-Feb;31(1):3-14.

Summerfield A., Rziha H., and Saalmuller A. Functional characterization of porcine CVD4+CD8+ extrathymic T lymphocytes. *Cell Immunol* 1996; 168: 291-296.

Terrazas LI, Bojalil R, Govezensky T, Larralde C. A role for 17-beta-estradiol in immunoendocrine regulation of murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). *J Parasitol.* 1994 Aug; 80(4):563-8.

Terrazas L.I, Bojalil R, Govenzeksy T and Larralde C. Shift from an early protective Th1-type immune response to a late permissive Th2-type response in murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). *J. Parasitol.* 1997:

Terrazas LI, Bojalil R, Govezensky T, Larralde C. Shift from an early protective Th1-type immune response to a late permissive Th2-type response in murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). *J Parasitol.* 1998; 84(1): 74-81.

Terrazas LI, Bojalil R, Rodriguez-Sosa M, Govezensky T, Larralde C *Taenia crassiceps* cysticercosis: a role for prostaglandin E2 in susceptibility. *Parasitol Res.* 1999 Dec; 85(12): 1025-31.

Toenjes SA, Spolski RJ, Mooney KA, Kuhn RE. The systemic immune response of BALB/c mice infected with larval *Taenia crassiceps* is a mixed Th1/Th2-type response. *Parasitol.* 1999; 118(Pt 6): 623-633.

Toledo A, Cruz C, Fragoso G, Laclette J P, Merchant M, Hernández M and Sciutto E. *In vitro* culture of *Taenia crassiceps* larval cells and cyst regenerarion after injection into mice. *J. Parasitol.* 1997; 83: 189-193.

Toledo A, Larralde C, Fragoso G, Gevorkian G, Manoutcharian K, Hernández M, Acero G, Rosas G, López-Casillas F, Garfias CK, Vázquez R, Terrazas I, Sciutto E. Towards a *Taenia solium* cisticercosis vaccine: an epitope shared by *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* protects mice against experimental cisticercosis. *Infec Immunol.* 1999; 67: 2522-30.

Toledo A, Fragoso G, Larralde C, Rosas G, Hernández M, C, Gevorkian G, López-Casillas F, Acero G, Huerta M, Sciutto E. Two epitopes shared by

Taenia crassiceps and *Taenia Solium* confer Protection against Murine *T. crassiceps* Cysticercosis along with Prominent T1 response. *Inf immunol.* 2001; 1766-73.

Tomer A.R., Weiss A.G., Elgenbrot C. And Sidhu S.S. A minimized M13 coat protein defines the Requirements for Assembly into the Bacteriophage Particle. *J Mol Biol.* 2002; 322: 357-367.

Tough D.F., Sun S., Zhang X., and Sprent J. Stimulation of memory T cells by cytokines. *Vaccine* 2000; 18: 1642-8.

Valdez F, Hernández M, Govezensky T, Fragoso G and Sciutto E. Immunization against *Taenia crassiceps* cysticercosis. Identification of the most promising antigens in the induction of protective immunity. *J. Parasitol* 1994; 80 :931-6

Vignali DAA, Bickle QD, Crocker P, Taylor MG. Antibody dependent killing of *Schistosoma mansoni* schistosomula in vitro by starch-elicited murine macrophages. *J Immunol.* 1990;144:4030-37.

Villa OF, Kuhn RE. Mice infected with the larvae of *Taenia crassiceps* exhibit a Th2-like immune response with concomitant anergy and downregulation of Th1-associated phenomena. *Parasitol.* 1996 ; 112 (Pt 6): 561-70.

Webster R.E. Filamentous phage biology. In Phage Display: A laboratory manual (Barbas C.F.M., Burton D.r., Scott J.K. & Silverman G.J. eds) pp. 1.1-1.37, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Wells JA., Systematic mutational analyses of protein-protein interfaces. *Methods Enzymol.* 1991; 202: 390-411.

White AC Jr, Shandera WX. Seizures and treatment for cerebral cysticercosis. *N Engl J Med.* 1992 31; 327(27): 1955-6.

White AC. Neurocysticercosis updates on epidemiology, pathogenesis, diagnosis and management. *Ann Rev Med.* 2000; 51: 187-206.

Willis AE, Perham RN, Wraith D. Immunological properties of foreign peptides in multiple display on a filamentous bacteriophage. *Gene* 1993; 128: 79-83.

Willms K, Merchant MT. The inflammatory reaction surrounding *Taenia solium* larvae in pig muscle: ultrastructural and light microscopic observations. *Parasite Immunol.* 1980 Winter; 2(4): 261-75.

Willms K, Merchant MT, Gomez M, Robert L. Taenia solium: germinal cell precursors in tapeworms grown in hamster intestine. *Arch Med Res.* 2001; 32(1):1-7.

Yang H, Binns RM. CD44 is not directly involved in the binding of lymphocytes to cultured high endothelial cells from peripheral lymph nodes. *Immunol.* 1993 Jul; 79(3): 418-24.

Yang H., and Parkhouse M. Phenotypic Classification of porcine lymphocytes subpopulation in blood and lymphoid tissues. *Immunology* 1996; 89: 76-83.

Zuckermann F.A., and Husmann R.J. Functional and phenotypic analysis of porcine peripheral blood CD4/CD8 double-positive T cells. *Immunology* 1996; 87: 500-512.

Zuckermann F.A., Zsak L., Mettenleiter T.C., Ben-Porat T. Pseudorabies virus glycoprotein gIII is a major target antigen for murine and swine virus specific cytotoxic T lymphocytes. *J Virol.* 1990; 64(2): 802-812.

Zúñiga-Pflucker J.C., Jones LA., Chin LT., Kruisbeek AM., CD4 and CD8 act as co-receptors during thymic selection of the T cell repertoire. *Semin Immunol.* 1991; 3: 167-75.

XII. Anexos

Anexo I

Hacia la identificación de mecanismos efectores asociados a la protección mediada por S3PVAC

I. Materiales y métodos.

1. Inmunización para la obtención de anticuerpos.

Los anticuerpos específicos contra cada uno de los péptidos se utilizaron para determinar la capacidad de inducir citotoxicidad mediada por anticuerpos.

Para realizar este estudio se inmunizaron 5 grupos de 6 cerdos cada grupo de dos meses de edad libres de cisticercosis (según inspección de la lengua y niveles de anticuerpos anticisticerco) de la comunidad de Huatlatlauca Edo. de Puebla. Los cerdos recibieron 250 μg de cada uno de los péptidos de la S3Pvac individual o conjuntamente y 250 μg de saponina disuelta en agua como adyuvante. El grupo 1 (G1) fue inmunizado con Ketc-1, el 2 (G2) con KETc-12, el 3(G3) con GK-1, 4(G4) con S3Pvac, y el 5 (G5) solo con adyuvante (grupo control). A todos se les aplicó 3 dosis de vacuna a los tiempos 0, 30 y 60 días subcutáneamente en la base de la oreja. Todos los cerdos fueron sangrados por intravenopuntura antes y a los 30, 60 y 90 días posvacunación para obtener anticuerpos contra cada péptido a fin de desarrollar los ensayos de citotoxicidad mediada por anticuerpos.

1a. Detección de anticuerpos por ELISA.

Se determinó el nivel de anticuerpos por inmunoensayo enzimático (ELISA), para lo cual utilizaron placas de microtitulación de poliestireno para fijar cada uno de los péptidos (KETc-1, KETc-12, GK-1) diluidos en 100 µl de buffer de carbonatos 0.1M pH 9.6 por pozo (1µg/péptido), durante toda la noche a 37°C. Las placas se lavaron 3 veces con PBS-Tween 20 (PBST) al 0.03%, y se bloqueó el pegado inespecífico con PBS-BSA al 1% durante 2 h. Las placas se lavaron nuevamente con PBST y se agregó a todos los pozos 100 µl de suero de todos los cerdos diluido 1:200 en PBS-BSA al 1%, incubando a 37°C por 1h. Después de lavar nuevamente con PBST, se agregó 100 µl de un anticuerpo de conejo anti-IgG de cerdo, acoplado a peroxidasa (1:1000 en PBS-BSA al 1%). Las placas se incubaron 1h a temperatura ambiente, después del lavado, el complejo antígeno anticuerpo, se reveló con 3, 3', 5, 5' tetrametilbencidina. Su reacción se detuvo con H₂SO₄ 2N. La intensidad del color se evaluó a 450 nm, en un espectrofotómetro lector de placas para microensayo (Diagnostics Pasteur Mod LP-400).

3. Ensayo de Citotoxicidad Celular mediada por anticuerpos, complemento en células de Taenia crassiceps

3.1 Obtención de células de cisticerco de Taenia crassiceps (células blanco)

Para la obtención de células se colectaron los cisticercos de la cavidad peritoneal de ratones BALB/cAnN infectados con cisticercos de *Taenia crassiceps* (Fragoso *et al.*, 1998). Los cisticercos fueron lavados 3x con PBS 0.75 M, pH 7.3, y mantenidos en agua destilada con antibióticos (penicilina G 100 U/ml, estreptomina 100 µg/ml) por 1 h, con el propósito de lisar la mayor proporción de las células adherentes provenientes del ratón. Los cisticercos fueron cortados en pequeños mm y transferidos a un matraz con tripsina-EDTA (Gibco BRL, New York) al 0.5% en medio de cultivo simple RPMI, durante 15 min con agitación continua. La digestión con tripsina se realizó tres veces o hasta digerir completamente el tejido, se centrifugó. El paquete celular fue resuspendido en medio de cultivo. Las células viables se contaron con azul de tripano y ajustaron a una concentración de 2×10^6 células/ml, en medio suplementado (Toledo *et al.*, 1997), manteniéndolas en cultivo por 2 días en un incubador a 37°C con una atmósfera del 5% de CO₂.

3b. Determinación del porcentaje de lisis celular

Para determinar la lisis celular mediada por complemento, se colocó 1 µl de células blanco/pozo (200,000 células/pozo), en placas Terasaki de 96 pozos, se agregó 1µl/pozo de las Igs purificadas a partir de los sueros de los cerdos inmunizados con cada uno de los péptidos (KETc-1, KETc-12 y GK-1) y con S3Pvac concentrados y diluidos a diluciones 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, se

mezclaron, e incubaron a 37°C/1h. Posteriormente, se agregó 5µl de complemento de conejo (Bohering), y se incubaron nuevamente las placas a 37°C durante 2h. Para determinar la acción del complemento sobre las células, se agregó 5 µl de eosina amarilla al 5% por pozo se incubó 10 min y se determinó el porcentaje de lisis celular en un microscopio invertido.

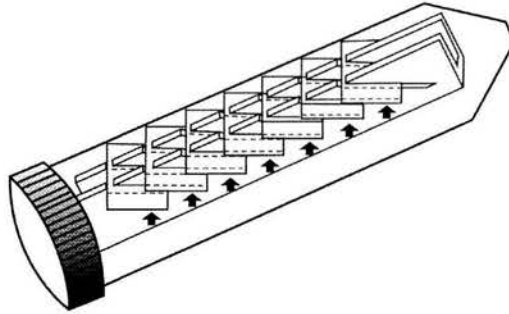
3c. Ensayo de lisis mediada por complemento en cisticercos de Taenia crassiceps

Se obtuvieron 25 cisticercos enteros de 0.3 mm (sin ningún daño comprobado por microscopio y del mismo tamaño) de la cavidad peritoneal de ratones Balb/cAnN infectados, se lavaron 3 veces con solución salina al 0.9 % y se colocaron en tubos eppendorf de 1.5 ml, dividiéndolos en 5 grupos de 5 cisticercos cada uno. A los tubos de cada grupo se le agregó 50µl de las Igs purificadas de a partir de los sueros de cerdos inmunizados con cada uno de los péptidos, de vacS3P, y de los controles igualando su concentración de proteínas a 0.8 µg/ml. Se incubaron a 37°C por 1 h; pasado este tiempo, se les agregó a todos 100 µl de complemento de conejo, se incubaron a 37°C /1 h, y se incluyeron para microscopía, para lo cual, los cisticercos fueron fijados en glutaraldehído al 2%, deshidratados con metanol e incluidos en resina Araldita. Se obtuvieron cortes semifinos de cada

cisticerco, se tiñeron con azul de toluidina y se analizaron y fotografiaron por microscopía de luz.

3d. Ensayo de citotoxicidad celular (células efectoras macrófagos)

Se obtuvieron macrófagos peritoneales de ratones BAB/cAnN (célula efectora), por lavado de la cavidad peritoneal con 10 ml de medio RPMI simple, se centrifugaron y se ajustaron a una concentración de 50×10^6 macrófagos por ml, se cultivaron por 18 h en tubos Falcon de 50 ml con una gradilla con cubreobjetos como muestra la Fig. 1. Al día siguiente se agregaron 10×10^6 células de cisticerco de *Taenia crassiceps* (células blanco), obtenidas como en células blanco y opsonizadas con las Igs purificadas obtenidas a partir de los sueros de cerdos inmunizados en la misma concentración que en 3c. Los cubreobjetos se fueron sacando a los tiempos 0, 10, 20 y 30 min, observándolos y valorando la fagocitosis, fotografiando con un microscopio de luz.



I

Fig. 1 Esquema del tubo utilizado para cultivar los macrófagos peritoneales de ratón.

3e. Ensayo de citotoxicidad celular (efectores: células mononucleares de cerdos vacunados y controles)

Para la obtención de estas células efectoras se obtuvo sangre periférica de los distintos grupos de cerdos, 7 días después de haberles aplicado la última inmunización, la sangre fue diluida 1:3 con PBS, estratificada en Ficoll-hypaque (Histopaque 1077; Sigma) y se centrifuga a 400 g x 20 min. Las células mononucleares de sangre periférica fueron obtenidas de la interfase del ficoll/plasma, lavadas 2x con PBS estéril y ajustadas a 2×10^6 cel/ml. en medio de cultivo RPMI

Las células del cisticerco fueron utilizadas como células blanco. Estas células (2×10^6) fueron marcadas a 37°C por 18 h con $100 \mu\text{Ci}$ de $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$, (Amersham International, Amersham, England), lavadas 3x y ajustadas a 1×10^6 células /ml.

Las células de cisticerco marcadas se transfirieron a placas de 96 pozos (Costar, Cambridge, MA), a una concentración de 1×10^5 cél/pozo (Schaapherder *et al.*, 1996), se adicionó el suero de cerdos no inmunizados e inmunizados con S3Pvac diluidos 1:100, inactivados y no inactivados por calor; se incubaron por 1 h a 37°C . Después se lavaron con RPMI y se adicionó a cada pozo 2×10^6 PBMC (según tabla) de cerdos vacunados y no vacunados en $200 \mu\text{l}$ de RPMI con 10% SFB, incubándose por 18 h a 37°C en un incubador con 5% de CO_2 y atmósfera húmeda.

TABLA A

Cerdos	Vacunados		Cerdos control	
Células de <i>T. crassiceps</i>	1x10 ⁵	1x10 ⁵	1x10 ⁵	1x10 ⁵
Sueros de cerdos diluidos 1:100	Completo	S/complemento	Completo	S/complemento
Incubar a 37°C por 1h Lavar 3x				
Células mononucleares de:				
Cerdo control	4x10 ⁵	4x10 ⁵	4x10 ⁵	4x10 ⁵
Cerdo vacunado	4x10 ⁵	4x10 ⁵	4x10 ⁵	4x10 ⁵
Incubar a 37°C en un incubador con atmósfera de CO ₂ por 18 h				
Leer en un contador gamma				

Las placas se centrifugaron a 200g por 5 min y 100 ul de sobrenadante de cada pozo fue analizado para liberación de ⁵¹Cr en un contador gamma (Gammacor Ames).

Todas las determinaciones incluyeron controles positivos de liberación de marca (cel marcadas tratadas con Triton X-100 al 1%), controles de células blanco y medio, de células blanco y células efectoras y de células blanco con sueros.

El porcentaje de lisis fue calculado según la formula:

$$\% \text{ específico de lisis} = \frac{\text{cpm de la muestra} - \text{cpm liberación espontánea}}{\text{cpm Triton X-100} - \text{cpm liberación espontánea}} \times 100$$

II. Resultados

En este trabajo de tesis se realizó una evaluación general del perfil inmune específico inducido por la inmunización con S3Pvac. Se realizó una evaluación cinética de la respuesta inmune (niveles de anticuerpos, proliferación linfocitaria específica, niveles de citocinas en sobrenadantes de células específicamente proliferadas). En esta fase del estudio se valoró la citotoxicidad inducida por anticuerpos contra cada uno de los péptidos, así como de anticuerpos contra la mezcla de los 3 péptidos (S3Pvac). Estos resultados representan datos preliminares que requieren ser confirmados en experimentos adicionales para su consideración a fin de ser publicados.

1. Detección de niveles de anticuerpos específicos (IgG) contra todos y cada uno de los péptidos que constituyen S3Pvac

Las Figs 1 a,b,c, muestran el reconocimiento de los anticuerpos presentes en los sueros de cerdos inmunizados y controles (DO obtenidas en ELISA), correspondientes a los niveles de los anticuerpos específicamente reconocidos contra cada uno y el total de los péptidos que constituyen la S3Pvac. Antes de la inmunización se detectaron niveles de DO inferiores a 0.15. De los 30 a los 90 días posinmunización, se observó un incremento en los niveles de anticuerpos (0.25-0.35) en los sueros de los cerdos inmunizados, contra todos los péptidos, y contra S3Pvac, a excepción del

tiempo 90 en que observó una disminución en el nivel de anticuerpos anti-KETc1 en los sueros de los cerdos inmunizados con S3Pvac (Fig. 1a).

2. Ensayo de lisis celular mediado por complemento en células de Taenia crassiceps

En la Tabla 1 se muestra la relativa actividad citotóxica de las Igs purificadas de sueros cerdos controles e inmunizados contra células de cisticerco de *Taenia crassiceps*, reactividad que aumentó significativamente con la adición de Igs purificadas de los sueros de cerdos inmunizados (1:16) obteniendo porcentajes de lisis celular de 70 para KETc-1, 80 KETc-12, 99 GK-1 y 50% S3Pvac con las Igs provenientes de los cerdos inmunizados con los respectivos inmunógenos relativos al control que indujo un 20% de lisis.

3. Ensayo de lisis mediada por complemento en cisticercos completos de Taenia crassiceps

El ensayo anterior lo repetimos utilizando cisticercos enteros de *Taenia crassiceps*, que se incluyeron en araldita y los cambios observados inducidos probablemente por los purificados de Igs y el complemento los podemos observar en las Fig. 2 y 3. Se ilustra en las figuras cortes de un cisticerco tratado con Igs anti-GK-1 en el que se observan gran cantidad de orificios o

vesículas debajo del tegumento (Fig. 2), estos orificios fueron escasos con anti-KETc-1 y KETc-12 (Fig. no mostradas), en comparación con el corte de cisticerco tratado con Igs de suero control en donde no observamos orificios (Fig. 3-4).

4. Ensayo de citotoxicidad celular de células de Taenia crassiceps utilizando macrófagos peritoneales de ratón como células efectoras.

Los macrófagos cultivados según el procedimiento previamente descrito (Gómez-Conde, 2000), mostraron un alto porcentaje de adherencia en 18h. Estas células presentaron diferentes grados de fagocitosis positiva de células de *Taenia crassiceps* cubiertas con Igs purificadas procedentes de todos los sueros de cerdos inmunizados (no mostrados). A los 10 min, observamos las células cubiertas con Igs anti-GK-1 muy cerca del macrófago (Fig. 5c), a los 15 min al macrófago emitiendo sus lamelipodios, rodeando a la célula (Fig. 5d), y a los 30 min, la había fagocitado (Fig. 5 c-d). No se observó fagocitosis de células cubiertas con Igs procedentes de sueros control (5a, b).

5. Ensayo de Citotoxicidad celular mediada por anticuerpos de cerdos rústicos inmunizados con vacS3P

La Tabla II y III ilustran los resultados obtenidos en los ensayos de citotoxicidad mediada por complemento y la citotoxicidad celular mediada por

anticuerpos. Los sueros de los cerdos inmunizados y control no mostraron actividad lítica mediada por complemento (Tabla II). El porcentaje específico de lisis fue de 3.5 para los sueros control y de 4.5 para los vacunados. Sin embargo, al agregar células mononucleares de cerdos vacunados y control, el porcentaje aumento de 44.8 ± 9.6 para los cerdos control a 71.8 ± 6.6 para los sueros de cerdos inmunizados y con células mononucleares provenientes de los cerdos inmunizados (Tabla III).

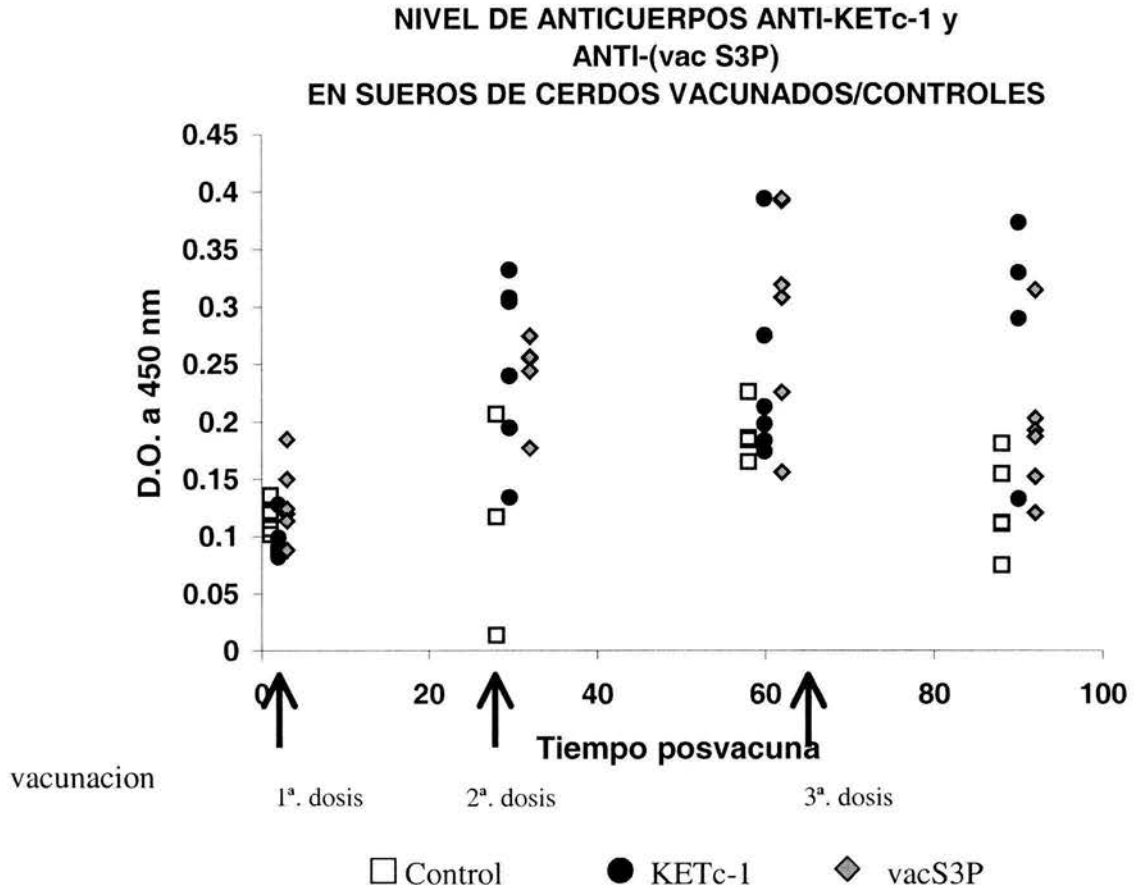


Fig. 1a. Respuesta de anticuerpos de cerdos inmunizados con saponina (control), con VacS3P, o con KETc-1. Los cerdos vacunados y controles fueron sangrados antes y en los tiempos 30, 60, 90 posinmunización. Los niveles de anticuerpos fueron determinados por ELISA. Cada punto representa el nivel de anticuerpo por cerdo (Para KETc-1 tubimos por U de Man Whitney una $P=0.048$, $P=0.29$, $P=0.018$ y para vacS3P $P=0.03$, $P=0.05$, $P=0.07$ en el 1º., 2º., y 3º. tiempo respectivamente).

**NIVEL DE ANTICUERPOS IgG ANTI-KETc-12 Y
ANTI-vacS3P
EN SUEROS DE CERDOS VACUNADOS/CONTROLES**

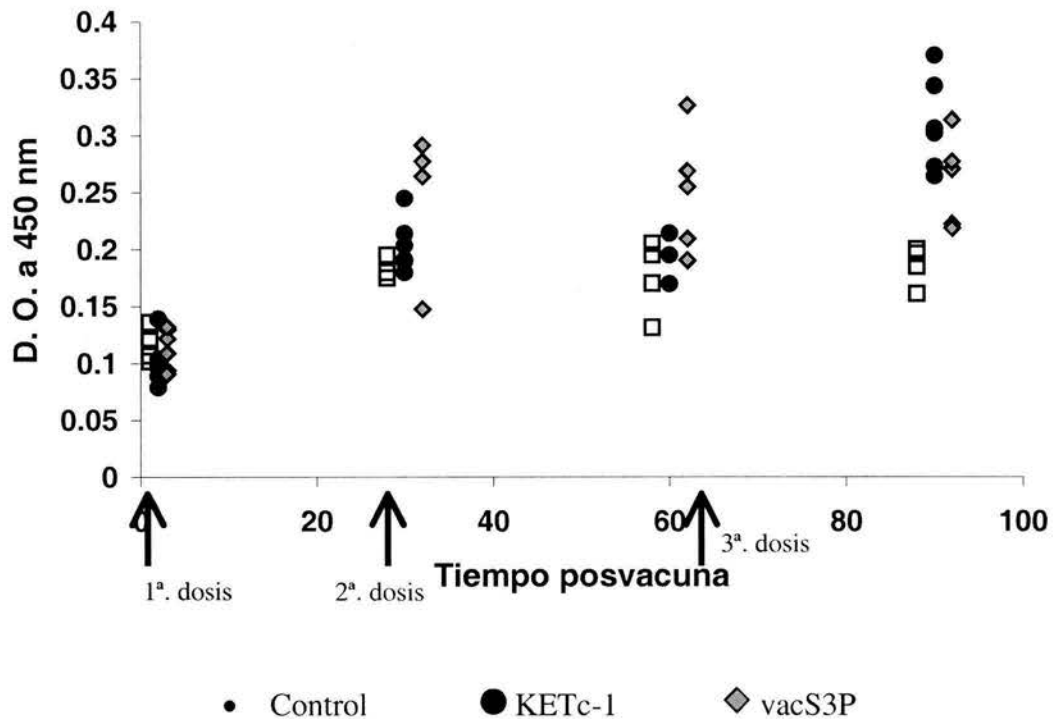


Fig. 1b. Respuesta de anticuerpos de cerdos inmunizados con saponina (control), con VacS3P, o con KETc-12. Los cerdos vacunados y controles fueron sangrados antes y en los tiempos 30, 60, 90 posinmunización. Los niveles de anticuerpos fueron determinados por ELISA. Cada punto representa el nivel de anticuerpo por cerdo (Para KETc-12 tubimos por U de Man Whitney una $P=0.20$, $P=$ no significativa, $P=0.0001$ y para vacS3P $P=0.010$, $P=0.065$, $P=0.0017$ en el 1º., 2º., y 3º. tiempo respectivamente).

**NIVEL DE ANTICUERPOS IgG ANTI-GK-1 Y
ANTI-vacS3P
EN SUEROS DE CERDOS VACUNADOS/CONTROLES**

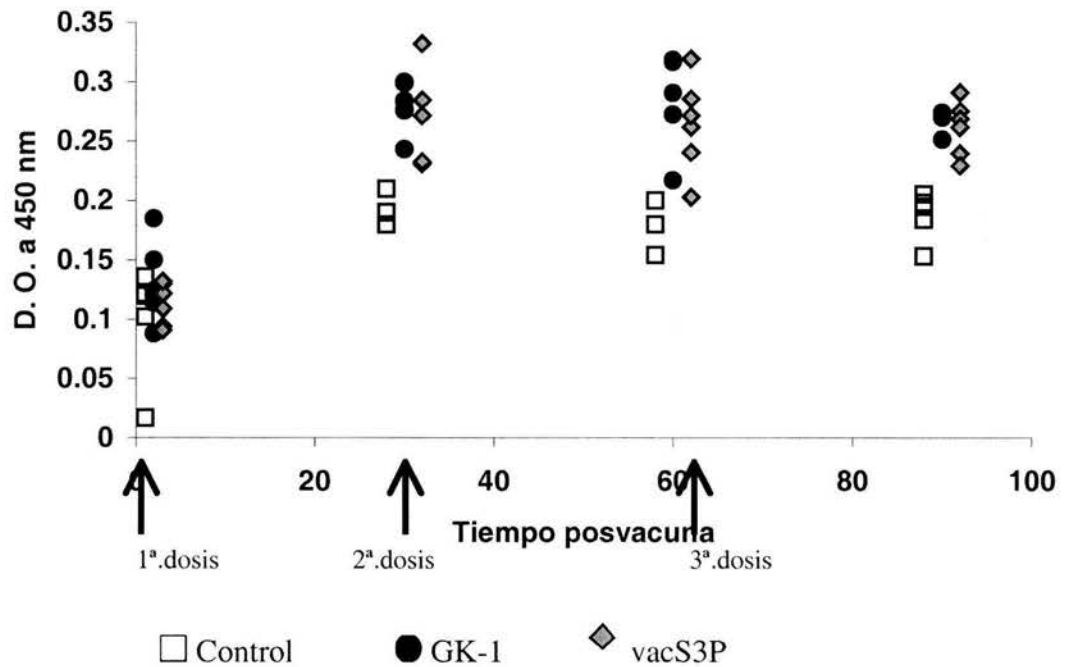


Fig. 1c. Respuesta de anticuerpos de cerdos inmunizados con saponina (control), con VacS3P, o con GK-1. Los cerdos vacunados y controles fueron sangrados antes y en los tiempos 30, 60, 90 posinmunización. Los niveles de anticuerpos fueron determinados por ELISA. Cada punto representa el nivel de anticuerpo por cerdo (Para GK-1 tubimos por U de Man Whitney una $P=0.0004$, $P=0.0014$, $P=0.018$ y para vacS3P $P=0.032$, $P=0.0065$, $P=0.0003$ en el 1º., 2º., y 3º. tiempo respectivamente).

Tabla I. Índice de Citotoxicidad dependiente de complemento en Células de cisticerco de *Taenia crassiceps*

Péptido	Dilución de Igs purificadas de sueros de cerdos	% de células muertas	Índice de Citotoxicidad
VacS3P	1:16	50	3.8
GK-1	1:16	99	9.9
KETc-1	1:16	70	6.25
KETc-12	1:16	80	7.5
Control	1:16	20	0
Control sin Igs	--	20	0

Cada valor representa la media de 3 experimentos. El Índice de Citotoxicidad se calcula por la fórmula

$$IC = \frac{100 \times (\% \text{ de céls lisadas incubadas con Acs} - \% \text{ de céls lisadas sin Acs})}{100 - \% \text{ de células lisadas sin Acs.}}$$

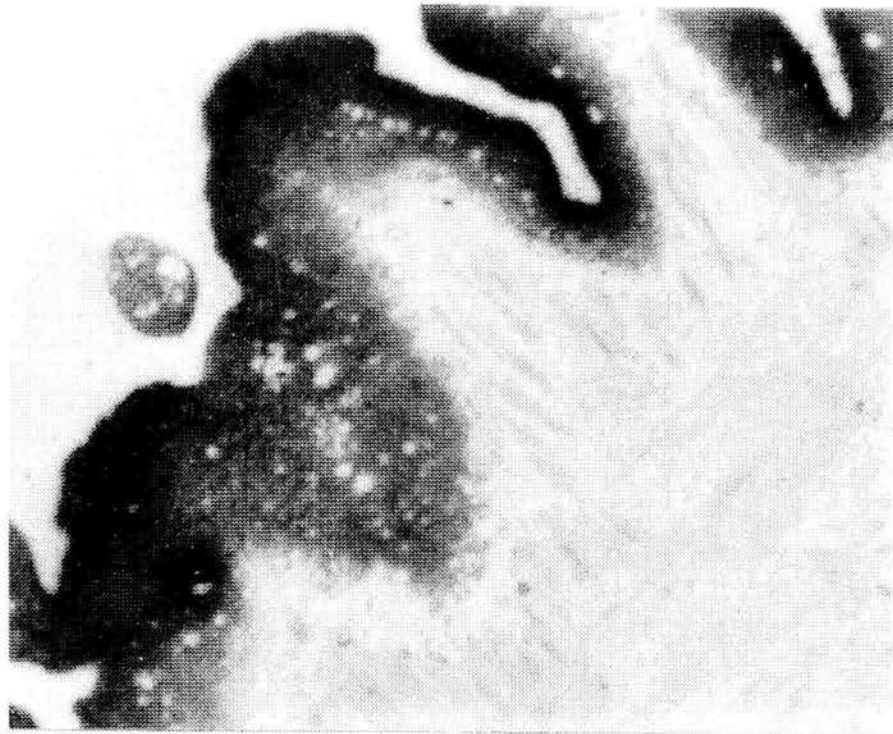


Fig. 2. Microfotografía de Microscopía de Luz de un corte de cisticerco de *Taenia crassiceps* tratado con anti-vacS3P y complemento de conejo, el tegumento presenta un gran número de orificios (100x). (Corte teñido con azul de toluidina).

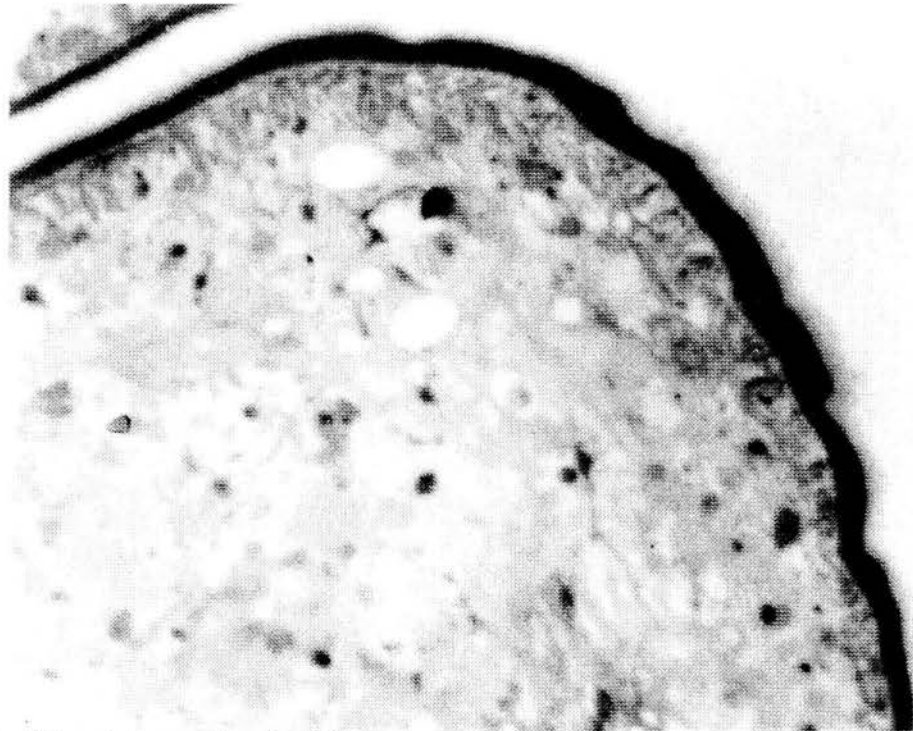


Fig. 3. Microfotografía de Microscopía de Luz de un corte semifino de cisticerco de *Taenia crassiceps* tratado con Igs de sueros de cerdo control y complemento de conejo, el tegumento no presenta orificios (100x). (Corte teñido con azul de toluidina).

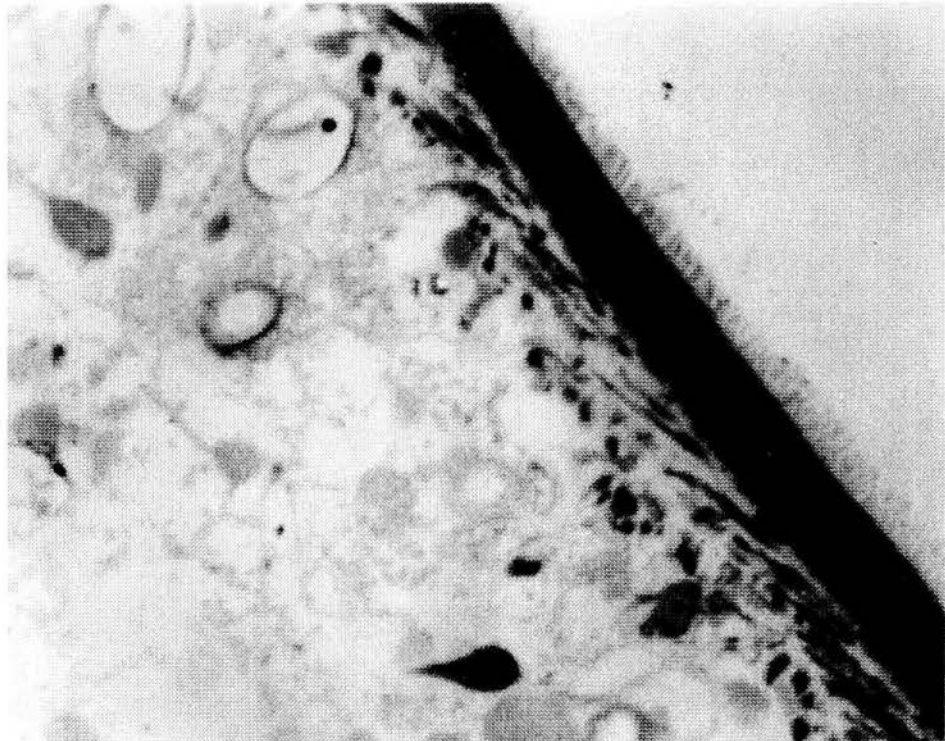
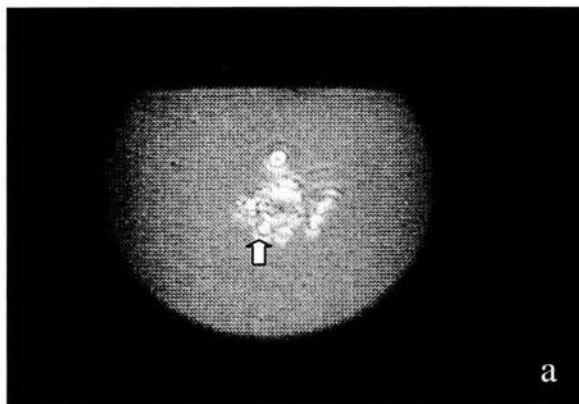
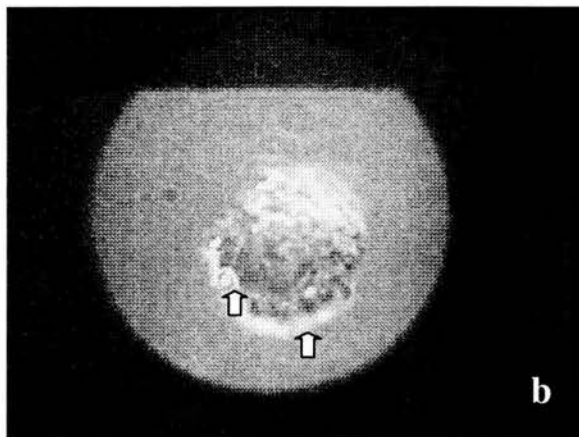


Fig. 4. Microfotografía de Microscopía de Luz de un corte de cisticerco de *Taenia crassiceps* tratado con Igs de suero de cerdos control y complemento de conejo, el tegumento no presenta ningún daño (100x). (Corte teñido con azul de toluidina).



a



b

Fig.5 Macrófagos peritoneales de ratón rodeados de células de cisticerco de *Taenia crassiceps* (flechas) cubiertas con Igs de sueros de cerdos control. (a) a los 10 min (100x), (b) a los 30 min (1000x).

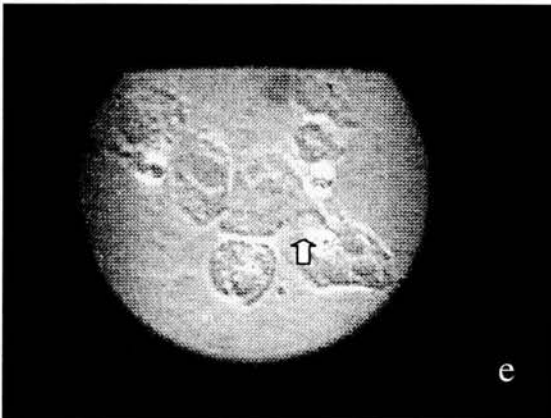
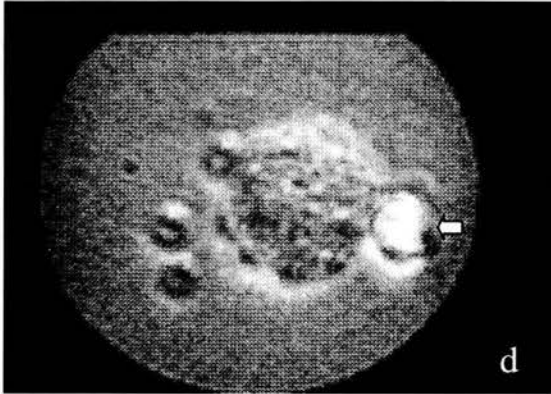
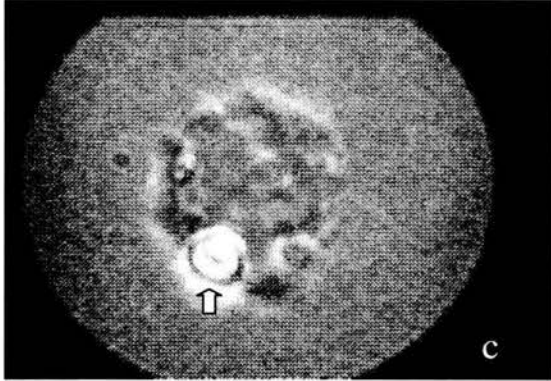


Fig. 5 c-d. Macrófagos peritoneales de ratón fagocitando células de *Taenia crassicepss* (flechas de bloque) cubiertas con Igs de sueros de cerdo vacunados con el péptido GK-1. (c) a los 10 min (1000x), (d) 15 min (1000x) y (e) 30 min (100x).

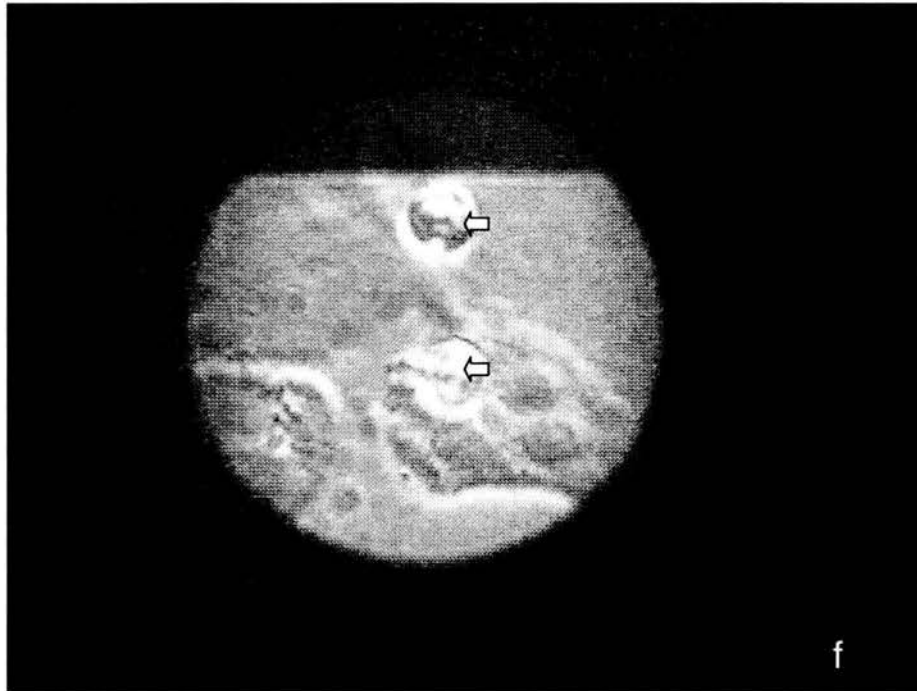


Fig. 5f Microfotografía de microscopia de Luz, mostrando un macrofago peritoneal fagocitando células de cisticerco de *Taenia crassiceps* (flechas) cubiertas con Igs de suero de cerdo vacunado con GK-1 (4000x).

Tabla II. Lisis mediada por complemento de células de cisticerco de *Taenia crassiceps* en presencia de inmunoglobulinas de cerdos vacunados y Controles.

Células de cisticerco incubadas con sueros de cerdo:	Tratamiento del suero	
	Intacto	S/Complemento
Controles	3.5 ± 2.7	1.7 ± 0.5
Vacunados	4.5 ± 4.0	13.6 ± 8.2

Cada valor representa el porcentaje específico de lisis ± SD células de cisticerco de *Taenia crassiceps* en presencia del suero de cuatro cerdos controles y 4 cerdos vacunados.

No se encontró una significancia estadística ($P > 0.05$) utilizando ANOVA por la prueba de Tukey

Tabla III Lisis celular de células de cisticercos de *Taenia crassiceps* inducida por inmunoglobulinas de cerdos control y vacunados.

Células de cisticerco incubadas con:	Sueros de cerdos				
	Controles			Vacunados	
		S/complemento	Intactos	S/complemento	Intactos
Células mononucleares procedentes de:					
Controles	12.8±0.4 ^a	44.2±7.4 ^b	52.7±6.6 ^{bc}	54.1±5.4 ^{bc}	60.0±7.4 ^c
Vacunados	11.8±0.6 ^a	53.9±3.4 ^{bc}	44.8±9.7 ^b	69.5±7.4 ^d	71.8±6.6 ^d

Cada valor representa el promedio del porcentaje de lisis ± DS de células de cisticercos de *Taenia crassiceps* en presencia de sueros de cerdos control y vacunados (8 de cada uno). El porcentaje de lisis se determinó

$$\% \text{ de Lisis} = \frac{\text{Experimental-basal}}{\text{Total- Basal}} \times 100$$

^{a,b,c,d} Los valores en cada parámetro con letras diferentes son significativamente diferentes (P<0.05), Prueba de Tukey.

III. Discusión

En esta fase del estudio se analizaron características funcionales de los componentes de la respuesta inmune celular y humoral inducida por la inmunización con tres péptidos protectores en contra de la cisticercosis porcina.

Para este estudio se utilizaron cerdos rústicos provenientes de una granja de la Comunidad de Huatlatlauca mismos que se mantuvieron en las instalaciones de dicha granja. En estos cerdos encontramos como previamente fue reportado que estos péptidos inducen una baja respuesta de anticuerpos de clase IgG, a excepción de GK-1.

La relevancia funcional de esta respuesta en la capacidad protectora comenzamos a explorarla a través de un diseño experimental que nos permite evaluar la capacidad cisticida de los anticuerpos mediados por complemento (fuente externa) y por células mononucleares. Para ello utilizamos como blanco, células de *Taenia crassiceps*, cuya obtención y características habían sido previamente reportadas en nuestro laboratorio (Toledo *et al.*, 1997). Si bien las células no provienen de *Taenia solium*, utilizamos las células de cisticerco murino considerando que estos epítopes eran compartidos por ambos parásitos y podíamos considerarlo como un modelo donde evaluar el fenómeno de lisis celular y de DACC. Nuestros datos muestran un porcentaje elevado de lisis en las células de *Taenia*

crassiceps cubiertas con anti-KETc-12 y complemento de conejo (Tabla I). Pearson y col. han observado que los promastigotes de *L. donovani* son lisados por factores presentes en el suero humano normal (Pearson *et al.*, 1980). Este no posiblemente el caso en nuestras observaciones en las que los experimentos fueron realizados con Igs purificadas a partir de los sueros de cerdos inmunizados, habiendo tenido que emplearse una fuente externa de complemento. Es posible que los anticuerpos dirigidos contra cada uno de los péptidos, se fijen en la superficie de las células y en presencia de complemento induzcan una activación mediando lisis celular. Un mecanismo similar pudo ser el resultante de los fenómenos de lisis observados en los parásitos completos (Fig 2). Esto es factible considerando que los anticuerpos anti-péptidos, reconocen diferentes componente del tegumento del cisticerco de la *Taenia crassiceps* (Toledo *et al.*, 1999, 2001).

Los macrófagos de muchas especies animales tienen la capacidad de actuar como células efectoras *in vitro* destruyendo parásitos (Vignali *et al.*, 1990). Chung y col. han reportado la habilidad de células de exudado peritoneal de ratones, para destruir *Schistosomulas in viro* en presencia de sueros de ratones infectados (Chung., *et al* 1982). En nuestras observaciones los macrófagos de la cavidad peritoneal de ratones, fueron aparentemente capaces de fagocitar las células de cisticerco de *Taenia crassiceps in vitro* en presencia de Igs de sueros de cerdos inmunizados (Fig

5c, d, e, f). Sin embargo esto no ocurrió con Igs de suero de cerdos control (Fig a, b). Estas observaciones no son claramente interpretables considerando que no se determinó si los macrófagos utilizados en nuestro experimento estaban activados o parcialmente activados. En el caso de la DACC, al poner células de cisticerco de *Taenia crassiceps* en contacto con mononucleares de cerdos vacunados y control, no observamos un porcentaje elevado de lisis, lo que sugiere que la sola presencia de células mononucleares no afecta importantemente la viabilidad de las mismas (aprox. 10% de lisis). Sin embargo, considerando el perfil inflamatorio observado, cabe la posibilidad de que modificando la relación entre células mononucleares y células de cisticerco pudiéramos observar diferencias en la capacidad de lisis de los mononucleares que provienen de cerdos vacunados. Mientras tanto, la sola adición de sueros tanto de animales controles y más efectivamente de animales vacunados incrementa a más del 40% los porcentajes de lisis observados. La mayor lisis se observó, cuando los mononucleares y los sueros provenían de cerdos vacunados. Considerando el importante efecto obtenido agregando suero a los mononucleares, si bien estos resultados son preliminares es factible que los macrófagos activados a través de los anticuerpos inducidos, podrían dañar al parásito.

Es factible que la exacerbada respuesta inflamatoria pueda dañar al parásito desde la fase de oncosfera hasta el cisticerco, en especial considerando que formas tempranas pudieran ser más susceptibles a la liberación de radicales libres superóxidos, óxido nítrico, componentes que se ha descrito tienen capacidad de dañar endotelios vasculares durante un proceso inflamatorio. Sería de interés considerar si estos mediadores de inflamación pudieran inducir a componentes celulares del parásito hacia apoptosis. En este sentido, muy recientemente en una evaluación de un antígeno candidato a vacuna utilizando inmunización con DNA, los autores describen que se encuentran signos claros de aumento de apoptosis en los cisticercos provenientes de animales vacunados (López-Briones *et al.*, 2003). Este fenómeno podría ser también inducido por la S3PVac considerando que en la evaluación de S3PVac en campo observamos que en los cerdos vacunados se recuperaba un porcentaje mayor de cisticercos no viables (4 vs 40% en vacunados, Huerta *et al.*, 2001). Este efecto fue aún más claro cuando se observaron histológicamente las muestras de cisticercos obtenidos a partir de cerdos vacunados y controles. El efecto de mayor daño sobre parásitos instalados señala el interés de evaluar la capacidad terapéutica de esta vacuna.

Anexo II

Fago filamentoso M13

El bacteriófago M13 es un virus filamentoso de la *Escherichia coli* que mide aproximadamente 1µm de longitud y menos de 10 nm de diámetro. El filamento viral consiste de una hebra de DNA rodeada por proteínas de cubierta (Marvin, D. A., *et al.*, 1998). La cubierta contiene 5 diferentes proteínas (Fig.1), la mayoría consiste de algunas miles de copias del gene 8, proteína principal de cubierta (p8), la cual cubre la longitud de la partícula.

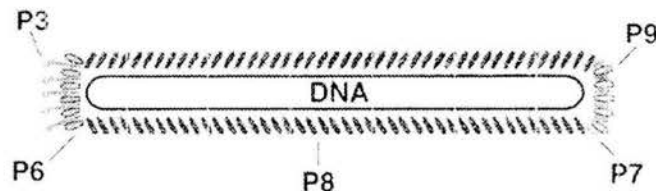
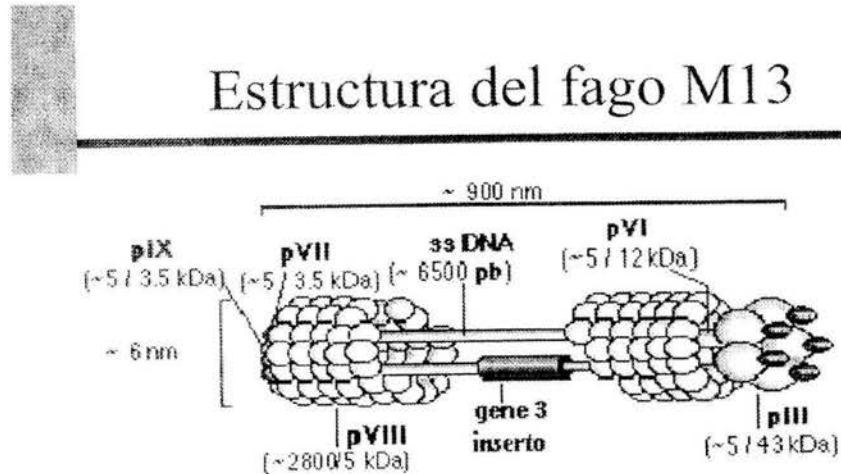


Figura 1. Diagrama del bacteriófago mostrando la hebra de DNA (core) y las 5 proteínas de cubierta.

Las cuatro proteínas menores de cubierta están presentes en aproximadamente 5 copias por partícula, la proteína 7 y 9 (P7 y P9) en un polo y la proteína 3 y 6 (P3 y P6) en el otro (Fig. 2). Las cinco proteínas de

cubierta contribuyen a la estabilidad estructural del fago, la P3 es también necesaria para el reconocimiento celular e infección del hospedero.



- # DNA circular y de cadena sencilla (6.4 Kbp)
- # Codifica para 10 proteínas

Figura 2. Estructura del Fago M13

La P3 es la más larga y compleja de las proteínas de cubierta, contiene tres dominios diferentes (Sachdev *et al.*, 2001). El dominio N-terminal inicia la translocación del DNA viral en la *E. coli* durante la infección mientras el segundo dominio confiere el reconocimiento celular por unión del *filus* F con la superficie de la *E. coli*. El dominio C-terminal interacciona con otras

proteínas de cubierta del fago y es responsable de la integración de la P3 en el fago (Rakonjac *et al.*, 1999)

La estructura de los dominios P3 se ha determinado por cristalografía de rayos X y espectroscopía NMR (Glucksman *et al.*, 1992), pero la estructura del dominio C-terminal no se ha determinado aún. Los estudios de partículas de fagos con rayos X han revelado la estructura de la alfa-hélice en moléculas P8, la cual cubre la longitud de la partícula en un arreglo repetitivo (Marvin *et al.*, 1998). La estructura de las proteínas (P6, P7 y P9) no se ha determinado.

El genoma del fago M13 contiene 11 genes; 5 de estos genes codifican las proteínas de cubierta descritas, mientras los otros codifican las proteínas necesarias para la replicación viral y ensamblaje (Tomer *et al.*, 2002). La replicación M13 se inicia cuando la P3 se une al Filus en la superficie de la *E.coli*, entonces facilita la translocación del DNA viral dentro del citoplasma de la *E. coli*. Dentro de la célula del hospedero la única hebra de DNA es convertida a una doble hebra, la cual es duplicada y usada como templado para la producción de todas las proteínas del fago. Eventualmente, la doble hebra es usada también como templado para la producción de nuevas hebras de DNA viral. De esta forma, los componentes de nuevas partículas del fago son acumulados dentro de la célula del hospedero.

Antes del ensamblaje, nuevamente se sintetizan proteínas de cubierta que son ancladas en el inner de la membrana (IM) con su N terminal en el periplasma y su C terminal en el citoplasma por un único dominio transmembranal. El genoma del fago codifica proteínas que no son encontradas en la partícula, pero son necesarias para el ensamblaje y exportación del fago. Multímeros de la proteína 4 (P4) interaccionan fuera de la membrana (OM) con multímeros de la proteína-1 y la proteína-2 (P1 y P2) en el IM (Russel *et al.*, 1993) para formar un sitio de ensamblaje que puede funcionar como un poro entre el cual los fagos ensamblados son estructurados (Marciano *et al.*, 1999, Russel *et al.*, 1993). En el citoplasma otra proteína codificada por el fago (proteína-5 P5) se une al ssDNA viral sintetizado. El complejo P5-ssDNA interacciona con P1/PII en el sitio de ensamblaje, y esto inicia el proceso de ensamblado del fago. En el sitio de ensamblaje la P5 es liberada del ssDNA y remplazada por proteínas de cubierta. El ensamblaje es iniciado por la adición de las proteínas menores de cubierta P7 y P9 y al final algunas copias de P8 (López *et al.*, 1983). En la elongación del fago el ssDNA es estructurado de hospedero y concomitantemente rodeado por moléculas P8. El proceso es terminado, por la adición de las proteínas menores de cubierta P6 y P3 y la partícula del fago ensamblada es liberada dentro del medio extracelular (Rakonjac *et al.*, 1998).

El ensamblaje y la estructura del fago filamentoso es dominada por interacciones proteína-proteína y por proteína-DNA envolviendo la P8 esta proteína es el componente mayor de la cubierta viral. La cubierta consiste de varias capas, cada capa contiene cinco P8 idénticas. Cada molécula P8 hace un contacto extensivo con P8s en tres capas arriba y tres capas abajo, pero contactos menores con P8s en la misma capa (Glucksman *et al.*, 1992). Mientras el análisis de difracción con rayos X ha revelado los contactos intermoleculares que define la estructura mayor de cubierta de la cubierta del fago, no nos dice de las contribuciones energéticas de estos contactos en el ensamblaje y estabilidad del fago. Estudios de las interacciones proteína-proteína han mostrado que en muchos casos únicamente el subgrupo de el sitio de la cadena que hace contacto intermolecular hace contribución energética a la unión y a menudo este sitio de la cadena, junto con el grupo en epítopes funcionales (Clackson *et al.*, 1995; Bogan *et al.*, 1998). El mapeo exacto de los epítopes funcionales requiere de una estructura tridimensional y un sitio directo de mutagénesis combinado con ensayos funcionales para evaluar la contribución del sitio de la cadena individual para la función de la proteína (Wells *et al.*, 1991; Cunningham *et al.*, 1989).

Determinar los epítopes funcionales que son necesarios para la incorporación estable del P8 dentro de la cubierta del fago M13, es

complicado por el hecho de que P8 puede realizar múltiples funciones durante su ciclo de vida (Webster *et al.*, 2001) y cada una de estas funciones depende en particular del sitio de la cadena de P8. En la fase 1, la P8 naciente se inserta dentro del IM en un proceso que es independiente de las proteínas del hospedero, pero en cambio depende de una N terminal pro-péptido y en ciertos residuos en la P8 madura (Russel *et al.*, 1993). Siguiendo la inserción de la membrana, el pro-péptido es removido por una proteasa del hospedero, saliendo el residuo 50 de la P8 madura anclada en la membrana. En la fase 2, la P8 interactúa con el sitio de ensamblaje y transición de la membrana dentro de la cubierta viral (Fig. 3). En la tercera,

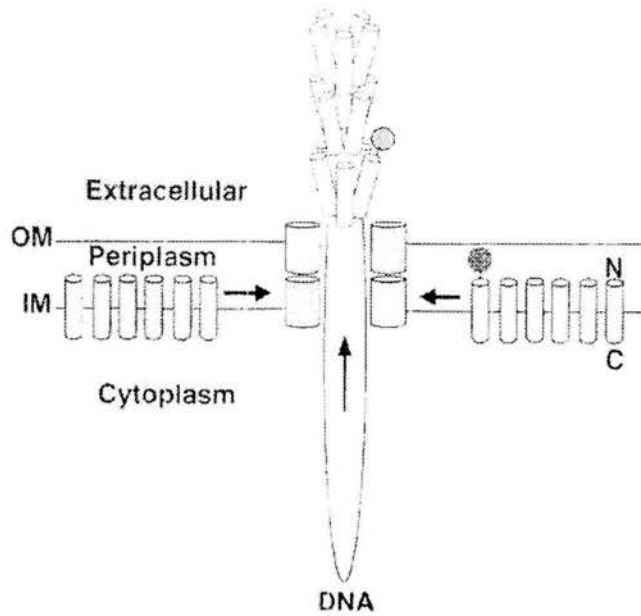


Figura 3. Ensamblaje de proteínas en la cubierta viral (Marvin *et al.*, 1998).

fase final, la molécula P8 interactúa con cada una y con el DNA viral para formar una partícula del fago estructuralmente estable (Marvin *et al.*, 1998).