



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

CARACTERIZACION DE LAS PROPIEDADES
INMUNOGENICAS DE KETc1 ADMINISTRADO EN
DIFERENTES SISTEMAS DE EXPRESION

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICA EN ALIMENTOS

P R E S E N T A :

JACQUELYNNE BRENDA CERVANTES TORRES



EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA



MEXICO, D.F.

2005

m. 349431



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.

autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Jacquelyne Brenda Cervantes Torres

FECHA: 27 Oct '05

FIRMA: 

Jurado asignado:

- | | |
|--------------|--|
| Presidente | Prof. Biserka Sveshtarova Pekarkova |
| Vocal | Prof. Luz Del Carmen Castellanos Román |
| Secretario | Prof. Edda Lydia Sciutto Conde |
| 1er Suplente | Prof. Beatriz de Guadalupe Serrano López |
| 2º Suplente | Prof. David Guillermo Mendoza Cózatl |

Sitio donde se desarrolló el tema: Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México



Dra. Edda Lydia Sciutto Conde
Asesor



Jacquelyne Brenda Cervantes Torres
Sustentante

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México por brindarme la oportunidad de pertenecer a la máxima Casa de Estudios.

Al Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México por albergarme durante estos dos últimos años para la realización de mi trabajo de tesis.

A la Dra. Edda Sciutto Conde por ser una excelente tutora y Dra. Gladis Fragoso, ambas por compartir sus conocimientos con todos sus estudiantes y brindarme su apoyo y confianza.

A la Dra. Andrea Toledo Rojas por ser una gran maestra, por todo su apoyo brindado y estar al pendiente de mí.

Al personal del bioterio, especialmente a MVZ. Gerardo Arrellin y Georgina Díaz, quienes nos proveen de los animales necesarios.

Al Dr. Fernando A. Goldbaum, Fundación Instituto Leloir, Buenos Aires.

A la Dirección General de Apoyo al Personal Académico (DGAPA) a través del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) (IN221905).

DEDICATORIAS

A mi mamá SONIA, a quien ha dedicado su vida al cuidado de nosotras. Por ser un excelente ejemplo de vida y por darnos su cariño incondicional. Gracias por desvelarte conmigo y alentarme a seguir adelante. Esto no sería posible sin tu apoyo. Y sobretodo por ser la mejor mamá y amiga. Te Quiero Mucho Mami!!!

A mis hermanas KARLA y CHRIS, las siempre distraídas por soportarme en todo momento. Por apoyarme y demostrarme que a pesar de los momentos difíciles siempre estaremos juntas. Las quiero mucho chicas superpoderosas.

A mis tíos GERARDO y LAURA, y a mi familia queretana Claus, Rosy, Lupita, Memo, Raúl, a mis niños Fer, Raúl, Migue, Carlitos y Carlita, Dany. A mis primos Lupita, Jorge, Paty.

A mis mejores AMIGAS Vane, Carla, Monichu, Iso, Luz, Kyoko, Laura porque a pesar de los años y la distancia siempre seguiremos juntas. A Raquel, Yu, Pau, Lulú

A mis amigos los P.RONES (Saúl 'Char', Luis Armando 'Guayabas', Edwin 'Tioba', Cuauhtémoc 'Tolo', Luis Fernando 'Turko', Iván, Fabián 'Tomás', Christian 'Pompilio', Raúl, Job, Reno, Adrián 'Perrito'), Alan, Luis Humberto, Rodrigo, Mario gracias por enseñarme a disfrutar la vida. A Mau, Abraham. A todos gracias por brindarme su amistad y apoyo incondicional.

A todos los que convivimos a diario en el laboratorio especialmente Andy, Carmen, Gaby, Jaime por su apoyo y amistad, y hacer que la estancia en el laboratorio sea muy agradable.

CONTENIDO

	PÁGINAS
1. RESUMEN	7
2. GLOSARIO	8
3. INTRODUCCIÓN	9
3.1. Ciclo de vida de <i>T.solium</i>	11
3.2. Fases del ciclo de vida de <i>T.solium</i>	11
3.2.1. Huevos	11
3.2.2. Cisticerco	12
3.2.3. La tenia	12
3.3. Patología y sintomatología	13
3.4. Control sanitario	14
4. ANTECEDENTES	16
4.1. <i>Brucella ssp.</i> lumazina sintetasa (BLS)	20
4.1.1. Origen	20
4.1.2. Estructura	21
4.1.2.1. Estabilidad estructural	22
4.1.3. Propiedades inmunológicas	23
5. OBJETIVOS	25
6. MATERIALES Y MÉTODOS	26
6.1. Procedimiento	26
6.2. Diseño experimental	29
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
8. CONCLUSIONES	38

9. BIBLIOGRAFÍA	39
-----------------	----

10. APENDICES	47
---------------	----

10.1. Artículos desarrollados en colaboración durante el trabajo de tesis	
---	--

I.

Sciutto E, Toledo A, Cruz C, Rosas G, Meneses G, Laplagne D, Ainciart N, **Cervantes J**, Fragoso G, Goldbaum FA (2005). *Brucella spp.* lumazine synthase: a novel antigen delivery system. *Vaccine* 23(21):2784-90.

II.

Hernández M, Cabrera-Ponce JL, Fragoso G, López-Casillas F, León-Ramírez C., Sanchez-García G, Guevara A, Toledo A, **Cervantes J**, Cruz C, Acero G, Bojalil R, Herrera-Estrella L and Sciutto E. A new highly effective transgenic papaya-based anticysticercosis vaccine. Sometido a publicación.

10.2. Evaluación de nuevos sistemas para la expresión de vacunas subunitarias	48
---	----

RESUMEN

La cisticercosis causada por *Taenia solium* es una parasitosis frecuente en países en vías de desarrollo que afecta a humanos y a cerdos. Esta parasitosis ha sido objeto de numerosos estudios relacionados con el diagnóstico, tratamiento y prevención. Entre ellos destaca el desarrollo de vacunas contra la cisticercosis porcina con el propósito de interrumpir el ciclo de vida del parásito. En nuestro grupo de investigación se ha desarrollado una versión de vacuna sintética, S3Pvac, que está constituida por tres péptidos denominados KETc1, KETc12 y GK1.

En este trabajo de tesis se evaluó la capacidad inmunogénica de KETc1, expresado en forma quimérica asociado a lumazina sintética (BLS) de *Brucella spp.* Utilizando el péptido KETc1 y el modelo de cisticercosis murina causada por *Taenia crassiceps* se evaluó BLS como proteína acarreadora para vacunación con el propósito de contemplar una nueva alternativa para aumentar la inmunogenicidad de vacunas subunitarias peptídicas así como su producción por DNA recombinante en cultivos bacterianos.

Entre los resultados principales se observó que la inmunización por vía subcutánea con BLS-KETc1 en ratones de la cepa BALB/cAnN indujo altos niveles de protección (73%), similares a los inducidos por el péptido sintético pero sin el requerimiento de adyuvante. KETc1 adquiere antigenicidad expresado en forma polimérica en la superficie de BLS e induce en los ratones inmunizados un incremento significativo de anticuerpos específicos y proliferación linfocitaria *in vitro*.

Los resultados obtenidos en esta tesis permiten proponer a BLS como una nueva molécula de interés para la presentación efectiva de vacunas subunitarias peptídicas y confirman extensamente la capacidad protectora del péptido KETc1.

2. GLOSARIO

BLS	<i>Brucella</i> lumazina sintetasa	NaOH	Hidróxido de sodio
Con A	Concanavalina A (mitógeno)	NC	Neurocisticercosis
cpm	Cuentas por minuto	NP	No purificada
DNA	ácido desoxirribonucleico	°C	Grado centígrado
i.e.	Índice de estimulación	OD	Densidad óptica
IFN- γ	Interferón gamma	P	Purificada
Ig	Inmunoglobulina	PBS	Amortiguador de fosfatos/ salina (0.01M, NaCl 0.15) pH 7.4
IL-2	Interleucina 2	PBS-BSA	PBS-albúmina sérica bovina
kDa	kilo Dalton	pH	Potencial de hidrógeno
LCR	Líquido cefalorraquídeo	RPMI 1640	Medio de cultivo para células eucariotas
LPS	Lipopolisacárido	SD	Desviación estándar
Mab	Anticuerpo monoclonal	SDS	Dodecil Sulfato de sodio
mg	miligramos	TLR	Receptor de células dendríticas (Toll like-receptor)
mM	milimolar	μ g	microgramos

3. INTRODUCCIÓN

La cisticercosis causada por el estado larvario *Taenia solium* afecta frecuentemente y gravemente la salud humana y la porcicultura rústica. La prevalencia e intensidad de esta enfermedad está relacionada con factores asociados a la exposición (higiene personal deficiente, fecalismo al aire libre, la crianza rústica de cerdos, consumo de carne mal cocida, sistemas inadecuados de inspección sanitaria) así como factores biológicos del hospedero y del parásito. Entre los factores del hospedero existe información que sustenta la participación de factores inmuno-inflamatorios, genéticos, sexuales y etarios en la severidad de la enfermedad (Fleury et al., 2004; Chavarría et al., 2003). Entre los factores asociados al parásito, se han demostrado diferencias entre parásitos de diferentes orígenes que permiten suponer su participación en la patogénesis en la neurocisticercosis (Maravilla et al., 2003; Vega et al., 2003).

En países europeos occidentales la cisticercosis fue controlada progresivamente y finalmente erradicada a través de programas efectivos de control entre los que destaca la inspección efectiva de rastros. Sin embargo, esta enfermedad continúa profundamente arraigada en Latinoamérica, África y Asia en donde prevalecen condiciones asociadas al subdesarrollo (Cao et al., 1997; Sciutto et al., 2000; Sotelo et al., 1996). En México, es un padecimiento frecuente de alta endemicidad, donde las zonas de mayor seroprevalencia se encuentran en las regiones centro occidental y en el sureste del país. La localización del parásito en el sistema nervioso central de humanos es causa de neurocisticercosis (NC), enfermedad grave y frecuente en nuestro medio. La NC resulta así un problema de salud en países endémicos donde se reporta como la primera causa de la epilepsia en adultos (30-50%) y constituye la tercera causa más común de ingresos en el Hospital de Neurología en México (Sotelo and Del Bruto, 2000; Fleury et al., 2003; Sciutto et al., 2003).

Dado el impacto de esta enfermedad en la salud humana así como sus repercusiones socioeconómicas en la porcicultura en México, se han realizado estudios relacionados con aspectos clínicos y patológicos, así como con el diagnóstico, tratamiento y prevención.

Debido a las limitaciones para controlar la transmisión mejorando el nivel de vida de la población en países subdesarrollados, y considerando el papel indispensable del cerdo como hospedero obligatorio intermedio en el ciclo de vida de *T. solium* existe la posibilidad de interferir en la transmisión de la cisticercosis a través de la vacunación del cerdo (Nascimento et al., 1995; Molinari et al., 1997; Plancarte et al., 1999; Lightowlers et al., 1999, 2000; Sciutto et al., 1990, 2002). Considerando las dificultades económicas y experimentales que presenta la investigación con cerdos para la evaluación de inmunógenos de interés para el desarrollo de una vacuna, se ha empleado un modelo experimental de cisticercosis murina causada por el cisticerco de *Taenia crassiceps*, cestodo que presenta una estructura macroscópica similar y exhibe una extensa homología antigénica con *T. solium*. Ambos parásitos tienen un ciclo de vida similar (Figuras 1, 2) que incluye un hospedero cisticercoso intermedio y uno definitivo que porta el gusano. Los antígenos de ambos cestodos inducen inmuno-protección cruzada, es decir, los antígenos del cisticerco murino son capaces de proteger contra la cisticercosis porcina y viceversa (Sciutto et al., 1990a; Manoutcharian et al., 1995). Además, *Taenia crassiceps* se reproduce por gemación polar múltiple en la cavidad peritoneal de ratones de algunas semanas ofreciendo así una importante fuente de antígenos para vacunación obtenidos en condiciones experimentales controladas (Sciutto et al., 2002). De acuerdo a los estudios realizados por diferentes grupos de investigación (Sciutto et al., 1995; Lacleste et al., 2001; Rosas et al., 2002), este modelo ha resultado ser adecuado para avanzar en el conocimiento de los factores inmunológicos implicados en la cisticercosis e identificar antígenos de potencial interés para una vacuna contra la cisticercosis porcina.

La disminución de la incidencia de esta parasitosis en el cerdo a través de la vacunación parece ser una estrategia realista que ofrece ciertas ventajas ya que no requiere de modificar las condiciones socioeconómicas en las que subyace esta enfermedad; implica una disminución de pérdidas importantes al productor debidas a cerdos cisticercosos, además la posibilidad de éxito aumenta al estar dirigida a los cerdos cuya expectativa de vida es corta (aproximadamente 1 año) lo cual no demanda una respuesta inmune protectora de larga duración (Toledo, 2004).

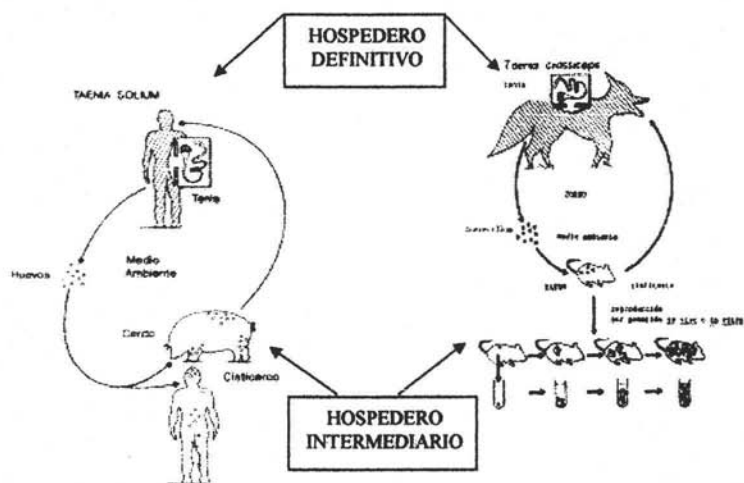


Figura 1. Ciclo de vida de *Taenia solium*

Figura 2. Ciclo de vida de *Taenia crassiceps*

3.1. Ciclo de vida de *T. solium*

El ciclo de vida de las especies de *Taenia* incluye dos hospederos mamíferos, un carnívoro u omnívoro como hospedero definitivo (humanos) y un herbívoro como hospedero intermedio (cerdo). El gusano o tenia se desarrolla en el lumen intestinal del hospedero definitivo tras la ingesta de cisticercos provenientes de carne de cerdo mal cocida o cruda. La tenia puede producir cientos de miles de huevos que contienen oncosferas que pasan a las heces humanas y que al ser ingeridas por el hombre y/o el cerdo, completan el desarrollo al estado larvario infectivo.

3.2. Fases del ciclo de vida de *T. solium*

3.2.1. Huevos

Los huevos son excretados en las heces de los portadores del gusano, antes o después de que los proglótidos maduros se liberen. Es la única fase del parásito que se puede encontrar en el medio ambiente, por lo que presenta una serie de envolturas protectoras. En el huevo maduro, la envoltura más externa se denomina vitelo o cápsula externa que rodea una estructura llamada

embrióforo. Éste consiste en una serie de tabiques proteicos unidos por una proteína cementante. El embrióforo se forma en el interior de una envoltura interna, que desaparece en el huevo maduro. La capa más interna (membrana oncosferal) envuelve directamente al embrión hexacanto maduro (oncosfera), que cuenta con tres pares de ganchos (Cruz-Revilla, 1999). Cuando el huevo es ingerido por el hombre y/o cerdo se produce la desintegración de la cápsula estimulando la actividad de los ganchos de la oncosfera. Posteriormente, las enzimas proteolíticas del hospedero actúan sobre el embrióforo, provocando la liberación de la oncosfera. Ésta penetra la pared intestinal mediante sus ganchos y secreciones líticas y, alcanza vasos sanguíneos y linfáticos, llegando así a cualquier tejido donde se desarrolla a cisticerco.

3.2.2. Cisticerco

El estado larvario (metacestodo o cisticerco), *Cysticercus cellulosae*, se desarrolla principalmente en el tejido conectivo del músculo de cerdos aunque también puede invadir otros órganos como son la piel, el cerebro y los ojos, en un tiempo aproximado de 2-3 meses. Puede permanecer en el cuerpo del hospedero por un periodo de 3-6 años, y en el cadáver hasta 6 semanas. La vesícula o bolsa alrededor del cisticerco es transparente y contiene fluido vesicular, dentro del cual se localiza el protoescólex invaginado (Swellengrebel, 1961). La pared de la bolsa consta de tegumento, subtegumento y parénquima. La superficie de la pared vesicular es la porción más expuesta, y a través de la cual se relaciona tanto metabólicamente como inmunológicamente con el huésped. El cisticerco carece de sistema digestivo (tiene un sistema de nutrición por difusión), posee una innervación extensa y en el parénquima se observan corpúsculos calcáreos, los cuales almacenan material orgánico como glucógeno y proteínas, y material inorgánico como calcio y fósforo.

3.2.3. La tenia

El estado adulto (tenia o gusano) ocurre cuando el humano ingiere al cisticerco, que es liberado de la carne de cerdo por la acción de las enzimas y sales biliares del aparato digestivo, produciendo el anclaje en la pared del intestino delgado.

T.solium es un helminto que se fija al intestino por medio del escólex, de forma cúbica, que presenta cuatro ventosas en las esquinas superiores y un rostelo redondeado con una doble corona de ganchos. El número de ganchos varía considerablemente entre 22-28 y se encuentran alternando ganchos largos de 160-180 μ con pequeños de 110-130 μ . Posteriormente al cuello, continúa el estróbilo de forma filiforme que se conforma por cientos de segmentos denominados proglótides, que van de anchos a cuadrados y largos durante su maduración y, llegan a medir hasta 9 metros (Swellengrebel, 1961). Cada proglótide madura es un órgano de reproducción independiente, en donde se lleva a cabo la fecundación y producción de miles de huevos; las proglótides terminales se separan frecuentemente del estróbilo y se expulsan con las heces o migran fuera del intestino (Craig y Fraust ,1984).

3.3. Patología y sintomatología

La mayoría de las infecciones asociadas al estado adulto no involucran manifestaciones graves. Los síntomas asociados con teniasis son frecuentemente leves y no específicos e incluyen manifestaciones como dolores abdominales, alteración del apetito, pérdida de peso, vómito, diarrea y constipación, o infecciones asintomáticas de larga duración. En casos muy raros, el escólex puede perforar la pared intestinal y provocar una peritonitis. Hacia el final del periodo de incubación hay una leucocitosis característica y se puede presentar una eosinofilia moderada. La primera señal patogénica es la liberación espontánea de proglótides y es el único método específico de diagnóstico. Este tipo de infecciones en los humanos a pesar de ser tratadas, pueden permanecer no detectables por periodos largos de tiempo (Hoberg, 2002).

La cisticercosis puede ser adquirida por personas que poseen el estado adulto en su intestino o por aquellos libres del helminto. En el primer caso, se infecta por oncosferas 1) por la ingesta de los huevos presentes en sus heces o 2) por huevos que son transportados del intestino al estómago o duodeno como consecuencia de peristaltismo inverso. En el otro caso, la enfermedad se adquiere por la ingesta de huevos provenientes de las heces de otra persona teniásica en alimentos o agua contaminada (Swellengrebel, 1961). Los síntomas que produce

varian de acuerdo con el número de parásitos y el tejido invadido. Su localización en cerebro, puede provocar su desarrollo en los ventrículos o en las cápsulas quísticas superficiales. La presencia de la larva en crecimiento provoca una secuencia típica de reacciones celulares locales, incluyendo infiltración de neutrófilos y eosinófilos, linfocitos, células plasmáticas y a veces células gigantes, seguidas por fibrosis y necrosis de la vesícula, con desintegración o calcificación eventual del cisticerco. La NC se manifiesta a través de una variedad de síntomas y niveles de severidad, desde formas subclínicas hasta dolores de cabeza, epilepsia, hidrocefalea e hipertensión intracraneal severa (Cao et al., 1997; Sciutto et al., 2000, 2003; Hoberg, 2002).

La heterogeneidad clínica asociada a esta parasitosis no permite en base a la sintomatología realizar el diagnóstico. Así, a nivel hospitalario el diagnóstico se realiza utilizando criterios imagenológicos en base a tomografías y resonancias magnéticas. Se consideran además como criterios complementarios la presencia de anticuerpos en suero y LCR (Sciutto et al., 2000, 2003; Fleury et al., 2003). La variación geográfica de cepas de *T.solium* puede influir en diferencias en el comportamiento, sitios de predilección y patología de la cisticercosis (Vega et al., 2003). En general, la NC predomina en Latino América y África (Sciutto et al., 2003), mientras que una combinación de cisticercosis subcutánea y neuronal ocurre en Asia (Hoberg, 2002).

3.4. Control sanitario

Diferentes estrategias se han considerado a fin de controlar la teniasis / cisticercosis por *T.solium*. Entre ellas destacan el mejoramiento de las prácticas sanitarias como son la provisión de letrinas, de drenaje y sistemas de agua potable así como programas de educación pública. Además, la terapia dirigida a cerdos e individuos portadores del gusano puede eliminar la fuente de éste; sin embargo, los portadores no desarrollan una inmunidad efectiva contra la re-infección por lo que requieren de tratamientos periódicos y existe el riesgo de transmisión debido a nuevos casos y/o inmigración de portadores del estado adulto.

Considerando al cerdo como hospedero intermedio, una forma de evitar la transmisión es a través de la inspección sanitaria para evitar el consumo de carne infectada. Estos programas han sido muy efectivos en Europa y han comenzado a aplicarse en Asia; sin embargo, en México no han podido aplicarse eficientemente, en donde continúa la matanza y consumo en medio rural sin inspección sanitaria, la falta de rastros suficientes o la existencia de rastros sin la infraestructura para la inspección adecuada de los canales o con prácticas corruptas, así como la venta clandestina de carne infectada para evitar el confinamiento (Plancarte et al., 1999; Sciutto et al., 2000, 2003).

4. ANTECEDENTES

Para tratar de controlar esta enfermedad, se han contemplado diferentes alternativas de prevención entre las que figuran:

1. El diseño y aplicación de campañas de educación y mejoramiento sanitario, considerando que esta parasitosis se arraiga en condiciones inadecuadas de higiene y educación (Keilbach et al 1989; Sarti et al., 1997; Vazquez-Flores et al., 2001).
2. El desarrollo de vacunas contra la cisticercosis porcina dirigidas a interferir en la transmisión considerando que el cerdo es el hospedero intermedio en el ciclo de vida de este parásito (Nascimento et al., 1995; Molinari et al., 1997; Plancarte et al., 1999; Lightowlers et al., 1999, 2000, 2003; Sciuotto et al., 1990, 2002).
3. Tratamiento masivo contra la teniasis (Pawlowski et al., 1990; Diaz et al., 1991; Schantz et al., 1993; Allan et al., 1997; Sarti et al., 2000; Coles, 2005)
4. Aumento de la resistencia genética del hospedero a través de transferencia de genes de resistencia (Fragoso et al., 1996, 1998).

Diferentes antígenos vacunales se han evaluado en contra de la cisticercosis porcina. Algunos de estos estudios han utilizado extractos antigénicos de excreción / secreción obtenidos a partir de cultivos de oncosferas (Pathak and Gaur, 1990), antígenos obtenidos directamente de oncosferas (Molinari et al., 1983), o de etapas tempranas de cisticercos de *T. solium* (Nascimento et al., 1995) o *T. crassiceps* (Sciuotto et al., 1995; Manoutcharian et al; 1996). Se ha enfatizado en el uso de antígenos expresados en etapas tempranas del parásito suponiendo que éstos son los estadios más vulnerables a la respuesta inmune.

Otra de las estrategias que se ha utilizado es la identificación de antígenos protectores basándose en la capacidad protectora observada en modelos experimentales. Se ha observado que tanto los antígenos de oncosferas como los de cisticercos de *T. solium* pueden conferir una buena protección contra especies homólogas y heterólogas de tenias (Sciuotto et al., 2000),

probablemente a consecuencia de la conservación de antígenos en las diferentes fases del parásito y entre diferentes especies de tenias (Gemmell, 1969; Larralde et al., 1989; Garcia-Allan et al., 1996; Lightowers et al., 1999). Utilizando el modelo murino, se identificaron los antígenos protectores presentes en un extracto antigénico total de cisticercos de *T. crassiceps* mediante una separación electroforética obteniéndose 12 fracciones antigénicas (8-220 kDa), las cuales fueron utilizadas para evaluar su capacidad protectora en ratones. De estas 12 fracciones sólo 8 mostraron un efecto significativo en la reducción de la carga parasitaria en ratones inmunizados con respecto a los controles. De éstos se seleccionaron sólo tres fracciones antigénicas (56, 66 y 74 kDa) para reevaluar su capacidad protectora basados en la mayor protección obtenida independiente de la dosis empleada. Los resultados mostraron que la inmunización con estas tres fracciones redujo significativamente la carga parasitaria al mismo tiempo que fueron reconocidos por sueros de humanos y cerdos infectados con cisticercos de *T. solium* (Valdez et al., 1994). Estas fracciones también fueron empleadas como inmunógenos en el cerdo, obteniéndose una disminución del 98% de parásitos, confirmando así su capacidad protectora.

Con el propósito de disponer de cantidades adecuadas de estas fracciones para su empleo en vacunación de tipo masivo, se decidió producirlos mediante técnicas de DNA recombinante seleccionándose las clonas que codifican para antígenos protectores en contra de la cisticercosis murina denominadas KETc1, KETc4, KETc7, KETc11 y KETc12 (Manoutcharian et al., 1995, 1996). Posteriormente, con base a las secuencias de los antígenos recombinantes denominados KETc1, KETc7 y KETc12, se procedió a identificar las secuencias inmunogénicas protectoras de éstos. Así se encontraron los epitopes GK1, KETc1 y KETc12, cuya capacidad protectora ha sido evaluada encontrándose diferentes niveles de protección contra la cisticercosis murina (Tabla 1 y 2, Toledo et al; 1999, 2001).

De acuerdo a estos hallazgos se desarrolló una vacuna contra la cisticercosis porcina. Esta vacuna (S3Pvac), está compuesta por tres péptidos de 8 (KETc12), 12 (KETc1) y 18 (GK1) aminoácidos, secuencias protectoras compartidos por *T. solium* y *T. crassiceps*.

Tabla 1. Efecto de la inmunización con tres péptidos inmunogénicos del antígeno protector recombinante KETc7 de *T. crassiceps* sobre la intensidad parasitaria

Grupo	Media \pm SD (no. de ratones sin cistis) ^a	
	No péptido	Péptido (μ g / ratón)
Control	14 \pm 8.19	50
Inmunizado con:		
GK-1	9.4 \pm 10.9 (0)	12.4 \pm 14.3 (1)
GK-2	13.0 \pm 7.9 (0)	9.2 \pm 4.9 (0)
GK-3	14.4 \pm 5.81 (0)	6.7 \pm 4.14 (0)

^a Intensidad parasitaria individual (i.e. número de cisticercos en cada ratón) en grupos de cinco ratones. Grupos de cinco ratones machos se inmunizaron con FCA (controles) o los péptidos indicados con FCA y desafiados 15 días después de la segunda inmunización. Treinta días después del desafío, los ratones se sacrificaron y la intensidad parasitaria se determinó.

^b Diferencia estadísticamente significativa entre los ratones controles e inmunizados a 95% intervalo de confianza (P<0.05)

Tabla 1. Tomado de Toledo et al., 1999

TABLA 1. Inmunidad protectora contra cisticercosis murina por inmunización con los péptidos KETc1 y KETc12

Grupo experimental	Resultado para experimento no.:					
	1		2		3	
	No. de cisticercos	Intensidad parasitaria	% Protección	No. de cisticercos	Intensidad parasitaria	% Protección
Controles Inmunizados con	55,48,40,43,47,46	46.5 (41.1-51.8)		27,24,20,21,29,20,24,27,34	25.1 (21.5-28.7)	
KETc1	0,0,10,36,10,19,13,18	11.5 (3.5-22.9)**	75.3	7,10,3,4,0,0,0,0,0	0 (-0.2-5.5)**	100
KETc12	16,0,35,40,25,22,0	22.0 (5.2-34.2)*	52.7	3,0,1,0,17,21,0,21,8	3 (0.8-1.5)**	88.1

* Número individual de cisticercos recuperados 30 días después de la infección de cada ratón

^b Mediana (95% intervalo de confianza) de la intensidad parasitaria en ratones control inyectados con o sin péptido. Diferencia estadísticamente significativa entre ratones control e inmunizados al 95% (*) o 99% (**)

^c Porcentaje de protección con respecto a los controles

Tabla 2. Tomado de Toledo et al., 2001

Estos péptidos han mostrado inducir altos niveles de protección contra la cisticercosis murina experimental y han sido identificados en todas las etapas de desarrollo de *T. solium*. El único estudio de evaluación de una vacuna contra cisticercosis en campo con base en necropsia lo constituye el realizado por Huerta et al., 2002. S3Pvac redujo un 52.6% la prevalencia de cisticercosis porcina y más significativamente, redujo un 98.7% la intensidad de la infección con cisticercos.

Este tipo de vacunas involucran péptidos que contienen epítopes capaces de inducir inmunidad protectora contra organismos infecciosos. Considerando la relevancia de disminuir los costos de su producción manteniendo o aumentando la capacidad protectora se han contemplado diferentes estrategias. Entre ellas destaca el uso de moléculas acarreadoras y adyuvantes.

Entre los sistemas propuestos en la literatura para presentación de antígenos al sistema inmune, destaca el empleo de virus que exhiben una superficie altamente organizada que despliega un arreglo regular de epítopes (VLP's), permitiendo una presentación específica de éstos a las membranas de los linfocitos T y B. Un ejemplo es el dominio S del virus de la hepatitis B expresado en levaduras, el cual permite altos niveles de anticuerpos contra HbsAg y es ampliamente empleado como vacuna contra la Hepatitis B. Sin embargo, la gran mayoría de las proteínas provenientes de patógenos son raramente usadas como vacunas. Además tiene como desventaja el limitado tamaño de los epítopes que pueden ser insertados ya que podrían afectar la estructura terciaria o el arreglo cuaternario de la proteína (Laplagne et al; 2004). En contraste con los cápsides virales, las proteínas bacterianas ocasionalmente tienen un arreglo cuaternario polimérico por lo que pocos antígenos bacterianos han sido propuestos como acarreadores en el desarrollo de vacunas. Las vacunas ampliamente usadas como el toxoide tetánico (TT) no han sido muy efectivas debido al fenómeno de supresión en el cual la inducción de una respuesta inmune contra un péptido sintético, conjugado a TT, se previene por una inmunidad preexistente a TT (Sciutto et al; 2002). Otra proteína de origen bacteriano que ha sido extensamente evaluado es la toxina de cólera (CT). Esta molécula acarreadora y

adyuvante ha sido sintetizada en sistemas virales y bacterianos y se ha empleado para la presentación de antígenos por diferentes estrategias de inmunización (Yu et al; 2001). La holotoxina o la subunidad B de cólera funcionan como potentes adyuvantes; además la fusión de pequeños antígenos a la subunidad B permiten una respuesta inmune sistémica y de las mucosas mediada por la vías Th1 o Th2 dependiendo del epítopo unido (Yu et al; 2001). Sin embargo, su uso como adyuvante y acarreador está limitado en humanos debido a su toxicidad en el sistema nervioso central.

Recientemente, se ha identificado a la enzima bacteriana lumazina sintetasa de *Brucella* *ssp.* cuyas propiedades fisicoquímicas la hacen un candidato prometedor como acarreadora de antígenos en el desarrollo de vacunas.

4.1. *Brucella* *ssp.* lumazina sintetasa (BLS)

4.1.1. Origen

Es una proteína citoplasmática, de 18kDa en su forma monomérica, presente en la fracción soluble de cepas lisas y rugosas del género *Brucella*. La evaluación de la respuesta inmune humoral de estas proteínas libres de lipopolisacáridos (LPS), por inmuno-absorción con un anticuerpo monoclonal anti-LPS (MAb BC68), ha sido de importancia en el inmunodiagnóstico de la brucelosis en humanos y animales (Goldbaum et al., 1992, 1993; Baldi et al., 1996). Las características fisicoquímicas de esta proteína han sido caracterizadas por los grupos de investigación del Dr. Goldbaum y el Dr. Hemmen (Hemmen et al., 1995; Goldbaum et al., 1993, 1999; Baldi et al., 2000).

Entre las propiedades principales de la proteína expresada en forma recombinante en *E.coli* como cuerpos de inclusión, figura la tendencia de agregarse en ausencia de condiciones reductoras debido a la presencia de un residuo de cisteína (Cys), que le permite formar un enlace disulfuro intermolecular. Por esta razón se realizó la alquilación del residuo libre de Cys, mediante un tratamiento con iodoacetamida, que permitió la obtención de una proteína soluble con un peso molecular de 90kDa (Goldbaum et al., 1999; Baldi et al., 2000). La proteína soluble

presentó propiedades antigénicas similares a la forma nativa. Aunque no se conoce la función de la BLS en su entorno original, la secuencia de aminoácidos mostró una homología con la estructura de enzimas con actividad de lumazina sintetasa presente en la biosíntesis bacteriana de la riboflavina, se le atribuyen funciones similares a su homólogo.

4.1.2. Estructura

Una de las características más distintivas de la enzima lumazina sintetasa (LS) es la divergencia estructural presente en diferentes especies. Los arreglos cuaternarios más comunes son las formas pentamérica e icosaédrica, pero prácticamente compuestos con la mismas unidades estructurales monoméricas. La estructura del monómero consiste en cuatro motivos repetidos de β -plegadas y α -hélices, que producen un sándwich en paralelo de las β -plegadas rodeadas por las α -hélices, dos a cada lado de la hoja β (Zylberman et al; Fornasari et al., 2004; Klinke et al., en prensa). Además presentan un sitio activo de estructura conservada en la interfase formada por dos monómeros adyacentes. La única diferencia estructural del sitio activo de BLS con respecto a la enzima de *B.subtilis* es la sustitución de un residuo fenilalanina por uno de triptófano (Baldi et al., 2000).

La lumazina sintetasa de *Brucella ssp.* presenta una estructura pentamérica (90kDa) en su forma nativa que difiere del arreglo icosaédrico macromolecular de la enzima de *B.subtilis*. La secuencia GT (o G) KAG de la cadena α -hélice, característica en las moléculas LS con arreglo icosaédrico, contribuye a las interacciones entre las hélices α -4 y α -5 de pentámeros cercanos. Mientras que las enzimas pentaméricas no contienen estos residuos de glicina. Estos residuos promueven una forma enrollada de la cadena dando una mayor estabilidad conformacional, por esta razón la hélice de BLS es continua (Baldi et al., 2000). La inserción en BLS de 3 residuos entre las hélices generan una vuelta más prolongada que permite la unión de la α -hélice con la hoja β contigua, permitiendo así un ensamblaje muy estable como dímero de pentámeros (Zylberman et al., 2004). La estructura tridimensional (Figura 3) muestra que los últimos 8-10 residuos amino terminales no son esenciales para el plegamiento general del

pentámero; debido a esta característica es posible crear proteínas quiméricas insertando péptidos en los residuos N-terminales sin dañar el plegamiento general, funcionando así como proteína acarreadora (Baldi et al., 2000; Laplagne et al 2004).



Figura 3. Arreglo cuaternario de lumazina sintetasa de *Brucella spp.* (BLS). (a) Se muestra la superficie de BLS que forma la interfase pentámero-pentámero. Los residuos de histidina están en rojo y los de fenilalanina en amarillo. Los extremos 5 C-terminal de las hélices 4 sobresalen en la periferia mientras que el círculo interno de histidina se mantiene en el centro, cercano al poro que pasa a través del centro del pentámero. (b) Representación esquemática de la forma pentamérica. Las α -hélices se representan con cilindros y las hojas β con flechas. (c) Representación de la estructura secundaria del monómero. (Tomado de Fornasari et al., Zylberman et al., 2004)

4.1.2.1. Estabilidad estructural

En estudios realizados por Zylberman et al., 2004, se evaluó la estabilidad termodinámica de BLS mediante la desnaturalización inducida por agentes químicos (urea y GdnHCl), pH y temperatura.

El tratamiento con gradientes ascendentes de urea no muestra cambios tanto en su estructura cuaternaria como en las terciaria y secundaria. Por otro lado, la GdnHCl (1.5-2.2 M) produce la disociación del decámero sin cambios estructurales en el sitio activo ($\Delta G = 90 \pm 20$ kJ/mol decámero). El empleo de GdnHCl en un rango 2.4-3.5M provoca la pérdida de las estructuras terciaria y secundaria de la proteína, aunada a la disociación del pentámero en 5 subunidades de 18 kDa ($\Delta G = 330 \pm 30$ kJ/mol pentámero). Este valor alto de la energía libre se debe a la naturaleza de la interfase entre monómeros, estabilizada por un gran número de fuerzas de Van der Waals resistente al efecto de pH ácido.

La disociación de BLS con un tratamiento de pH en el rango 6.0-4.0 es un proceso reversible que evita la exposición de los sitios hidrofóbicos y por lo tanto, cambios en la estructura secundaria. Este efecto se debe a la protonación de residuos de histidina (His) presentes en la interfase pentámero-pentámero, lo cual produce la repulsión con la subsecuente pérdida de contacto entre pentámeros. Mientras que el tratamiento bajo condiciones más ácidas (pH inferior a 4.0) implica la desnaturalización irreversible.

La desnaturalización térmica de la proteína se presenta entre 85-95°C ($T_m = 88 \pm 2^\circ\text{C}$); sin embargo, el tratamiento térmico bajo condiciones que producen sólo la disociación del decámero provocan un descenso de 20°C en la estabilidad térmica. Esto demuestra la contribución de la interfase pentámero-pentámero en la estabilidad de la lumazina sintetasa de *Brucella ssp.*

4.1.3. Propiedades inmunológicas

Esta enzima es una proteína altamente inmunogénica aún en ausencia de adyuvantes. Tiene el potencial de inducir una respuesta humoral prolongada debido al arreglo polimérico cuaternario que presenta su estructura (Goldbaum et al., 1993; Hemmen et al., 1995; Baldi et al., 1996; Letesson et al., 1997; Velikovskiy et al., 2002; Laplagne et al., 2004), y permite activar una respuesta celular mediante la vacunación con DNA. Los esplenocitos de ratones inmunizados con el vector expresando el gen BLS (pcDNA-BLS) produjeron IL-2 e IFN- γ tras la estimulación *in vitro* con BLS recombinante, sugiriendo así la presentación de células T CD8+ por la vía MHC clase I (Velikovskiy et al., 2002). Además se ha reportado a BLS capaz de inducir una respuesta Th1/Th2 en presencia de diversos adyuvantes (Velikovskiy et al., 2003). Por lo tanto, la construcción y expresión de proteínas quiméricas usando la estructura pentamérica de BLS como acarreadora y permitiendo la presentación al sistema inmune de péptidos vacunales de una manera pentavalente en el contexto de obtener una respuesta inmune altamente específica puede ser la base para el desarrollo de vacunas multi-epitopes (Baldi et al., 2000).

La existencia de un modelo experimental y de péptidos bien definidos que constituyen la vacuna contra la cisticercosis porcina nos ofrece la posibilidad de explorar otras alternativas en la forma de producción de antígenos y sistemas de presentación que permitan mejorar el costo / beneficio de ésta y otras vacunas.

Considerando las características inmunogénicas y estructurales que presenta la proteína lumazina sintetasa se ha producido satisfactoriamente la construcción quimérica BLS-KETc1, mediante la fusión de uno de los antígenos recombinantes (KETc1) que constituyen la vacuna contra cisticercosis a los 10 residuos amino terminales de BLS y expresada en *E. coli*. Por lo tanto, en el presente trabajo se pretende caracterizar la respuesta inmune asociada a la protección mediante la vacunación con BLS-KETc1, utilizando un modelo de cisticercosis murina.

5. OBJETIVOS

5.1. OBJETIVO GENERAL

- Evaluar las propiedades inmunogénicas del péptido vacunal KETc1 expresado en la proteína acarreadora bacteriana lumazina sintetasa en el modelo murino de cisticercosis por *Taenia crassiceps*

5.2. OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar la capacidad protectora inducida por el péptido KETc1 expresada en la proteína acarreadora bacteriana lumazina sintetasa en el modelo murino de cisticercosis
- Evaluar y caracterizar la respuesta inmune humoral y celular asociada a la inmunización con el péptido BLS-KETc1 en el modelo murino

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Procedimiento

Método de purificación de la proteína BLS

La proteína BLS expresada como cuerpos de inclusión en células transformadas de la cepa de *E.coli* BL21 se sometió a solubilización en buffer A (Tris 50mM, EDTA 5mM, urea 8M pH 8.0) toda la noche a temperatura ambiente y en agitación. El plegamiento de la proteína solubilizada se realizó mediante diálisis contra PBS con ditiotreitól (DTT) 1mM durante 72 horas. La purificación se realizó en una columna MonoQ en un aparato FPLC (Pharmacia, Uppsala, Sweden) con un gradiente lineal de buffer (Tris 50mM, NaCl 1M, pH 8.5). El pico de elución enriquecido con BLS se pasó a través de una columna Superdex-200 con buffer PBS, 1mM DTT. La pureza de la proteína BLS se determinó con un gel de poliacrilamida SDS 15%. Posteriormente se concentró (10mg/mL), se congeló en nitrógeno líquido y se almacenó a 20° C.

Inmunización de ratones

Para evaluar la respuesta humoral, grupos de 10 ratones hembras BALB/cAnN de 4 a 6 semanas de edad se inmunizaron vía subcutánea (s.c.) con 2.5 µg/ratón o 10 µg/ratón de KETc1 con saponina (100 µg/ratón) o con 50 µg/ratón de BLS-WT o BLS-KETc1 purificada o no purificada. La inmunización se aplicó dos veces en un intervalo de diez días y se procedió a sangrar a los animales por punción plexo ocular a los 15 días posteriores a la segunda inmunización. El suero fue almacenado a -70°C hasta su análisis. Además se incluyó un grupo de 10 ratones no inmunizados como control del experimento.

Técnica de ELISA para la detección de anticuerpos

Se sensibilizaron microplacas de 96 pozos con 20µg/mL del péptido sintético KETc1, o BLS-WT o BLS-KETc1 e incubaron toda la noche a 4°C. Para determinar los niveles de anticuerpos, las placas se incubaron con el suero diluido (1:100) en PBS-BSA 1%. Para detectar

la unión de inmunoglobulinas (Ig's) de ratón se empleó anti- IgG de ratón acoplada a fosfatasa alcalina en dilución 1:1000 durante 1 hora a 37°C, de acuerdo al procedimiento descrito por Toledo et al., 1999. El desarrollo de la actividad de la fosfatasa se realizó a temperatura de incubación empleando el sustrato p-nitrofenil fosfato disódico (Sigma Diagnostics, Poole Dorset, UK) en buffer de dietanolamina por 10 minutos. La reacción se detuvo con NaOH 2N. Finalmente, se midió la absorbencia a 405 nm en un lector de ELISA (Human Gessellschaft für Biochemica und Diagnostica, Taunusstein, Germany). Para el caso de los sueros de ratones inmunizados con BLS-WT o BLS-KETc1 no purificada, se emplearon diluciones (1:5000) siguiendo el procedimiento anterior.

Ensayo de proliferación

La evaluación de la respuesta celular se llevó a cabo por la técnica de proliferación de células en bazo. Todo el procedimiento se realizó en condiciones de esterilidad.

Los bazos de ratones BALB/cAnN inmunizados y no inmunizados se colectaron en condiciones asépticas 15 días después de la última inmunización. Los bazos se colocaron en 5mL de medio RPMI 1640 (Gibco, InVitrogen Co, Grand Island, NY) suplementado con L-glutamina (0.2mM), β mercaptoetanol (0.05mM), aminoácidos no esenciales (0.01mM), penicilina (100U/mL), estreptomycin (100 μ g/mL) y 10% de suero fetal bovino (FBS). Posteriormente se perfundieron y centrifugaron a 2500 rpm durante 10 minutos a 4°C, se tiró el sobrenadante y se resuspendieron en 3-5mL de solución hemolizante durante 10 minutos. Se adicionó medio RPMI en relación a 3 veces el volumen de la solución hemolizante empleada. Las células se cultivaron con medio RPMI, concanavalina A (ConA) (5 μ g/mL), BLS-WT o BLS-KETc1 purificada o no-purificada (50 μ g/mL) e incubaron en una atmósfera humidificada al 5% CO₂ en una concentración de 2X10⁵ células/200 μ L de volumen final. Después de 72 horas, se marcaron con 20 μ L de H³-metil timidina (Amersham Biosciences, UK) y se dejó transcurrir 18 horas para su cosecha. La cantidad de marcador incorporado fue medido en un

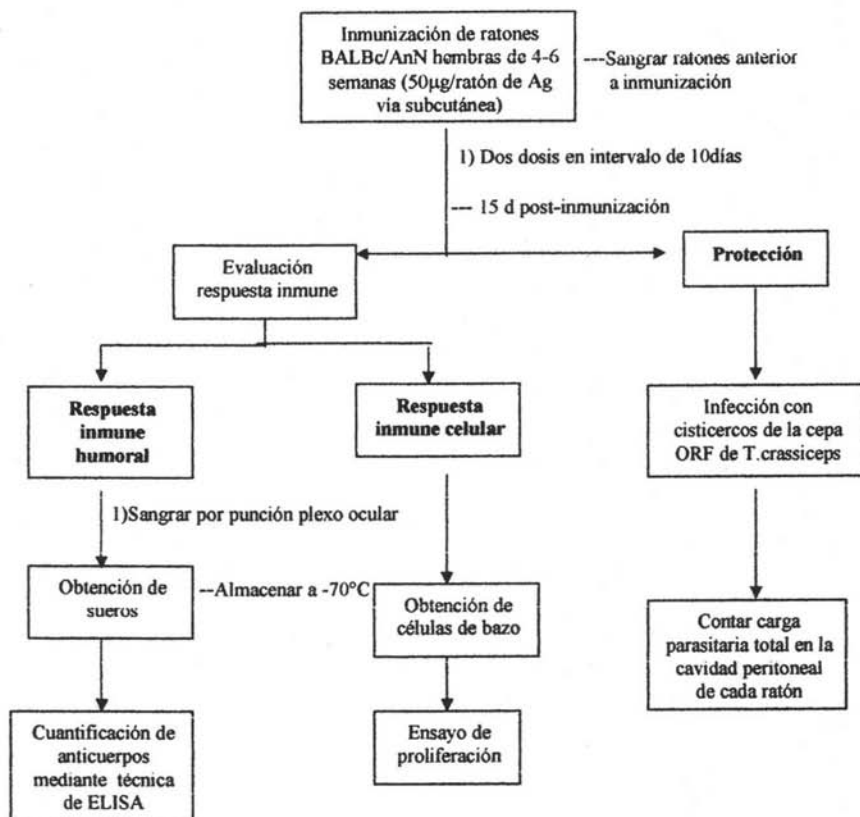
contador betaplate 1205 (Wallac Oy,Turku, Finland). Todos los ensayos se realizaron por triplicado en 3 ratones de cada grupo. Los datos están expresados como el conteo medio por minuto (cpm) y/o índices de estimulación (i.e., relación de la incorporación de timidina de cada una de las condiciones de estimulación con respecto al medio) para cada grupo experimental.

Infección de ratones

Los cisticercos de *Taenia crassiceps* de la cepa ORF, utilizados para la infección, se obtuvieron de la cavidad peritoneal de ratones hembras de la cepa Balb/cAnN, con una parasitosis de 1 a 3 meses. Los cisticercos han sido mantenidos por pases intraperitoneales sucesivos, durante 15 años en el Bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

Quince días después de la segunda inmunización, los ratones controles e inmunizados con KETc1, BLS-WT o BLS-KETc1 purificados o no purificados se infectaron vía intraperitoneal (i.p.) con 10 cisticercos (2mm de diámetro) no ramificados de *T.crassiceps* en PBS. Para determinar el nivel de protección se procedió al sacrificio de los ratones 30-60 días después de la infección y se prosiguió a contar la carga parasitaria de la cavidad peritoneal. Los órganos de la cavidad peritoneal de cada ratón se removieron e inspeccionaron cuidadosamente para detectar la presencia de cualquier larva de *T. crassiceps*.

6.2. Diseño Experimental



7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este trabajo de tesis se evaluaron las propiedades inmunogénicas del péptido KETc1 expresado en forma sintética y recombinante presentado en forma quimérica asociado a la proteína bacteriana BLS.

La respuesta inmune humoral asociada a estos inmunógenos se determinó por medio de la identificación de anticuerpos específicos en contra de la proteína acarreadora y del propio péptido (anti-BLS-WT o anti-KETc1) en los sueros de los ratones inmunizados utilizando la técnica de ELISA. Como se observa en la Tabla 3, la inmunización con KETc1 indujo anticuerpos -inmunoglobulinas G (IgG)- contra KETc1 que fueron únicamente detectados cuando se empleó BLS-KETc1 como fuente de antígeno en la placa de ELISA. Adicionalmente no se observaron diferencias entre las dos diferentes dosis de inmunógeno utilizadas (2.5 ó 10 µg/ratón). Además, la inmunización con BLS-KETc1 indujo anticuerpos reconocidos por BLS-WT y de manera más importante por BLS-KETc1, tal como se esperaba de acuerdo a los resultados obtenidos para el péptido KETc1. El uso de saponina como adyuvante no aumentó significativamente los niveles de IgG ni en los ratones inmunizados con BLS-KETc1 ni en los inmunizados con BLS-WT (Figura 1, artículo Apéndice I). La ausencia de detección de anticuerpos cuando el péptido KETc1 se utiliza solo como antígeno en la placa es posible que se deba a cambios conformacionales que modifiquen críticamente su antigenicidad como consecuencia de su reducido tamaño (12 aminoácidos).

Por otro lado, se demuestra la presencia de anticuerpos específicos contra KETc1 al utilizar BLS-KETc1 como antígeno mediante un ensayo de ELISA de inhibición previa absorción de los anticuerpos dirigidos contra BLS utilizando BLS-WT para su remoción (Figura 2, artículo Apéndice I).

Tabla 3. KETc1 es reconocido como antígeno cuando se expresa como proteína quimérica recombinante asociado a *Brucella* spp lumazina sintetasa (Tomado de Sciutto et al; 2005)

	Pre-inmunización	Post-inmunización con KETc1	
		2.5 µg/ratón	10 µg/ratón
Abs contra:			
KETc1	0.09 ± 0.02 ^a	0.093 ± 0.06 ^a	0.086 ± 0.03 ^a
BLS-WT	0.07 ± 0.03	0.050 ± 0.02 ^b	0.162 ± 0.05 ^b
BLS-KETc1	0.06 ± 0.01 ^a	0.580 ± 0.17 ^c	0.520 ± 0.12 ^c

Media ± SD del nivel de anticuerpos IgG (OD₄₀₅) de grupos de ocho ratones hembras BALB/cAnN inmunizadas con KETc1 y reaccionando con KETc1 o BLS-KETc1. Los datos con diferentes literales (^a, ^b, ^c) indican diferencias significativas (P < 0.01).

Considerando que la fase de purificación de la proteína quimérica aumenta de forma importante los costos de producción y que pudiera resultar innecesaria, se comparó la capacidad inmunogénica de la quimera purificada y no purificada. Se realizó la inmunización de los ratones con BLS-WT o BLS-KETc1 utilizando la proteína quimérica purificada (P) y no purificada (NP). Se observa la inducción de niveles detectables de anticuerpos contra los inmunógenos asociados a la placa (Figura 4). El empleo de BLS-WT o BLS-KETc1 (P o NP) como fuente de antígeno permite observar diferencias entre los ratones inmunizados y los controles. La Figura 4 (A-D), muestra que BLS-WT presenta diferencias entre la forma purificada y no purificada, siendo la forma no purificada la que presentó los niveles más altos de anticuerpos anti-BLS-WT en todos los casos. Este tipo de respuesta pudiera deberse a la presencia de lipopolisacáridos frecuente contaminante en proteínas recombinantes producidas en bacterias Gram negativas (Haslberger et al., 2000), que estimulen la respuesta inflamatoria aumentando la inmunogenicidad. Sin embargo, no se obtuvieron diferencias en los niveles de anticuerpos específicos anti-KETc1 de los animales inmunizados con BLS-KETc1 purificada y no purificada.

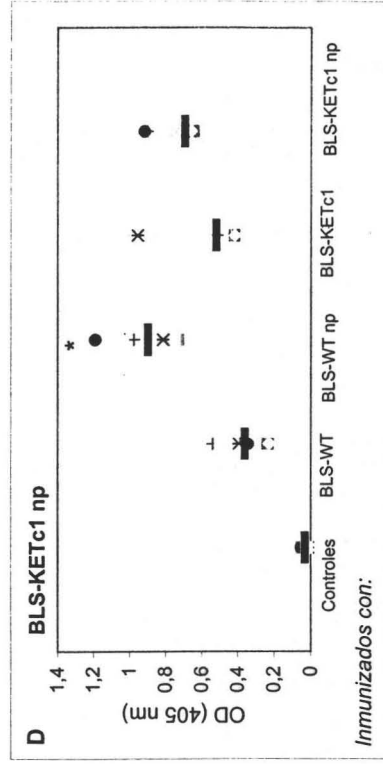
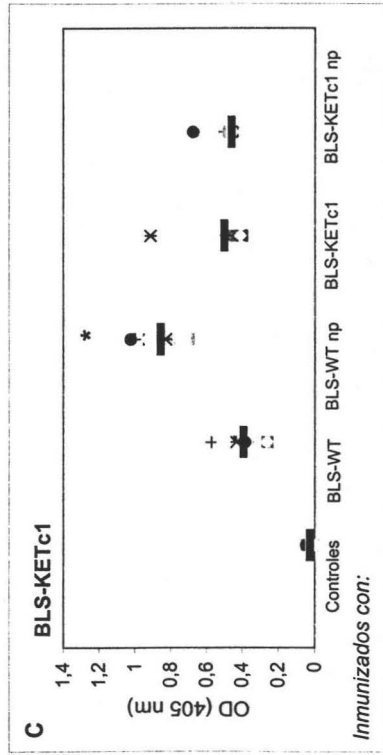
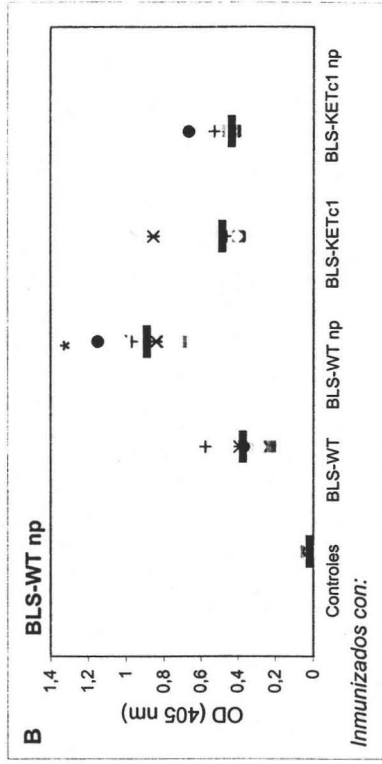
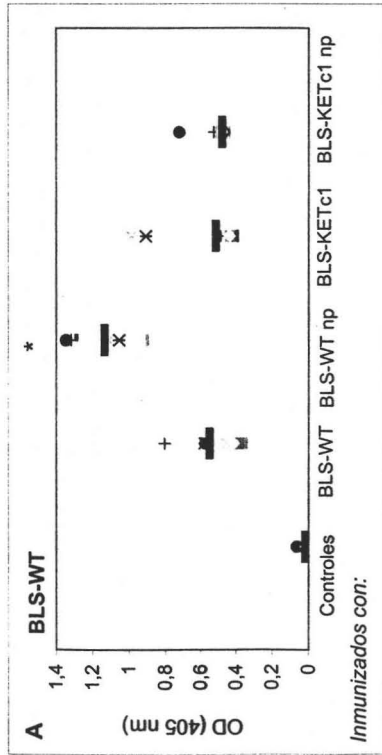


Figura 4. Niveles de anticuerpos determinados por ELISA en ratones hembras controles e inmunizados con los péptidos, reaccionando con los respectivos antígenos fijados a la placa BLS-WT (A-B) o BLS-KETc1 (C-D) purificada o no purificada. *Diferencia significativa ($p < 0.05$, Test Tukey) entre los grupos inmunizados. — Media

Otro propósito del estudio fue determinar las propiedades inmunogénicas de KETc1 en la quimera. Al respecto de la respuesta de anticuerpos observamos que la expresión de KETc1 en BLS permite conservar su inmunogenicidad.

Si bien existe correlación entre el grado de repetitividad y organización de un antígeno y la eficacia en la inducción de una respuesta inmune por células B, la naturaleza polimérica de BLS pudiera explicar la respuesta humoral obtenida. Al mismo tiempo, su estructura cuaternaria implica una mayor estabilidad que podría estar confiriendo a KETc1, incrementando así su tiempo de residencia *in vivo* y de esta manera inducir eficientemente la estimulación específica de los linfocitos B por el antígeno (Goldbaum et al; 1999, Laplagne et al; 2004). Es también factible que la capacidad inmunogénica de la proteína BLS per se (Goldbaum et al; 1993, Hemmen et al; 1995, Baldi et al; 1996, Letteson et al; 1997, Laplagne et al; 2004) permita mejorar la inmunogenicidad sistémica y oral del péptido (Rosas et al., sometido a publicación) además de su capacidad de activar células dendríticas recientemente reportada (De Pablo et al., en proceso).

El desarrollo de una respuesta humoral por el empleo de BLS-KETc1 como inmunógeno podría ser de relevancia considerando la posible importancia de la participación de los anticuerpos en la destrucción de los estados larvarios tempranos (Díaz et al., 2003). Además la capacidad para interferir en el desarrollo de cisticercos de *T. solium* al estado larvario (García et al., 2001) se ha visto mediado por un aumento en las inmunoglobulinas inducido por la inmunización con GK1 tanto en ratones (Toledo, 1999) como en cerdos (Díaz et al., 2003).

Resulta además relevante la potenciación de la respuesta proliferativa linfocitaria inducida por la quimera respecto al péptido utilizado en forma sintética. Se ha reportado la participación de mecanismos dependientes de células para conferir inmunidad en la cisticercosis experimental por *T. crassiceps*. La respuesta celular inducida por la infección se ha reportado capaz de controlar la cisticercosis murina en etapas tempranas a través de la vía Th1 (Bojalil et

al., 1993; Terrazas et al., 1999). En este trabajo comenzamos la exploración de la participación de células T mediante estudios de proliferación celular *in vitro* de los esplenocitos de ratones control e inmunizados con KETc1, BLS-WT o BLS-KETc1 por vía subcutánea. Como se ilustra en la Tabla 4, se observa un aumento significativo de la proliferación linfocitaria inducida por el antígeno BLS-KETc1 en células de los ratones inmunizados con los distintos péptidos. En particular es de relevancia la observada en las células provenientes de ratones inmunizados con KETc1 como péptido, considerando que en este grupo los niveles proliferativos se consideran específicamente inducidos por el péptido. Mayores niveles proliferativos se encontraron cuando BLS-KETc1 se utilizó como inmunógeno aún restando la proliferación inducida por BLS. Estos resultados indican que el péptido expresado en la quimera es capaz de aumentar la capacidad inmunogénica celular así como la capacidad de estimulación *in vitro*. Si bien no se cuantificaron citocinas en este trabajo de tesis, la respuesta proliferativa podría estar mediada por la secreción de interleucina 2 (IL-2) durante el reconocimiento antigénico de BLS-KETc1 por células T específicas considerando la relevancia de esta citocina en la proliferación celular así como resultados previamente publicados realizados específicamente utilizando GK1 como inmunógeno tanto en el cerdo como en el ratón (Díaz et al 2003; Toledo et al., 1999,2001).

Tabla 4. Proliferación <i>in vitro</i> de esplenocitos inducida por el péptido KETc1 expresado como proteína quimérica recombinante usando <i>Brucella</i> spp lumazina sintética (Tomado de Scitutto et al; 2005)				
Tratamiento <i>in vitro</i>	Inmunizado con:			
	Saponina	BLS-WT	KETc1	BLS-KETc1
Medio	104 ± 126	229 ± 136	179 ± 119	153 ± 54
KETc1	281 ± 188	950 ± 593	114 ± 25	272 ± 220
BLS-WT	155 ± 461	5989 ± 1204*	656 ± 130	2659 ± 506
BLS-KETc1	308 ± 461	2103 ± 1139*	3144 ± 81*	8922 ± 4759*

Media ± SD de incorporación de [3H] TdR (cpm) después de la estimulación *in vitro* de esplenocitos de ratones BALB/cAnN controles e inmunizados. Los datos son representativos de tres experimentos realizados individualmente. *Incremento significativo de la capacidad proliferativa (P<0.05).

Al respecto de la purificación de BLS-KETc1 y la respuesta celular inducida se observó que tanto BLS-WT no purificada como BLS-KETc1 inducen una mayor capacidad proliferativa (Tabla 5) con respecto a BLS-WT. La diferencia en el incremento obtenido para el primer caso, puede atribuirse a la participación de los lipopolisacáridos en la estimulación de monocitos / macrófagos que promuevan una respuesta mediada por linfocitos T (Haslberger et al., 2000). La diferencia obtenida para la estimulación con BLS-KETc1 puede explicarse por el efecto del péptido KETc1 fusionado a BLS.

Tabla 5. Proliferación *in vitro* de esplenocitos inducida por KETc1 expresada como proteína quimérica recombinante asociada a *Brucella spp* lumazina sintetasa

Tratamiento <i>in vitro</i> :	Grupo experimental ^a						
	Controles	Inmunizados con:					
		Saponina	KETc1 + Saponina	BLS-WT purificada	BLS-WT no purificada	BLS-KETc1 purificada	BLS-KETc1 no purificada
BLS-WT purificada	0.6 ± 0.1	1.2 ± 0.5	1.1 ± 0.4	2.2 ± 0.1	0.6 ± 0.2	2.3 ± 0.2	0.9 ± 0
BLS-WT no purificada	0.9 ± 0.3	6.0 ± 3.7	3.6 ± 2.5	10.6 ± 1.1*	1.3 ± 0.1	11.8 ± 1.1 ^(a,c)	1.7 ± 0.2*
BLS-KETc1 purificada	2.7 ± 0.7*	5.0 ± 2.2	3.5 ± 1.7	1.5 ± 0.2	3.7 ± 0.3*	8.5 ± 0.3 ^(a)	1.5 ± 0.2*
ConA	224.4 ± 5.8	558.4 ± 133.9	214.8 ± 216.9	1367.6 ± 53.5	104.2 ± 105.8	520.2 ± 37.4	388.3 ± 26.7

^a Media ± SD de incorporación de [3H]Timidina (ie) después de la estimulación *in vitro* en células de bazo provenientes de ratones Balb/cAnN controles e inmunizados. Los datos son representativos de tres experimentos realizados separadamente

* Incremento significativo de la capacidad proliferativa (p<0.05)

En este estudio sólo se determinó la capacidad proliferativa de las células de bazo y queda aún por evaluar el perfil de citocinas que nos permita correlacionar la respuesta humoral y celular obtenida. Sin embargo, considerando los estudios previos realizados por Toledo et al; 2001, Velikovsky et al; 2002, se esperaría un patrón de citocinas con niveles aumentados de IFN- γ e IL-2 asociados al desarrollo de una respuesta de tipo Th1. Este perfil es el que se observa en infecciones tempranas como un mecanismo capaz de limitar el establecimiento y reproducción del parásito (Díaz et al., 2003). De esta manera, el uso de BLS como acarreador puede permitir la presentación al sistema inmune de otros péptidos, mejorando la inmunogenicidad de éstos ya sea incrementando su tamaño o proporcionando epitopes estimuladores de células T.

Al respecto de la capacidad protectora de los ratones inmunizados bajo las diferentes condiciones experimentales se encontró que el péptido KETc1 expresado en la proteína quimérica BLS indujo niveles de protección similares a la del péptido sintético (73 vs 74%, respectivamente). Además se encontró que BLS-WT induce protección significativa debido posiblemente a una respuesta inmune innata capaz de inducir un incremento en la resistencia a esta parasitosis (Tabla 6). Esta posibilidad está sustentada por resultados recientes donde se observó a BLS capaz de activar células dendríticas a través de TLR4 (Berguer, sometido a publicación).

Tabla 6. Capacidad protectora inducida por KETc1 expresada como proteína quimérica recombinante usando <i>Brucella spp</i> lumazina sintética (Tomado de Sciutto et al; 2004)		
No inmunizados	433 ^a , 488, 491, 511, 529, 535, 624, 642	
	532 ± 68^b	
Inmunizados con:		
KETc1	2,3, 47, 99, 104, 108, 155, 165, 208, 214, 238, 317	74 % ^c
	138 ± 96^a	
BLS-WT	153, 156, 161, 189, 200, 220, 225, 272, 296, 313, 322	57 %
	228 ± 64^a	
BLS-KETc1	0, 0, 41, 108, 113, 162, 198, 208, 228, 253, 294	73 %
	146 ± 102^a	
^a Número individual de cisticercos recuperados 60 días después de la infección de cada ratón.		
^b Media ± SD.		
^c Porcentaje de protección con respecto a los controles. *Diferencia estadísticamente significativa entre los ratones control e inmunizados (prueba <i>t</i> -student).		

Resultados recientes sugieren el requerimiento de la purificación de la quimera para la inducción de protección contra la cisticercosis. Sin embargo, estos resultados son preliminares y requieren de experimentos adicionales para determinar si la purificación de la quimera es necesaria para inducir protección en contra de la cisticercosis murina.

Al respecto de la variación en la cantidad de parásitos en los grupos experimentales cabe mencionar que es una observación previamente reportada por nuestro grupo en este modelo experimental de cisticercosis. Experimentos realizados en el laboratorio indican que en

estas diferencias podrían participar factores asociados a la heterogeneidad en la infectividad de cada parásito inoculado.

Los resultados encontrados con respecto a la inmunogenicidad del péptido KETc1 expresado en la quimera representan además un avance importante al respecto específicamente de la vacuna contra la cisticercosis. Los resultados obtenidos en este estudio señalan el interés de evaluar la inmunogenicidad de BLS-KETc1 no purificada considerando que su empleo sin el paso previo de purificación permitiría disponer de un potente inmunógeno capaz de ser producido a bajos costos en cultivos bacterianos de sencillo escalamiento.

8. CONCLUSIONES

En este trabajo de tesis se obtuvieron los resultados que permiten proponer a la proteína bacteriana "*Brucella spp* lumazina sintetasa" como una molécula adecuada para la presentación de antígenos vacunales. Esta propuesta está basada comparando las propiedades inmunogénicas del péptido sintéticamente producido y expresado en forma quimérica asociado a la proteína BLS utilizando un modelo experimental murino de cisticercosis.

Entre las principales conclusiones figuran:

1. El péptido KETc1 expresado en BLS protege en contra de la cisticercosis murina por *Taenia crassiceps*. La inmunización con BLS-KETc1 purificada indujo un índice de protección de 73%, similar al nivel de protección obtenido utilizando KETc1 como inmunógeno.
2. La inmunización con la quimera BLS-KETc1 aumenta la antigenicidad del péptido KETc1, permitiendo la detección de anticuerpos específicos contra KETc1.
3. Los niveles de anticuerpos son similares en la inmunización tanto con la forma purificada y no purificada de BLS-KETc1.
4. Se observó una alta respuesta proliferativa en las células de los ratones inmunizados estimulados *in vitro* con BLS-KETc1 en niveles que no difieren significativamente si la quimera fue o no purificada previamente a la inmunización.

El uso de la BLS como proteína acarreadora ofrece la posibilidad de producir la vacuna con sistemas bacterianos de expresión de bajo costo relativos a la producción en forma sintética sin modificar su capacidad protectora cuando es administrada por vía subcutánea y sin requerir el uso de adyuvantes adicionales. Estas observaciones enfatizan el interés de BLS como proteína acarreadora y ofrecen nuevas posibilidades en vacunas contra la cisticercosis.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Allan J.C., Velasquez-Tohom M, Fletes C., Torres-Alvarez R., Lopez-Virula G., Yurrita P., Soto de Alfaro H., Rivera A., Garcia-Noval J (1997). Mass chemotherapy for intestinal *Taenia solium* infection: effect on prevalence in humans and pigs. *Trans R Soc Trop med Hyg.* 91:595-8
- Audibert F., Jolivet M., Chedid L., Arnon R and Sela M (1982). Successful immunization with a totally synthetic diphtheria vaccine. *Proc Natl Acad Sci USA.* 79(16):5042-5046
- Arnon R and Regenmortel V (1992). Structural basis of antigenic specificity and design of new vaccines. *FASEB J.* 6:3265-3274
- Baldi PC, Velikovskiy CA, Braden, et al (2000) Structural, functional and immunological studies on a polymeric bacterial protein. *Braz J Med Biol Res.* 33(7):741-748.
- Baldi PC., Giambartolomei G., Goldbaum F., Abdón L., Velikovskiy L, et al (1996). Humoral immune response against LPS and cytoplasmic proteins of *Brucella abortus* in cattle vaccinated with *B.abortus* S19 or experimentally infected with *Yersinia enterocolitica* 0:9. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology.* 3(4): 472-476
- Braden B.C., Velikovskiy C.A., Cauerhff A., Polikarpov I. and Goldbaum F.A (2000). Divergence in macromolecular assembly: X-ray crystallographic structure analysis of lumazine synthase from *Brucella abortus*. *Journal of Molecular Biology.* 297:1031-1036
- Brown, F.J. (1990). The potential of peptides as vaccines. *Semin Virol.* 1:67-74
- 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
- Cao W., Van der Ploeg C.P.B., Xu J., Gao C., Ge L and Habbema J.D.F. (1997). Risk factors for human cysticercosis morbidity: a population-based case-control study. *Epidemiol. Infect.* 119:231-235
- Chavarria A, Roger B, Fragoso G, Tapia G, Fleury A, Dumas M, Dessein A, Larralde C, Sciutto E (2003). TH2 profile in asymptomatic *Taenia solium* human neurocysticercosis. *Microbes Infect.* 5(12):1109-15
- Coles GC (2005). Anthelmintic resistance--looking to the future: a UK perspective. *Res Vet Sci.* 78(2):99-108.
- Craig and Fraust. *Parasitología Clínica.* Salvat Editores. Barcelona 1984. p.p.530-536

- Cruz-Revilla C. (1999). Evaluación de las posibilidades de la inmunización con DNA en la cisticercosis experimental murina. Tesis. Facultad de Ciencias. UNAM. México
- Daniell H, Muthukumar B, Lee SB. (2001). Marker free transgenic plants: engineering the chloroplast genome without the use of antibiotic resistance genes. *Curr Genet.* 39:109-16.
- De Berardinis P., Sartorius R., Fanutti C., Perham R.N., Del Pozzo G and Guardiola J (2000). Phage display of peptide epitopes from HIV-1 elicits strong cytolytic responses. *Nature Biotechnology* 18:873-876
- Diaz A., Villalobos N., Aluja A., Rosas G., Gómez-Conde E., Hernández P., Larralde C., Sciutto E and 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. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 93:81-90
- Diaz-Camacho S.P., Candil Ruiz A., Suate Peraza V., Zazueta Ramos M.L., Felix Medina M., Lozano R. and Willms K (1991). Epidemiologic study and control of *Taenia solium* infections with praziquantel in a rural village of Mexico. *Am J Trop Med Hyg.* 45:522-532
- Firat H, Garcia-Pons F, Tourdot S, et al (1999). H-2 Class I knockout, HLA-A2.1-transgenic mice: a versatile animal model for preclinical evaluation of antitumor immunotherapeutic strategies. *Eur J Immunol.* 29:3112-21.
- Fleury A, Gomez T, Alvarez I., Meza D., Huerta M., Chavarria A., Carrillo Mezo R.A., Lloyd C., Desein A., Preux P.M., Dumas M., Larralde C., Sciutto E., and Fraoso G (2003). High prevalence of calcified silent neurocysticercosis in a rural village of Mexico. *Neuroepidemiology.* 22(2): 139-145.
- Fleury A, Desein A, Preux PM, Dumas M, Tapia G, Larralde C, Sciutto E (2004). Symptomatic human neurocysticercosis-age, sex and exposure factors relating with disease heterogeneity. *J Neurol.* 251(7):830-7
- Fragoso G, Lamoyi E, Mellor A, Lomeli C, Govezensky T, Sciutto E (1996). Genetic control of susceptibility to *Taenia crassiceps* cysticercosis. *Parasitology.* 112 (Pt 1):119-24
- Fragoso G, Lamoyi E, Mellor A, Lomeli C, Hernandez M, Sciutto E (1998). Increased resistance to *Taenia crassiceps* murine cysticercosis in Qa-2 transgenic mice. *Infect Immun.* 66(2):760-4
- Fornasari M.S., Laplagne D.A., Frankel N., Cauerhff A., Goldbaum F.A. and Echave J (2004). Sequence Determinants of Quaternary Structure in Lumazine Synthase. *Mol Biol Evol.* 21(1):97-107
- Garcia-Allan C, Martinez N, Flisser A, Aluja A, Allan JC, Craig PS (1996). Immunocharacterization of *Taenia solium* oncosphere and metacestode antigens. *J Helminthol.* 70(4):271-80.

- Garcia G., Sciutto E., Fragoso G., Cruz-Revilla C., Toledo C., Villalobos N., Flores I., Aluja A and Larralde C (2001). Inhibitory role of antibodies in the development of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* toward reproductive and pathogenic stages. *Journal of Parasitology* 87(3):582-586
- Gemmell MA (1969). Immunological responses of the mammalian host against tapeworm infections. XI. Antigen sharing among *Taenia pisiformis*, *T. hydatigena*, and *T. ovis*. *Exp Parasitol.* 26(1):67-72.
- Goldbaum F., Rubbi C., Wallach J., Miguel S., Baldi P. and Fossati C (1992). Differentiation between active and inactive human brucellosis by measuring antiprotein humoral immune responses. *Journal of Clinical Microbiology* 30(3):604-608
- Goldbaum F., Leoni J., Wallach J and Fossato C (1993). Characterization of an 18-kilodalton *Brucella* Cytoplasmatic protein which appears to be a serological marker of active infection of both human and bovine brucellosis. *Journal of Clinical Microbiology.* 31(8): 2141-2145
- Goldbaum F.A., Polikarpov I., Cauerhff A., Velikovskiy C.A., Braden B.C. and Poljak R.J (1998). Crystallization and preliminary X-ray analysis of the lumazine synthase from *Brucella* spp. *J. Struct. Biol.*, 123, 175-178
- Goldbaum F., Velikovskiy C., Baldi PC., Mörtl S., Bacher A and Fossati C (1999). The 18-kDa cytoplasmatic protein of *Brucella* species – an antigen useful for diagnosis – is a lumazine synthase. *J. Med. Microbiol.* 48: 833-839
- Haslberger A.G., Kohl G., Felnerova D., Mayr U.B., Lubitz W (2000). Activation, stimulation and uptake of bacterial ghosts in antigen presentation cells. *Journal of Biotechnology* 83:57-66
- Hernández M, Cabrera-Ponce JL, Fragoso G, López-Casillas F, León-Ramírez C., Sanchez-García G, Guevara A, Toledo A, Cervantes J, Cruz C, Acero G, Bojalil R, Herrera-Estrella L and Sciutto E. A new highly effective transgenic papaya-based anticysticercosis vaccine Sometido a publicación
- Hemmen F., Weynants V., Scarcez T., Letteson J.J. and Saman E (1995). Cloning and sequence analysis of a newly identified *Brucella abortus* gene and serological evaluation of the 17-kilodalton antigen that it encodes. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology.* 2(3): 263-267
- Hilleman M.R. (1998). Six decades of vaccine development-a personal history. *Nature Med.* 4:507-514
- Hoberg Eric (2002). *Taenia* tapeworms: their biology, evolution and socioeconomic significance. *Microbes and Infection* 4:859-866
- Huerta M., Aluja A., Fragoso G., Toledo A., Villalobos A., Hernández M., Gevorkian G., Acero G., Diaz A., Alvarez L., Avila R., Beltrán C., Garcia G., Martinez J.J., Larralde C and Sciutto E (2002). Synthetic peptide vaccine against *Taenia solium* pig cisticercosis successful vaccination in a controlled field trial in rural México. *Vaccine.* 2793: 1-5.

- Kapusta J., Modelska A., Figlerowicz M., et al (1999). A plant derived edible vaccine against hepatitis B virus. *FASEB J* 13:1796-1799
- Keilbach N.M., de Aluja A.S., Sarti-Gutierrez E (1989). A programme to control taeniasis-cysticercosis (*Taenia solium*):experiences in a Mexican village. *Acta Leidensia* 57:181-9
- Klinke S., Zylberman V., Vega D., Guimaraes B., Braden B. and Goldbaum F (2005). Crystallographic studies on decameric *Brucella* spp. Lumazine synthase: a novel quaternary arrangement evolved for a new function? *J. Mol. Biol.* (en prensa)
- Kong Q., Richter L., Thanavala Y., Yu FY., Arntzen CJ., Mason HS (2001). Oral immunization with hepatitis B surface antigen expressed in transgenic plants. *PNAS* 98:11539-44
- Laplagne D.A., Zylberman V., Ainciart N., Steward M.W., Sciutto E., Fossati C.A. and Goldbaum F (2004). Engineering of a polymeric bacterial protein as a Scaffold for the multiple display of peptides. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics.* 57: 820-828
- Laralde C., Montoya RM, Sciutto E, Diaz ML, 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(3):282-90.
- Leclerc C. and Ronco J (1998). New approaches in vaccine development. *Immunol Today.* 19(7):300-302
- Letteson J.J., Tibor A., Eynde G., Wansard V., Weynants V., Denoel P and Saman E (1997). Humoral immune responses of *Brucella*-infected cattle, sheep, and goats to eight purified recombinant *Brucella* proteins in an indirect enzyme-linked immunosorbent assay. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology.* 4(5): 556-564
- Lightowlers M.(1999). Eradication of *Taenia solium* cysticercosis: a role for vaccination of pigs. *International Journal of Parasitology* 29:811-817
- Lightowlers M., Flisser A., Gauci C.G., Heath D.D., Jensen O. and Rolfe R (2000). Vaccination Against cysticercosis and Hydatid Disease. *Parasitology Today* 16(5):191-196
- Ma JKC. (2001). Genes, greens and vaccines. *Nature Biotechnol* 18:1141-2
- Malik P and Perham R.N(1997). Simultaneous display of different peptides on the surface of filamentous bacteriophage. *Nucleic Acids Research* 25(4):915-916
- Manoutcharian K., Laralde C., Aluja A., Fragoso G., Rosas G., Hernández M., Villalobos N., Rodarte L.F., Govezensky T., Baca M. and Sciutto E. (1995) Advances in the development of a recombinant vaccine against *Taenia solium* pig cysticercosis. *Vaccine* 95. Cold Spring Harbor. P.63.

- Manoutcharian K, Rosas G, Hernández M, Fragoso G, Aluja A, Villalobos N, Rodarte L.F., Sciuotto E (1996). Cisticercosis: Identification and cloning of protective recombinant antigens. *J Parasitol.* 82: 250-254
- Manoutcharian K., Terrazas I., Gevorkian G., Acero G., Petrossian P., Rodriguez M. and Govezensky T (1999). Phage-displayed T-cell epitope grafted into immunoglobulin heavy-chain complementary-determining regions: an effective vaccine design tested in murine cisticercosis- *Infection and Immunity* 67(9):4764-70
- Manoutcharian F., Gevorkian G., Cano A. and Almagro J.C (2001). Phage displayed biomolecules as preventive and therapeutic agents. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 2:217-223
- Manoutcharian K., Diaz-Orea A., Gevorkian G., Fragoso G., Acero G., Gonzalez E., de Aluja A., Villalobos N., Gomez-Conde E., Sciuotto E (2004). Recombinant bacteriophage-based multi-epitope vaccine against *Taenia solium* pig cisticercosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 99:11-24
- Maravilla P, Souza V, Valera A, Romero-Valdovinos M, Lopez-Vidal Y, Dominguez-Alpizar JL, Ambrosio J, Kawa S, Flisser A (2003). Detection of genetic variation in *Taenia solium*. *J Parasitol.* 89(6):1250-4
- Molinari J.L. et al (1983). *Taenia solium*: immunity in hogs to the cysticercus. *Exp. Parasitol.* 55:340-357
- Molinari J.L., Rodriguez D., Tato P., Soto R., Arechavaleta F. and Solano S (1997). Field trial for reducing porcine *Taenia solium* cisticercosis in Mexico by systematic vaccination of pigs. *Vet Parasitol.* 69(1-2):55-63
- Nascimento E; Costa J.O; Guimaraes M.P; Tavares C.A. (1995). Effective immune protection of pigs against cisticercosis. *Vet Immunolomunol Immunopathol.* 45:127-137
- Nieba L., Bachmann M.F (2000). A new generation of vaccines. *Modern Aspects Immunobiol.* 1(2):36-39
- Pawlowski Z.S. (1990). Efficacy of low doses of praziquantel in taeniasis. *Acta Trop.* 48:83-8
- Pathak K.M.L. and Gaur S.N.S. (1990). Immunization of pigs with culture antigens of *Taenia solium*. *Vet.Parasitol.* 34:353-356
- Plancarte A. et al (1999). Vaccination against cisticercosis in pigs using native and recombinant oncosphere antigens. *Int.J. Parasitol.* 29:643-647
- Rosas G, Fragoso G, Garate T, Hernandez B, Ferrero P, Foster-Cuevas M, Parkhouse RM, Harrison LJ, Briones SL, Gonzalez LM, Sciuotto E (2002). Protective immunity against *Taenia crassiceps* murine cisticercosis induced by DNA vaccination with a *Taenia saginata* tegument antigen. *Microbes Infect.* 4(14):1417-26

- Rosas G, Fragoso G, Ainciart N, Esquivel-Guadarrama F, Ramírez-Pliego O, Santana A, Toledo A, Cruz-Revilla C, Meneses G, Bobes R, Berguer P, Goldbaum F, and Sciutto E. *Brucella* spp. lumazine synthase: A novel adjuvant and antigen delivery system to effectively induce oral immunity. *Microbes and Infection*. Sometido a publicación.
- Sala F., Rigano M., Barbante A., Basso B., Walmsley A., Castiglione S (2003). Vaccine antigen production in transgenic plants: strategies, gene constructs and perspectives. *Vaccine* 21:803-808
- Sarti E, Flisser A, Schantz PM, Gleizer M, Loya M, Plancarte A, Avila G, Allan J, Craig P, Bronfman M, Wijeyaratne P (1997). Development and evaluation of a health education intervention against *Taenia solium* in a rural community in Mexico. *Am J Trop Med Hyg.* 56(2):127-32.
- Sarti E, Schantz PM, Avila G, Ambrosio J, Medina-Santillan R, Flisser A (2000). Mass treatment against human taeniasis for the control of cysticercosis: a population-based intervention study. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 94(1):85-9.
- Schantz P.M., Cruz M., Sarti E., Pawlowski Z (1993). Potential eradicability of taeniasis and cysticercosis. *Bull PAHO* 27:397-403
- Sciutto E., Fragoso G., Trueba L., Lemus D., Montoya R., et al (1990a). Cisticercosis vaccine: cross protecting immunity with *Taenia solium* antigens against experimental murine *Taenia crassiceps* cisticercosis. *Parasite Immunology* 12(6):687-696
- Sciutto E., Aluja A., Gragoso G., Rodarte L.F., Hernández M., et al (1995). Immunization of pigs against *Taenia solium* cisticercosis: factors related to effective protection. *Veterinary Research* 60:53-67
- Sciutto E., Fragoso G., Fleury A., et al (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 and Infection.* 2(15): 1875-1890.
- Sciutto E., Fragoso G., Manoutcharian K., et al (2002). New approaches to improve a peptide vaccine against porcine *Taenia solium* cisticercosis. *Arch of Medical Research.* 33(4): 371-378
- Sciutto E., Fragoso G., Fleury A., Chavarria A., Vega R., Yañez O., de Alluja, A.S., Saralde C. (2003). *Taenia solium* cisticercosis of humans and pigs: a review of our contributions and perspectives in the research of its complexities. *Recent Research Developments in Infection and Immunity.* 1:475-497
- Sciutto E., Toledo A., Cruz-Revilla C., Rosas G., Meneses G., Laplagne D., Ainciart N., Cervantes J., Fragoso G., Goldbaum F. *Brucella* spp. Lumazine synthase: A novel antigen delivery system. *Vaccine* 23(21):2784-90
- Sela M., S. Fuchs, R. Aron (1962). Studies on the chemical basis of the antigenicity of proteins. Synthesis, characterization and immunogenicity of some multichain and linear polypeptide containing tyrosine. *Biochem J.* 85:223-235

- Sidhu S.(2003). Phage display in pharmaceutical biotechnology. *Pharmaceutical biotechnology* p. 610-615
- Sotelo J., Del Bruto O.H. and G. Roman (1996). Cysticercosis. *Curr Clin Trop Infect Dis.* 16:240-259
- Sotelo J., Del Bruto O.H. (2000). Brain cysticercosis. *Arch. Med. Res.* 31:3-14
- Stuart E., Morshed F., Sremac M., DasSarma S (2001). Antigen presentation using novel particulate organelles from halophilic archaea. *Journal of Biotechnology* 88:119-128
- Swellengrebel,N.H. and Serman M.N. *Animal parasites in man.* Ed. D.Van Nostrand Company. USA 1961. p.p. 242-259
- Tacket CO. (2005). Plant-derived vaccines against diarrheal diseases. *Vaccine* 23:1866-1869
- Terrazas L.I., Cruz M., Rodríguez-Sosa M., Bojalil R., Garcia-Tamayo F., Sarralde C (1999). Th1-type cytokines improve resistance to murine cysticercosis caused by *Taenia crassiceps*. *Parasitol Res.* 85:135-141
- Toledo A. (1999). Identificación de epítopes protectores en antígenos recombinantes de *Taenia crassiceps*. Tesis. Facultad de Ciencias. UNAM. México
- Toledo A; Larralde C; Fragoso G; Gevorkian G; Manoutcharian K; Hernández M; Acero G; et al (1999). Towards a *Taenia solium* cysticercosis vaccine: an epitope shared by *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* protects mice against experimental cysticercosis. *Infection and Immunity.* 67(5):2522-2530
- Toledo A. (2004). Cisticercosis: Identificación y Caracterización Inmunológica de Epítopes para el Diseño de una Vacuna Polivalente. Tesis. Facultad de Ciencias. UNAM. México
- Toledo A., Fragoso G., Rosas G., et al (2001). Two Epitopes Shared by *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* Confer Protection against Murine *T.crassiceps* Cysticercosis along with a Prominent T1 Response. *Infection and Immunity.* 69(3): 1766-1773.
- Valdez F., Hernandez M., Govezensky T., Fragoso G. And Sciuotto E. (1994). Immunization against *Taenia crassiceps* cysticercosis: Identification of the most promising antigens in the induction of protective immunity. *J. Parasitol.* 80(6):931-936
- Vazquez-Flores S., Ballesteros-Rodea G., Flisser A. and Schantz P.M. (2001). Hygiene and restraint of pigs are associated with absence of *Taenia solium* cysticercosis in a rural community of Mexico. *Salud Pública Mex.* 43:574-6
- Vega R., Piñero D., Ramanankandrasana B., Dumas M., Bouteille B., Fleury A., Sciuotto E., Larralde C and Fragoso G. (2003). Population genetic structure of *Taenia solium* from Madagascar and Mexico: implications for clinical profile diversity and immunological technology. *International Journal of Parasitology* 33:1479-1485

- Velikovskiy C., Cassataro J., Giambartolomei G., Goldbaum F., Estein S., Bowden R., Bruno L., Fossati C and Spitz M (2002). A DNA Vaccine Encoding Lumazine Synthase from *Brucella abortus* Induces Protective Immunity in BALB/c Mice. *Infection and Immunity*. 70(5): 2507-2511
- Velikovskiy C., Goldbaum F., Cassataro J., Estein S., Borden R., Bruno L., Fossati C. and Giambartolomei G (2003). *Brucella* lumazine synthase elicits a mixed Th1-Th2 immune response and reduces infection in mice challenged with *Brucella abortus* 544 independently of the adjuvant formulation used. *Infection and Immunity*. 71(10):5750-55
- Walmsley AM., Arntzen CJ (2000). Plants for delivery of edible vaccines. *Curr Opin Biotechnol* 11:126-129
- Yu J and Langridge H.R (2001). A plant-based multicomponent vaccine protects mice from enteric diseases. *Nature Biotechnology*. 19:548-553
- Zylberman V., Craig P., Klinke S., Braden B., Cauerhff A and Goldbaum F (2004). High order quaternary arrangement confers increased structural stability to *Brucella* sp. Lumazine synthase. *The Journal of Biological Chemistry* 279(9):8093-8101

10. APENDICES

10.1. Artículos desarrollados en colaboración durante el trabajo de tesis

I.

Sciutto E, Toledo A, Cruz C, Rosas G, Meneses G, Laplagne D, Ainciart N, **Cervantes J**, Fragoso G, Goldbaum FA (2005). *Brucella spp.* lumazine synthase: a novel antigen delivery system. *Vaccine* 23(21):2784-90.

II.

Hernández M, Cabrera-Ponce JL, Fragoso G, López-Casillas F, León-Ramírez C., Sanchez-García G, Guevara A, Toledo A, **Cervantes J**, Cruz C, Acero G, Bojalil R, Herrera-Estrella L and Sciutto E. A new highly effective transgenic papaya-based anticysticercosis vaccine Sometido a publicación.

Brucella spp. lumazine synthase: a novel antigen delivery system

Edda Sciutto^{a,*}, Andrea Toledo^a, Carmen Cruz^a, Gabriela Rosas^b, Gabriela Meneses^a,
Diego Laplagne^c, Natalia Ainciart^c, Jacquelynne Cervantes^a,
Gladis Fragoso^a, Fernando A. Goldbaum^c

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

^b Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, 62210 Cuernavaca, Estado de Morelos, México

^c Fundación Instituto Leloir, Universidad de Buenos Aires, y Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Av. Patricias Argentinas 435, Buenos Aires 1405, Argentina

Received 2 February 2004; received in revised form 5 October 2004; accepted 1 November 2004

Available online 8 December 2004

Abstract

Lumazine synthase from *Brucella* spp. (BLS) was evaluated as a protein carrier to improve antigen delivery of KETc1, one of the peptides of the anti-cysticercosis vaccine. KETc1 becomes antigenic, preserved its immunogenicity and its protective capacity when expressed as a recombinant chimeric protein using *Brucella* spp. lumazine synthase. KETc1 and BLS-KETc1 were not MHC H-2^d, H-2^k nor H-2^b haplotype-restricted albeit KETc1 is preferentially presented in the H-2^d haplotype. These findings support that BLS is a potent new delivery system for the improvement of subunit vaccines.

© 2004 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: *Taenia solium*; Antigen delivery; Lumazine synthase

1. Introduction

Over recent years new types of vaccines have been developed based on important advances in biotechnology [1,2]. Subunit vaccines involving peptides that contained epitopes capable of inducing protective immunity against infectious organisms have been identified [3,4]. However, frequently, subunit vaccines are weak immunogens, require the use of adjuvant and need to be given in more than one dose [5]. Different novel approaches are being used to improve vaccine efficacy avoiding side effects and reducing the cost of immunization. Among them, several protein carriers have been tested to improve vaccine delivery [6–9]. A recently structurally described bacterial enzyme identified from *Brucella* spp. has several properties that make it a promising antigen carrier for vaccine preparations. It has been proved that BLS

assembles as a remarkable stable dimer of pentamers, representing a new quaternary order between the lumazine synthases family [10]. The presence of ten sites of linkage and the conformation of its N-termini linked to its high stability indicate the possibility to insert small epitopes without disturbing its conformation. In addition, this protein seems to be useful as a carrier molecule since it possesses immunostimulatory properties, even in the absence of any adjuvant. It can activate the cellular responses by delivering CD8⁺ T-cell epitopes into the MHC class I pathway [11], and elicits a strong and long-lasting humoral and cellular responses [12]. Considering its multivalence and the possibility of applying different protein engineering strategies on BLS [13] it is also possible to consider this carrier to design multi-epitope-vaccines.

On the other hand, a vaccine against porcine cysticercosis due to *Taenia solium*, a parasite that seriously affects human health in non-developing countries has been recently developed [14,15]. Considering that pigs are the only intermediate host of the parasite, this vaccine is proposed as a tool to

* Corresponding author. Tel.: +52 5 6223153; fax: +52 5 6223369.
E-mail address: edda@servidor.unam.mx (E. Sciutto).

interrupt transmission and prevent the human disease [16]. The vaccine is composed by three well-defined peptides of 8 (KETc12), 12 (KETc1) and 17 (GK1) amino acids originally identified in *Taenia crassiceps* [17] a parasite closely related to *T. solium*. These peptides have been shown to induce high level of protection against experimental murine cysticercosis in an experimental model successfully used to test candidate antigens for vaccination against porcine *T. solium* cysticercosis and were identified in all the developmental stages of the parasite [18,19]. More recently, the vaccine was successfully tested in a field trial against pigs' cysticercosis importantly reducing the number of established parasites and their viability [16]. Thus, it has been considered a useful tool to effectively interrupt transmission. For this purpose, the main limitation is that the vaccine is synthetically produced at a very high price, particularly when considering that its intended target is a population of pigs belonging to people of scarce means [20]. Thus, it is an urgent need to improve the delivery of the developed vaccine to be extensively used as a tool to control cysticercosis in developing countries where cysticercosis is endemic.

The goal of the present study was to evaluate the effect of *Brucella* spp. lumazine synthase (BLS) as a vaccine carrier, which is known to possess convenient physicochemical properties for this purpose, and to study the possibility of improving the magnitude of the immune response induced by one of the peptides (KETc1) of the anti-cysticercosis vaccine described above. The antigenicity and immunogenicity of the chimeric protein named, BLS-KETc1, created by fusing the peptide KETc1 to the 10 N-termini of BLS and expressed in *Escherichia coli* was evaluated and compared with the linear peptide KETc1.

2. Materials and methods

2.1. Mice

Six to eight-week-old female *H-2* congenic BALB.B and BALB.K strains mice were obtained from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). Female BALB/cAnN mice were bred at the Instituto de Investigaciones Biomédicas animal facilities by brother-sister mating. All mice were housed in our animal facilities in microisolators supplied with sterile food and water under pathogen-free conditions. 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 Animals Resources, National Research Council, Washington, DC.

2.2. Peptide

A *T. crassiceps* derived peptide that is shared by *T. solium* [19], KETc1 (APMSTPSATSVR(G)) was synthesized by stepwise solid-phase synthesis with *N*³-*tert*-butyloxycarbonyl (BOC) derivatives of L-amino acids on

phenyl-acetamidomethyl (PAM) resin (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). The peptide was 95% pure as judged by HPLC in an analytical C₁₈ reversed-phase column (3.9 mm × 150 mm; Delta Pak, Waters). The correct amino acid sequence was confirmed by protein sequencing on a pulsed-liquid-phase protein sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA) at the National Institute of Cardiology, Mexico City.

2.3. Expression of the BLS protein

The *Brucella* spp. BLS gene was cloned in pET11a vector (Novagen, EMD Biosciences, USA) as reported previously [10]. The plasmid was used to transform BL21 (DE3) strain *E. coli* competent cells (Stratagene, La Jolla, CA). Ampicillin resistant colonies were grown until OD₆₀₀ = 1.0 in LB medium containing 100 µg/ml of ampicillin, at 37 °C with agitation (300 rpm). Five millilitres of this culture were diluted to 500 ml and grown to reach an OD₆₀₀ of 1.0. At this point the culture was induced adding 1 mM IPTG and incubated for 4 h at 37 °C with agitation (300 rpm). The bacteria were centrifuged at 15,000 × g during 20 min at 4 °C.

2.4. Protein purification and refolding

BLS protein was successfully expressed as inclusion bodies by transformation of strain BL21 (DE3) *E. coli* competent cells. The inclusion bodies were solubilized in 50 mM Tris, 5 mM EDTA, 8 M urea pH 8.0 at room temperature overnight with agitation. The solubilized material was refolded by dialysis during 72 h against PBS containing 1 mM dithiothreitol (DTT). This preparation was purified in a MonoQ column in a FPLC apparatus (Pharmacia, Uppsala, Sweden) using a linear gradient of buffer B (50 mM Tris, 1 M NaCl, pH 8.5). The peak enriched with BLS was further purified on a Superdex-200 column with buffer PBS, 1 mM DTT. The purity of the BLS preparation was determined on SDS 15% (w/v) polyacrylamide gels. Purified BLS was concentrated (10 mg/ml), frozen in liquid N₂ and stored at -20 °C.

2.5. Preparation and expression of the chimeric protein BLS-KETc1

A pET11a plasmid containing the open reading frame of *Brucella* spp. lumazine synthase was digested with the restriction enzymes BamHI and XbaI and subcloned in the vector pALTER-Ex1 (Promega, Madison, WI). Using the altered Sites II (Promega) site-directed mutagenesis kit, two new restriction sites were introduced: a NsiI site in the two first codons of the 5' extreme and a AflII site in the two codons comprising residues 8 and 9 of the wild type amino acid sequence. The resulting sequence contains a His residue instead of Ala at position 1, and a Leu residue instead of Asn at position 8 of the coding sequence of the wild type protein. After checking the mutations by sequencing, the construction was subcloned again in the pET11a vector. The mutated pET11a

plasmid was digested with the restriction enzymes NsiI and AflII, removing the coding sequence of the first 8 residues. The wild type sequence was exchanged for the sequences pertaining to the peptide KETc1. To insert this sequence, two oligonucleotides were synthesized (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA) in a way that, after annealing, they contain the coding sequence APMSTPSATSVR followed by two additional residues for spacing (GS) plus the corresponding overhangs for ligation at the NsiI (5') and AflII (3') ends. The generated double stranded oligonucleotide was ligated with the previously digested mutated pET11a by overnight incubation at 16 °C with T4 DNA ligase (Promega). The ligation mix was used to transform competent *E. coli* DH5 α cells. The insertion was verified by colony-PCR using as primers one of the peptide specific oligonucleotides and the T7 terminator primer. The construction was finally checked by automated sequencing.

2.6. Immunization of mice

To evaluate the humoral response, groups of eight female BALB/cAnN mice each were subcutaneously (s.c.) immunized with 10 μ g/mouse or 2.5 μ g/mouse of KETc1 in saponin (100 μ g/mouse) (Sigma Chemical Co.) as described elsewhere [19] or with 50 μ g/mouse of BLS-WT or BLS-KETc1 with or without saponin (50 μ g/mouse). Immunization was performed twice at 10-day intervals and the animals were bled by retro orbital plexus puncture 10 days after the second immunization. Sera were stored at -70 °C until assayed.

To evaluate the cellular immune response, groups of 3–5 mice of different strains were s.c. immunized with two doses of 50 μ g/mouse of BLS-WT or BLS-KETc1 plus saponin (50 μ g/mouse) or KETc1 (10 μ g/mouse) plus saponin (100 μ g/mouse).

2.7. ELISA for antibodies

Microtitre plates (Costar, Corning Incorporated, Corning, NY, USA) were coated with 20 μ g/ml of the synthetic peptide, or BLS wild type or BLS-KETc1 at room temperature. To determine the antibody levels, plates were incubated with the diluted sera (1:100) followed by the addition of alkaline phosphatase-conjugated anti mouse IgG, following the previously described procedure [19]. Color was developed at RT with *p*-nitrophenyl phosphate disodium (Sigma Diagnostics, Poole Dorset, UK) and absorbance was measured at 405 nm in a Humareader ELISA processor (Human Gesellschaft für Biochemica und Diagnostica, Taunusstein, Germany).

An inhibition ELISA experiment was performed using the same procedure as described above diluting the sera 1:100 and previously incubated or not with soluble BLS-WT at 10 μ g/ml during 20 min at room temperature before being added to the plate.

2.8. Proliferation assay

Spleens from non-immunized and immunized BALB/cAnN (*H-2^d*), BALB.K (*H-2^k*), and BALB.B (*H-2^b*) mice were collected under aseptic conditions 15 days after the last immunization. The cells were washed and cultured in RPMI 1640 medium (Gibco, InVitrogen Corporation, Grand Island, NY), supplemented with L-glutamine (0.2 mM), 2- β -mercaptoethanol (0.05 mM), penicillin (100 U/ml), streptomycin (100 μ g/ml) and 10% fetal bovine serum (FBS). Cells were cultured with media, or KETc1 (10 μ g/ml) or BLS-WT or BLS-KETc1 (50 μ g/ml) as described elsewhere [21]. Briefly, cells were incubated at 37 °C in a 5% CO₂ humidified atmosphere, in flat-bottomed microtiter plates, at a concentration of 2×10^5 cells per 200 μ l final volume. After 72 h, the cultured cells were pulsed (1 μ Ci per well) for a further 18 h with [methyl-³H] thymidine (Amersham Biosciences, UK). Then, cells were harvested and the amount of incorporated label was measured by counting in a 1205 betaplateTM liquid scintillation counter (Wallac Oy, Turku, Finland). All assays were performed in triplicate cell samples from each of three to five individual mice per group. Data are expressed as the mean counts per minute (cpm) for each experimental group.

2.9. Mice infection

Fifteen days after the second immunization, controls and immunized mice with KETc1, BLS-WT or BLS-KETc1 were i.p. challenged with 10 small (2 mm in diameter), non-budding cysticerci of *T. crassiceps* in 0.5 ml of PBS. To determine the level of protection, mice were sacrificed sixty days after infection and the cysts inside their peritoneal cavities were harvested and counted under stereoscopic microscope [18]. Organs inside the peritoneum of each mouse were removed and carefully inspected to detect any remaining *T. crassiceps* larvae.

2.10. Statistical analysis

Data were analyzed by one-way ANOVA Tukey's test. All analyses were performed using the Instat Software Program (GraphPad).

3. Results and discussion

This study revealed that *Brucella* spp. lumazine synthase is an adequate carrier to present foreign epitopes to the immune system. It tolerates the insertion of a 12 amino acid peptide encoding one of the peptides of the vaccine against *T. solium* cysticercosis, increasing the length of the inserted epitope, as well as inserting multicopies of this epitope, becoming antigenic and improving its immunogenicity.

Table 1
KETc1 becomes antigenic when expressed as a recombinant chimeric protein using *Brucella* spp. lumazine synthase

Abs against	Before immunization	After immunization with KETc1	
		2.5 µg/mouse	10 µg/mouse
KETc1	0.09 ± 0.02 ^a	0.093 ± 0.06 ^a	0.086 ± 0.03 ^a
BLS-WT	0.07 ± 0.03	0.050 ± 0.02 ^b	0.162 ± 0.05 ^b
BLS-KETc1	0.06 ± 0.01 ^a	0.580 ± 0.17 ^c	0.520 ± 0.12 ^c

Mean ± S.D. of IgG antibody level (OD₄₀₅) of groups of eight BALB/cAnN female mice each KETc1-immunized reacting with KETc1 or BLS-KETc1. Data with different letters (a, b, c) indicate significant differences ($P < 0.01$).

As Table 1 shows, KETc1-immunized mice elicited IgG antibodies (Abs) against KETc1 that were only detectable when BLS-KETc1 was used as the source of antigen in the ELISA plate. No differences were observed between the two doses tested (2.5 or 10 µg of KETc1/mouse). Considering the small size of this peptide (12 amino acids), its conformation is probably modified when bound to the ELISA plate with

the consequent loss of its capacity for antibody recognition. The possibility that KETc1 was not bound to the plate was discarded considering that sera from *T. crassiceps*-infected mice recognized the peptide in ELISA.

Moreover, the expression of KETc1 on BLS allows conserving its immunogenicity. As shown in Fig. 1 immunization with 50 µg of BLS-KETc1/mouse (containing 2.5 µg of KETc1) elicited IgG antibodies that recognized BLS-WT and more importantly BLS-KETc1 as expected considering data shown in Table 1. These results confirmed the previous finding that BLS per se is capable to induce a vigorous IgG response [11]. Levels of IgG were not significantly improved using saponin as adjuvant neither when mice were immunized with BLS-KETc1 nor with BLS-WT a finding consistent with the needless of adjuvants [11]. In addition, a great heterogeneity in IgG levels against BLS-WT or BLS-KETc1 was found when mice were immunized with BLS-WT, which was importantly reduced when mice were immunized with the chimeric protein (BLS-KETc1) an unexpected finding that needs further studies. The increased level of Ab deter-

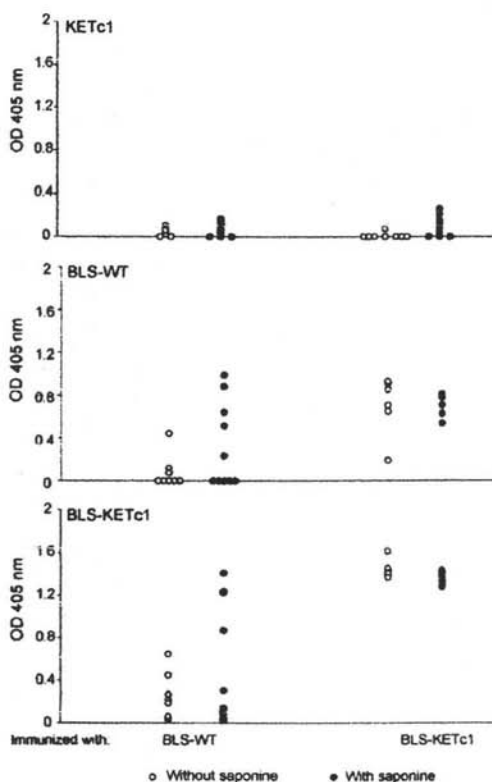


Fig. 1. Antibody levels determined by ELISA in sera from BLS-WT and BLS-KETc1 immunized mice in the presence or not of saponine as adjuvant against KETc1 or BLS-WT or BLS-KETc1. OD values were subtracted from those obtained in each mouse before immunization.

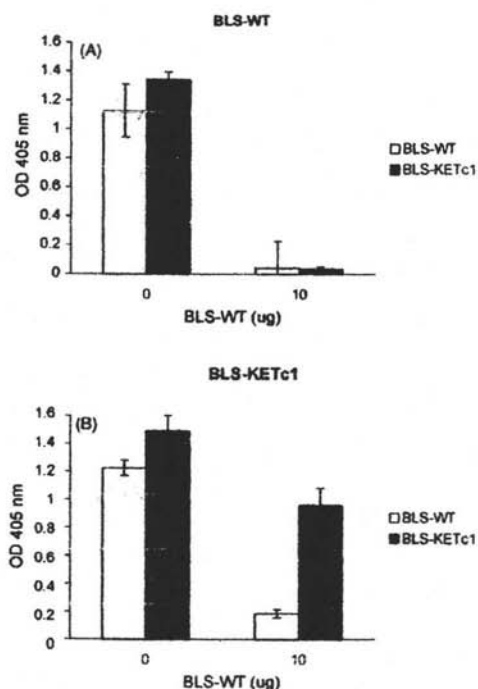


Fig. 2. Antibodies elicited by immunization of mice with BLS-KETc1 are not only specific for BLS but also for KETc1. Sera from mice immunized with BLS-WT (□) or BLS-KETc1 (■) were incubated without or with 10 µg per reaction of soluble BLS-WT. The Ag-Ab complexes generated were incubated with BLS-WT (A) or BLS-KETc1 (B) antigens covering the ELISA plate. Data are the mean \pm S.D. of eight sera for each group of immunized mice.

mined when BLS-KETc1 is used as antigen is specific against KETc1 as shown in Fig. 2. The presence of specific antibodies against KETc1 was confirmed by the previous incubation of anti-BLS-KETc1 sera with 10 µg of BLS-WT, which importantly reduced the level of antibodies generated by the BLS epitopes of the chimera (Fig. 2A) remaining an important reactivity against BLS-KETc1 (Fig. 2B). The polymeric nature of BLS (i.e., that of a repetitive and spatially ordered array of the same epitopes) could explain this strong B-cell response producing a strong signal transduction mediated by B-cell receptors, as described previously in a study using haptens as model antigens [22]. In this sense, the three-dimensional structure of BLS shows that any given epitope would be inserted at ten different points located at the vertices of two planar pentagons, separated by a regular distance of around 40 Å and would be displayed to the solvent in a regular array, increasing their intrinsic immunogenicity [13,23]. Based on the previous analysis, BLS-KETc1 could behave as a very stable decamer as compared with the wild-type, suggesting that, in this setting, KETc1 would have the stability con-

Table 2

Specific in vitro splenocyte proliferation induced by KETc1 expressed as a recombinant chimeric protein using *Brucella* spp. lumazine synthase

In vitro treatment	Immunized with			
	Saponin	BLS-WT	KETc1	BLS-KETc1
Media	104 \pm 126	229 \pm 136	179 \pm 119	153 \pm 54
KETc1	281 \pm 188	950 \pm 593	114 \pm 25	272 \pm 220
BLS-WT	155 \pm 461	5989 \pm 1204*	656 \pm 130	2659 \pm 506
BLS-KETc1	308 \pm 461	2103 \pm 1139*	3144 \pm 81*	8922 \pm 4759*

Mean \pm S.D. of [3H] TdR incorporation (cpm) after in vitro stimulation of splenocytes from BALB/cAnN controls and immunized female mice. Data are representative of three different experiments separately performed.

* Significantly increased proliferative capacity ($P < 0.05$).

ferred by the carrier protein, increasing its in vivo half-life by several-fold. Thus, the use of BLS as a protein carrier has the benefit of improving the immunogenicity of peptides by increasing immunogen size as well as providing T-helper epitopes.

Furthermore, BLS may also be able to provide better processing of KETc1 for antigen presentation. The ability of splenic antigen-presenting cells (APC) to present KETc1 in the linear form or on the surface of the recombinant BLS protein to in vivo primed T cells was determined using proliferation assays. As Table 2 shows BLS-KETc1 was a better recall antigen than the linear KETc1 peptide to splenocytes from mice immunized with the synthetic KETc1 peptide.

To determine if this proliferative capacity is MHC haplotype-restricted three independent mouse major histocompatibility complex haplotypes ($H-2^d$, $H-2^b$ and $H-2^k$) were tested in a BALB background [24]. As Table 3 shows, significant increased proliferative response was induced in murine splenocytes from the three congenic strains tested when mice were immunized with KETc1 and in vitro stimulated with BLS-KETc1. This broad antigen presentation

Table 3

Specific in vitro splenocyte proliferation induced by KETc1 expressed as a recombinant chimeric protein using *Brucella* spp. lumazine synthase in $H-2$ congenic mice strains

In vitro treatment	Cells from mice immunized with KETc1
BALB ($H-2^d$)	
Media	179 \pm 119
KETc1	114 \pm 25
BLS-KETc1	3144 \pm 81*
BALB ($H-2^b$)	
Media	94 \pm 22
KETc1	43 \pm 9
BLS-KETc1	2375 \pm 709*
BALB ($H-2^k$)	
Media	189 \pm 110
KETc1	379 \pm 294
BLS-KETc1	5686 \pm 2030*

Mean \pm S.D. of [3H] TdR incorporation (cpm) after in vitro stimulation of splenocytes from different strains of mice immunized with KETc1 synthetically produced or BLS-KETc1 plus saponin or saponin alone.

* Significant increase in the cpm respect to splenocytes incubated with media alone ($P < 0.05$).

could be due to the presence of different anchor and non-anchor positions in the 12 aa KETc1 sequence which could promote the binding to the three different MHC haplotypes tested. The possibility that new single peptide(s) could be generated during *in vitro* BLS-KETc1 antigen presentation able to bind to the three MHC haplotypes cannot be discarded. Limited variation between certain haplotypes was found which can be ranked as follows: $H-2^d = H-2^k < H-2^b$. Thus, KETc1 seems to be preferentially presented in the $H-2^b$ haplotype ($P=0.03$). It is of interest the increased proliferative response induced by KETc1 immunization since BALB.B as well other syngenic $H-2^b$ strains (C57BL/6J, C57BL/10) have been found highly resistant to the experimental cysticercosis infection [25]. Thus, the increased immunogenicity of this peptide extensively expressed in the parasite [19] could be related to this resistance.

As expected, a higher proliferative response was observed in mice immunized with BLS-KETc1 and primed *in vitro* with the same chimera (data not shown). In these conditions, neither MHC-haplotype restriction nor preferential presentation was observed probably due to the presence of a higher number of epitopes that override the differences observed for KETc1 presentation.

Another important finding that merit comments is that KETc1 expressed in the chimera not only preserved its immunogenicity but also exhibited similar protective capacity than the linear peptide (73% versus 74% respectively, Table 4). It is interesting that BLS alone also induced high level of protection (57%), which could be due to an increased innate immune response considering that an increased resistance to murine cysticercosis can be induced by this kind of response [26,27]. Although this possibility needs further studies this finding could be important for considering it

as potential useful adjuvant in vaccination. Overall, results obtained herein let us propose BLS as a novel and effective delivery system for the improvement of different subunit vaccines. Numerous proteins have been proposed and tested for antigen delivery [28–31]. Unfortunately, many of them present properties that limit their use. Widely used vaccines such as tetanus toxoid (TT) have not been uniformly effective as carrier proteins because of the phenomenon of epitope-specific suppression in which induction of an immune response against a synthetic peptide, conjugated to TT, is prevented by pre-existing immunity to TT [32]. Another protein extensively used is the Cholera toxin, which induces both mucosal and systemic immune responses via a Th2 cell-dependent pathway [30]. However, and in addition to potential type-I hypersensitivity, a major concern for using mucosal adjuvants such as CT is that this molecule is not suitable for use in humans because of its toxicity for the central nervous system [33]. In the case of BLS none of the mice employed exhibited symptoms of discomfort. However, considering the potential use of BLS as a carrier, its safety must be thoroughly studied.

Another point that merits comments is that the immunogenicity of KETc1 is also an important advance in the improvement of the vaccine against cysticercosis. It is now possible to express KETc1 as a recombinant chimera in bacteria at more accessible production costs and with an improved immunogenicity, which could be reflected as an increase in its protective capacity. Based on these results it will be convenient to express the other two peptides that constitute the vaccine and confirm their protective capacity against pig cysticercosis.

In summary, results presented here offer a novel antigen delivering protein that open new possibilities for controlling pathogens for which vaccines are not yet available.

Table 4

Effective protection induced by KETc1 expressed as a recombinant chimeric protein using *Brucella* spp. lumazine synthase

Non-immunized mice	433 ^a , 488, 491, 511, 529, 535, 624, 642 532 ± 68 ^b	
Immunized with KETc1	2,3, 47, 99, 104, 108, 155, 165, 208, 214, 238, 317 138 ± 96 ^a	74% ^c
BLS-WT	153, 156, 161, 189, 200, 220, 225, 272, 296, 313, 322 228 ± 64 ^a	57%
BLS-KETc1	0, 0, 41, 108, 113, 162, 198, 208, 228, 253, 294 146 ± 102 ^a	73%

^a Individual number of cysticerci recovered 60 days after infection from each mouse.

^b Mean ± S.D.

^c Percentage of protection respect to controls.

^d Statistically significant difference between control and immunized mice (Student's *t*-test).

Acknowledgments

This work was supported for the International Center for Genetic Engineering and Biotechnology (CRP/Mex02-01), the Howard Hughes Medical Institute (55004134), the Agencia Nacional de Promoción de Ciencia Y Técnica de la República Argentina (ANPCYT, PICT 8365) and PROMEP-UAEMOR-PTC-87 (103.5/03/2530). The authors thank the technical support of Mercedes Baca, Gerardo Arrellín, Georgina Díaz and Marisela Hernández and the English correction of Isabel Pérez Montfort.

References

- [1] Meeusen EN, Piedrafita D. Exploiting natural immunity to helminth parasites for the development of veterinary vaccines. *Int J Parasitol* 2003;33(11):1285–90.
- [2] Renno T, Lebecque S, Renard N, Saeland S, Vicari A. What's new in the field of cancer vaccines? *Cell Mol Life Sci* 2003;60(7):1296–310.

- [3] Potter AA, Babiuk LA. New approaches for antigen discovery, production and delivery: vaccines for veterinary and human use. *Curr Drug Targets Infect Disord* 2001;1(3):249–62.
- [4] Babiuk LA, Gornis S, Hecker R. Molecular approaches to disease control. *Poult Sci* 2003;82(6):870–5.
- [5] Zauner W, Lingnau K, Mattner F, von Gabain A, Buschle M. Defined synthetic vaccines. *Biol Chem* 2001;382(4):581–95.
- [6] Sanchez J, Johansson S, Lowenadler B, Svennerholm AM, Holmgren J. Recombinant cholera toxin B subunit and gene fusion proteins for oral vaccination. *Res Microbiol* 1990;141(7–8):971–9.
- [7] Del Giudice G. Hsp70: a carrier molecule with built-in adjuvanticity. *Experientia* 1994;50(11–12):1061–6.
- [8] Rico AI, Angel SO, Alonso C, Requena JM. Immunostimulatory properties of the *Leishmania infantum* heat shock proteins HSP70 and HSP83. *Mol Immunol* 1999;36:1131–9.
- [9] Lycke N. From toxin to adjuvant: the rational design of a vaccine adjuvant vector, CTA1-DD/ISCOM. *Cell Microbiol* 2004;6(1):23–32.
- [10] Zylberman V, Craig PO, Klinke S, Braden BC, Cauerhff A, Goldbaum FA. High order quaternary arrangement confers increased structural stability to *Brucella* spp. lumazine synthase. *J Biol Chem* 2004;279(9):8093–101.
- [11] Velikovsky CA, Goldbaum FA, Cassataro J, et al. *Brucella* lumazine synthase elicits a mixed Th1–Th2 immune response and reduces infection in mice challenged with *Brucella abortus* 544 independently of the adjuvant formulation used. *Infect Immun* 2003;71(10):5750–5.
- [12] Velikovsky CA, Cassataro J, Giambartolomei GH, et al. A DNA vaccine encoding lumazine synthase from *Brucella abortus* induces protective immunity in BALB/c mice. *Infect Immun* 2002;70(5):2507–11.
- [13] Laplagne DA, Zylberman V, Ainciart N, Steward MW, Sciuotto E, Fossati CA, et al. Engineering of a polymeric bacterial protein as a scaffold for the multiple display of peptides. *Proteins* 2004;57(4):820–8.
- [14] Sciuotto E, Fragoso G, Fleury A, et al. *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* 2000;2(15):1875–90.
- [15] Sciuotto E, Fragoso G, Fleury A, et al. *Taenia solium* cysticercosis of humans and pigs: A review of our contributions and perspectives in the research of its complexities. In: Pandlali SG, editor. *Recent Research Developments in Infection and Immunity*. Trivandrum, India: Transworld Research Network; 2003. p. 475–97.
- [16] Huerta M, de Aluja AS, Fragoso G, et al. Synthetic peptide vaccine against *Taenia solium* pig cysticercosis: successful vaccination in a controlled field trial in rural Mexico. *Vaccine* 2001;20(1–2):262–6.
- [17] Manoutcharian K, Rosas G, Hernandez M, et al. Cysticercosis: identification and cloning of protective recombinant antigens. *J Parasitol* 1996;82(2):250–4.
- [18] Toledo A, Larralde C, Fragoso G, 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(5):2522–30.
- [19] Toledo A, Fragoso G, Rosas G, et al. Two epitopes shared by *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* confer protection against murine *T. crassiceps* cysticercosis along with a prominent T1 response. *Infect Immun* 2001;69(3):1766–73.
- [20] Sciuotto E, Fragoso G, Manoutcharian K, et al. New approaches to improve a peptide vaccine against porcine *Taenia solium* cysticercosis. *Arch Med Res* 2002;33(4):371–8.
- [21] 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. *Parasitology* 1999;118(Pt 6):623–33.
- [22] Coombes AG, Lavelle EC, Jenkins PG, Davis SS. Single dose, polymeric, microparticle-based vaccines: the influence of formulation conditions on the magnitude and duration of the immune response to a protein antigen. *Vaccine* 1996;14(15):1429–38.
- [23] Baldi PC, Velikovsky CA, Braden BC, Giambartolomei GH, Fossati CA, Goldbaum FA. Structural, functional and immunological studies on a polymeric bacterial protein. *Braz J Med Biol Res* 2000;33(7):741–7.
- [24] Robinson JH, Delvig AA. Diversity in MHC class II antigen presentation. *Immunology* 2002;105(3):252–62.
- [25] Fragoso G, Lamoyi E, Mellor A, Lomeli C, Govezensky T, Sciuotto E. Genetic control of susceptibility to *Taenia crassiceps* cysticercosis. *Parasitology* 1996;112:119–24.
- [26] 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(3):516–23.
- [27] 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(1):67–74.
- [28] Rigano MM, Alvarez ML, Pinkhasov J, et al. Production of a fusion protein consisting of the enterotoxigenic *Escherichia coli* heat-labile toxin B subunit and a tuberculosis antigen in *Arabicopsis thaliana*. *Plant Cell Rep* 2004;22(7):502–8.
- [29] Kurokawa T, Wuhler M, Lochnit G, Geyer H, Markl J, Geyer R. Hemocyanin from the keyhole limpet *Megathura crenulata* (KLH) carries a novel type of N-glycans with Gal (beta1-6) Man-motifs. *Eur J Biochem* 2002;269(22):5459–73.
- [30] Lycke N. The mechanism of cholera toxin adjuvanticity. *Res Immunol* 1997;148:504–20.
- [31] Riedmann EM, Kyd JM, Smith AM, et al. Construction of recombinant S-layer proteins (rSbsA) and their expression in bacterial ghosts—a delivery system for the nontypeable *Haemophilus influenzae* antigen Omp26. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2003;37(2–3):185–92.
- [32] Chabalgoity JA, Villareal-Ramos B, Khan CM, Chatfield SN, de Hormaeche RD, Hormaeche CE. Influence of preimmunization with tetanus toxoid on immune responses to tetanus toxin fragment C-guest antigen fusions in a *Salmonella* vaccine carrier. *Infect Immun* 1995;63(7):2564–9.
- [33] Fujihashi K, Kato H, van Ginkel FW, et al. A revisit of mucosal IgA immunity and oral tolerance. *Acta Odontol Scand* 2001;59(5):301–8.

A new highly effective transgenic papaya-based anticysticercosis vaccine

Hernández, M*, Cabrera-Ponce, JL[†], Fragoso G^{*}, López-Casillas, F[‡], León-Ramírez C[¶], Sanchez-García, G[¶], Guevara, A[§], Toledo, A*, Cervantes J^{*}, Cruz, C^{*}, Acero G^{*}, Bojalil R, Herrera-Estrella, L[¶] and Sciutto, E*.

^{*} Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México; México, D. F., 04510, México

[†] Departamento de Ingeniería Genética de Plantas del Centro de Investigaciones y de Estudios Avanzados el IPN. Unidad de Biotecnología e Ingeniería Genética de Plantas. Unidad Irapuato. Irapuato. Libramiento Norte, km 9.6, carretera León-Querétaro Irapuato, Guanajuato.

[§] Departamento de Biología Molecular de Plantas, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Morelos 62271, México.

[¶] Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México; México, D. F., 04510, México

*Corresponding authors

Edda Sciutto; Instituto de Investigaciones Biomédicas, A.P. 70228; México 04510, D.F.; México Tel.: 55-56223153, fax: 55-56223369, email: edda@servidor.unam.mx

Luis Herrera-Estrella; Unidad de Biotecnología e Ingeniería Genética de Plantas, Irapuato, Guanajuato., Mexico, Tel: 01 462 62 396 00, fax: , email: lherrera@ira.cinvestav.mx

Number of text pages: 19

Number of words in the abstract: 237; Total number of characters in the paper:

Keywords: Transgenic plants |Vaccine| *Taenia solium* | anti-cysticercosis vaccine | transgenic papaya

Running title: Papaya anticysticercosis vaccine

Abstract

The use of transgenic plants as a new antigen-delivery system of subunit vaccines has been increasingly explored. We herein report for the first time the use of transgenic papayas for the delivery of a subunit vaccine. Embryogenic calli of *Carica papaya* L. Cultivar "Maradol Tabasco" were transformed with three different constructions cloned in pUI235-5.1, corresponding to the three peptides that constitute the synthetic anti-cysticercosis vaccine. A total of 41 hygromycin-resistant clones (35 KETc1, 4 KETc7 and 2 KETc12) that showed stable β -glucuronidase activity were chosen and propagated. Twenty clones, in which the expected corresponding inserts were revealed by PCR or RT-PCR, were selected for further analysis. The peptide content reached up to 2 % and 0.8% for KETc7 and KETc1, respectively, of the total soluble protein according to densitometer analysis or HPLC. The protective capacity of each callus total extract without any adjuvant was determined by s.c. immunization, using the high predictive model of murine cysticercosis. Complete protection was induced by subcutaneous immunization with some of the transgenic callus in up to 90% of the immunized mice, higher than that expected using the respective synthetic peptides, indicating the potential of this new version of the anti-cysticercosis vaccine. This study provides a new high protective subunit anticysticercosis vaccine, produced in transgenic papaya that could be a realistic tool for the prevention of this parasitic disease, which severely and frequently affects the less-developed countries of the world.

Introduction

Vaccination is considered one of the most promising biotechnological measures for the control of infectious diseases. However, its impact has been mainly limited to viral infections (i.e., smallpox, poliomyelitis, influenza...), as well as those in which soluble products such as tetanus and diphtheria toxins mediate the pathogenicity. Much less successful has been the prevention of parasitic diseases in spite of multiple efforts undertaken to develop effective vaccines (1). This situation seems exceptionally different in the case of parasitic infections caused by many cestodes. Results obtained by some research groups against different cestodes suggest that, in the particular case of cestodiasis, vaccines can be highly effective (2-6)

Among cestodes, *Taenia solium* affects human health most severely and frequently. An effective synthetic vaccine named S3Pvac against pig cysticercosis (an obligatory host and the most vulnerable step in transmission) has been developed (7, 8). S3Pvac, composed of three synthetic peptides of 18, 12 and 8 amino acids, reduced in 50 % the prevalence of cysticercosis and in 98 % the intensity of infection with viable cysts in a field trial against pig cysticercosis (9). Moreover, S3Pvac immunization of previously infected pigs induced a reduction in cysticerci viability, exhibiting additional therapeutic properties (10). Thus, S3Pvac represents a powerful means of controlling the cysticercosis infection. The main limitation is the cost of the synthetic vaccine, particularly when considering that its intended target is a population of pigs belonging to people of scarce means. Thus, it is an urgent need to improve the delivery of the developed vaccine, to be used extensively as a tool to control cysticercosis in developing countries where the disease is endemic. The S3Pvac synthetic components plus the protective recombinant peptide KETc7 were expressed in filamentous phage. This phage recombinant vaccine effectively protected against experimental pig cysticercosis when administered s.c. (11). Its protective capacity is currently being tested in the field under realistic conditions of transmission.

On the other hand, the possibility to develop oral vaccines against cysticercosis has also been explored. The needle-free oral vaccines are by far the most attractive method of vaccine delivery, which may avoid cost and logistics problems making them suitable for mass

immunization programs. In particular, oral vaccination seems to be an appropriate procedure for pigs and human vaccination since both acquire cysticercosis by the ingestion of *T. solium* eggs. However, S3Pvac as well as the phage recombinant vaccine exhibited low efficiency when orally administered (11). Thus, an additional delivery system based on the use of transgenic plants was herein explored. Plants could be an inexpensive source of antigens that are easily and massively produced. Moreover, the plant cell walls can protect antigen from further degradation in the digestive tract enabling antigens to reach the Gut Associated Lymphoid Tissue. In this study we choose to transform transgenic papaya, considering that its small sized genome allows the insertion of multiple transgene copies and can be eaten raw with additional side-benefits effects regarding its immunomodulator properties (12). In addition, papaya cells can be propagated in low costly liquid culture (13) avoiding non-desirable environmental effects due to the release of transgenic plants.

Here, we tested the immunoprotective properties of the developed papaya transgenic clones in a murine model of cysticercosis. This experimental model is obtained by using *Taenia crassiceps*, another cestode that naturally infects rodents and exhibits extensive antigenic cross-reactivity and cross-immunity with *T. solium* and develops easily and rapidly in the peritoneal cavity of mice. Thus, it has been successfully employed to test promising antigens as those included in the S3Pvac. This model was also useful to test different vaccine approaches against cysticercosis (7, 8). Experimental cysticercosis due to *T. crassiceps* is attained by injecting metacestodes in the peritoneal cavities of mice, where they reproduce by budding. Once established, parasites can exponentially reproduce in the peritoneal cavity. Thereafter, the number of cysticerci (parasite burden) at different times of infection reflects the susceptibility to the infection.

In the present study, we describe for the first time the use of papaya as a delivery system for subunit vaccines and the production of the first version of a plant-based anticysticercosis vaccine expressed in transgenic papaya with potential use for massive vaccination. Our results

encourage further investigation into this new antigen delivery system as an oral vaccine against pig and human cysticercosis.

Materials and Methods

Plant Material. Seeds of papaya *Carica papaya* L. cultivar "Maradol Tabasco" were obtained from INIFAP (Instituto Nacional en Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias), Tabasco campus. Immature fruits were used as source of zygotic embryos for embryogenic callus induction. Embryogenic callus induction and propagation was performed according to Cabrera-Ponce et al. (14).

Sequence modifications. KETc1, KETc12 and KETc7 DNA sequences were optimized in their promoter codon sequences as follows: in KETc1 and KETc12, the ATG codon was identified and modified into the ANNATGGCUNN context. A six His-tag coding sequence was added at the 3' end, in order to increase the size of the peptides and to facilitate their identification and purification, if needed. The latter required the alignment of the synthetic primers (5' ATG AAT TCA CAA TGG CTC CAA TGT CTA CAC CAT CGG CTA CAT CGG TT 3') and (5' ATG GAT CCT CCA TGG TGA TGG TGA TGG TGC CGA ACC GAT GTA GCC GA 3') into the KETc1 sequence and (5' ATG AAT TCA CAA TGG CTG GCA ACC TCT TAT TGA GTT GTT TGC A 3') and (5' ATG GAT CCT CAA TGG TGA TGG TGA TGG TGC AAA CAA CTC AAT 3') into the KETc12 sequence to yield the KETc1.6His and KETc12.6His sequences, respectively. In both cases, primers were designed to have an Eco RI recognition site at the 5' end, and a Bam HI recognition site at the 3' end. Complementary DNA was synthesized with Klenow enzyme (Roche).

The cDNA sequence of KETc7 contained the optimal ATG codon in the ANNATGGCUNN context and was recovered from the pTc-sp7 construction containing the signal peptide of the betaglycan receptor (BG) (15).

Clonation of KETc1.6His, KETc12.6His and KETc7 insert in pUI 235-5.1. KETc1.6His and KETc12.6His sequences were cloned into pBluescript vector (Stratagen), in EcoRI/ BamHI sites, and

the constructions were sequenced to verify the correct ORF (open reading frame). The inserts KETc1.6His and KETc12.6His were subcloned into the EcoRI/BamHI of the constitutive plant vector pUI 235-5.1 behind the CAMV35-35S promoter constructed by Herrera-Estrella et al., (16) that contains the resistance gene of kanamycin. The resulting vectors contained a 79 bp and 70 bp fragment from the original ATG codon, corresponding to KETc1 and KETc12, respectively. On the other hand, the cDNA sequence of KETc7, including the signal peptide sequence of the betaglycan receptor (BG), was excised from plasmid pTc-sp7 (15). This fragment of 446 pb was then subcloned into the plant vector pUI 235-5.1 in BamHI/ Stu I site (Fig. 1). The optimal ORF of the constructions were confirmed by sequencing.

Genetic Transformation. Papaya embryogenic calli at the globular stage were co-transformed using particle bombardment according to Cabrera-Ponce (14, 17). The pWRG1515 plasmid (18) containing the gusA (β -glucuronidase reporter gene) and the hygromycin (resistance gene), was used to co-transform with the respective constructions (KETc1, KETc7 and KETc12) in pUI 235-5.1 plasmid.

Molecular Analysis. Transgenic clones for the three peptides were tested by polymerase chain reaction (PCR) using the primer LHE- 1700 from -84 bp of the CAMV 35-35S promoter (5' GGA TGA CGC ACA ATC CCA CTA T 3') and the primer LHE-178 based on the 3' end of the insert gene (5' GAT CCT CAA TGG TGA TGG TGA TG 3') for the detection of KETc1 and KETc12 clones, and the primer LHE- 1700 and 3'end CTA AAG ATT CTT CTT ATC TTC TGG TTC CAT for the detection of KETc7 clones. To confirm the presence of the desired gene in the transgenic clones, total plant DNA was extracted with DNeasyPlant Mini kit (Qiagen) and the PCR reaction was prepared with Platinum Taq Polymerase (Invitrogen). The amplification reaction was separated in 2.0% agarose gels and then visualized under UV light. The clones were named according to the progressive clone identified adding p of papaya first e.g. pKETc7₂₁.

RT-PCR. The transcription of each transgene was analyzed by RT-PCR in the different clones. Total RNA extraction was performed from 100 mg fresh weight of embryogenic callus following the protocol described by Shure *et al.*, (19). The follow specific primers for RT-PCR were employed: on the 5' end ATG GCT CCA ATG TCT A for KETc1 and ATG GCT GGC AAC CTC TT for KETc12. For both inserts, we used the same 3'end primer GGA TCC TCA ATG GTG. The 5' primer AGA TCA CCC GGG AAT TC and primer 3' end CTA AAG ATT CTT CTT ATC TTC TGG TTC CAT were used for KETc7 insert detection. Reverse transcription (RT) was carried out for 1 h at 50 °C in 50 µl final reaction volume containing 5 µg RNA, 20 ng of specific primers and a mixture of dNTPs (10 mM each), 10 mM DTT, and 200 units of M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen). The PCR products were analyzed by electrophoresis on 2% (w/v) agarose gels.

Protein Extraction. Soluble extract from each papaya clone (5 gr) and from wild-type embryogenic callus were powdered in liquid N₂ and lysed with 1 gr/ml of lysis buffer [PBS pH =7.4, 50 mM sodium ascorbate, 1 mM EDTA pH=8.0, 0.2% Triton X-100 and 10 µl/ml of protease inhibitor cocktail for use in purification of poly-(histidine) tagged proteins (Sigma)] and centrifuged at 36 220 X g and 4° C for 20 min to remove insoluble debris. The supernatant was collected, and the protein concentration was determined by Lowry (20).

Detection of inserted peptides. For the detection of KETc7, KETc1.6His and KETc12.6His peptides, 50 µg of soluble extract from each clone were subject to 4 -12 % NuPAGE acrylamide gel (Invitrogen) and stained with SimplyBlue SafeStain (Invitrogen).

KETc7 was quantified using the densitometer analysis program Quantity one in the Fluor-S™ Multimager (BioRAD).

Considering that no bands were detected for KETc1.6His and KETc12.6His inserts in the acrylamide gels, additional HPLC analysis were performed. Soluble extract of the respective transgenic clones and wild-type embryogenic callus were analyzed by HPLC (Waters 600 Corp. Milford MA, USA) with a C18 Deltapack 3.9 x 300 mm, 15µm, 300 Amstrongs. A detector Waters 486 was employed. The

mobile phase was an aqueous solution of 0.1% Trifluoroacetic acid (Baker) as solvent A, in aqueous solution of 0.1% TFA, acetonitrile 70% (Baker) in solvent B. A linear gradient of 5 to 50% of B in 25 min and 50-95% of B in 5 min to room temperature and flow of 1.5 ml/min was applied. Detection was at 230 nm and retention time was 9.74 min for KETc1.6His and 14.72 min for KETc12.6His standards synthetically prepared peptides. The KETc1.6His concentration in the different transgenic clones was estimated considering the area under the curve of the HPLC profiles after being subtracted from the respective area of the non-transgenic papaya extract. For purification of KETc1.6His and KETc12.6His peptides the Ni-NTA spin kit (Qiagen) and the Ni-NTA magnetic agarose beads (Qiagen) were employed.

ELISA. The transgenic clones were tested as antigen in an ELISA assay for the presence of the KETc1.6His and KETc12.6His peptides by Anti-His (C-Term) HRP antibody (Invitrogen), the anti-penta His FA antibody (Sigma) or specific antibodies against cysticercal antigens. Specific antibodies against the respective peptides were not employed considering the low levels of antibodies elicited by these peptides (7, 8). In brief, Immulon I plates (Nunc) were coated with lysate protein (100 μ L at 10 μ g/ml in carbonate buffer pH=9.6) and left overnight at 4 °C. The plates were washed 3 times for 5 min with 200 μ l/well of wash solution (PBS 1x containing 0.3% v=v Tween 20). Anti-His (C-Term) HRP diluted 1:5000 (100 μ l/ well) were added and incubated for 30 min at 37°C. Reactivity was detected by adding tetramethylbenzidine (Zymed, Laboratories) as substrate. The color reaction was allowed to proceed for 15 minutes at 4°C in the dark and stopped by adding 100 μ l of 0.2 M H₂SO₄ (Baker). Optical density (OD450 nm) was determined in an ELISA processor (Opsys MR, Dynex Technologies). Each sample was assayed twice. A sample was considered positive if the optical density was higher than mean \pm 2 SD obtained with sera from non-immunized mice against the tested transgenic clone.

Mice. BALB/cAnN female mice, previously characterized as a strain highly susceptible to cysticercosis (21), were used for vaccine trials. Mice were bred and kept in our animal facilities by

single-line breeding system. The experiments reported herein were conducted according to the principles set forth in the Guide for the Use of Laboratory Animals, Institute of Laboratory Animal Resources, National Research Council, Washington, DC, 1996. The experimental protocols were approved by the Animal Care Committee of the University and following the Guide of the Care and Use of Experimental Animals.

Parasite and cysticercal antigens. The ORF strain of *T. crassiceps* (22) has been maintained by serial intraperitoneal passage in BALB/cAnN female mice since 1986 in our Institute. Parasites for infections were harvested from the peritoneal cavity of mice, 1–3 months after inoculation of 10 cysticerci per mouse as described (21).

Immunizations. In order to test the immunogenicity of the recombinant KETc1.6His, KETc12.6His and KETc7 peptides, mice were immunized with soluble extracts of different transgenic clones and wild-type embryogenic callus. Mice received one subcutaneous injection with doses of 200 or 1000 µg of total extract each in 200 µl without any adjuvant. One booster immunization was applied 15 days later.

Infections. Ten days after the last immunization, mice were intraperitoneally infected with 10 small (2 mm in diameter), non-budding cysticerci of *T. crassiceps* in 0.5 ml of PBS. To determine the level of protection, mice were killed 40 days after infection and the cysts inside their peritoneal cavity were harvested and counted (22). Organs inside the peritoneal cavity of each mouse were removed and carefully inspected to detect any remaining *T. crassiceps* larvae.

Statistical Analysis. Statistical comparison of individual parasite intensities between groups was performed by the Kruskal-Wallis non-parametric analysis of variance ANOVA test because many mice of the immunized groups contained zero parasites, and because parasite intensity is a discontinuous variable (i.e., 0, 1, 2, . . . n parasites). Data were considered statistically significant at $P < 0.05$.

Results

Production and selection of transgenic papaya clones. The pUI 235-5.1 transfer vector containing the kanamycin resistance gene driven by the NOS promoter (16) was employed. The KETc1.6His, KETc12.6His and KETc7 genes with the modified ATG context were driven by the CAMV35-35S promoter (Fig. 1). From one bombardment transformation experiment, 41 transgenic clones of embryogenic papaya calli were obtained by double selection on hygromycin and paromomycin medium. This selection system was devised in three steps applied to the bombardment of embryogenic calli to facilitate the selection of putative transgenic clones, a faster and more effective procedure than others previously reported (14). Transgenic clones were scored for transitory and stable β -glucuronidase activity, and propagated individually on separate plates for further analysis. The presence of each of the three different peptides (KETc1, KETc12 and KETc7) in transgenic clones was confirmed by PCR followed by gel electrophoresis of the amplified fragments (Figure 2A lanes e, f). Figure 2A shows the amplification of the products of expected sizes according to the positive controls (KETc1. 6His (163 bp), KETc12. 6His (154 bp) and KETc7 (544 bp), Fig 2A lane d). These products were not present in vector pUI 235-5.1 without insert and wild-type embryogenic calli (Fig 2, lanes b, c, respectively). The transcriptions of the encoding sequences were evaluated by RT-PCR, using total RNA from each transgenic clone (Figure 2B). Wild-type embryogenic callus was used as negative control (lane c). As indicated, some clones produced the transcript of expected sizes (lanes e, f). Of all the putative transgenic clones, 20 were confirmed by PCR and RT-PCR, (16 clones corresponding to KETc1.6His, two to KETc7 and two to KETc12.6His) and were used for further experiments.

Detection and estimation of transgene peptide content. Total protein extract of transgenic clones was analyzed by NuPAGE- 4-12% acrylamide gel (Invitrogen) to detect and quantify the expression of the transgenic peptides. Figure 3A shows clones 21p and 23p, which express the KETc7 peptide.

Densitometry analysis of the transgenic peptide band revealed that the expression level of the KETc7 protein was 2 and 1.5 % of the total protein extract. No detectable bands of the expected KETc1.6His or KETc12.6His sizes were observed (data not shown). Thus, detection of KETc1.6His and KETc12.6His peptides was performed by HPLC profiles. Prior to HPLC, the KETc1.6His synthetic peptide and those recombinant from the different transgenic clones were purified using Ni-NTA spin columns. KETc1.6His appeared at 9.76-9.82 min (Fig 3B). The relative concentration of each clone was determined considering the area under the curve in the HPLC profile. A dose-response curve was employed, using the respective synthetic peptides as control. Synthetically produced KETc12.6His was detected by HPLC both in the elution buffer as well as added to the non-transgenic extract. However, KETc12.6His did not bind to the Ni-NTA spin columns or to Ni-NTA magnetic agarose beads. Thus, it was not possible to confirm and quantify the presence of the peptide in the respective transgenic clones.

Antigenic properties of the transgenic clones. Anti-His (C-Term) HRP antibody (Invitrogen) and specific polyclonal sera, previously prepared in mouse against the cysticercal antigens, or sera from mice experimentally infected with cysticerci, were used to detect the transgenic clones. Microtitre plates were coated with both soluble extract of transgenic clones and wild-type embryogenic callus. Only the p₁KETc1₉ clone was significantly recognized by the Anti-His (C-Term) HRP antibody (Invitrogen) MoAb (OD = 0.9), which recognizes the conformational epitope of the six tail histidines (23). In contrast, no reaction was detected neither with the anti-penta His FA antibody (Sigma) nor with anti-cysticercus sera (data not-shown).

High protective capacity of some transgenic clones against the experimental model of cysticercosis. Subcutaneous immunization of mice with wild-type embryogenic callus of the three peptide transgenic clones significantly reduced the expected parasite load, more efficiently at a dose of 200 µg of soluble extract proteins per mouse. Different doses of KETc7 transgenic clones were tested. Table 1 shows that from the two pKETc7 papaya transgenic clones, only pKETc7₂₃ significantly

reduced the expected parasite load and induced total protection in 50 to 63% of the immunized mice, independently of the dose used. Thus, the lower dose was used to evaluate all the remaining selected transgenic clones. Table 2 shows that 11 out of 16 different clones that express KETc1.6 His significantly protected against murine cysticercosis. These clones also induced total protection in 60 to 90 % of immunized mice. The pKETc12₆ and pKETc12₇, expressing the KETc12 6His-tag peptide also importantly reduced the expected parasite load and, more interestingly, induced total protection in 80% of immunized mice. Immunization with wild-type embryogenic callus or with the different transgenic clones does not have an apparent adverse effect on mice growth or behavior.

Discussion

In this study transgenic papaya expressing peptides of interest in vaccination are produced for the first time. Papaya proved to be a useful system for this purpose. High efficiency of transformation and transgene detection was obtained after embryogenic papaya callus bombardment, since the transgene was detected in 50 % of the transformed clones. In fact, the constructions herein reported were also used for carrot transformation but the transgene was detected in only a few of the transformed clones (data not-shown). It is worth to mention that the three peptides expressed, which are of different sizes and sequences, maintained their protective capacity when tested against the experimental murine infection. These results indicate that papaya is a useful antigen delivery system for the development of new subunit vaccines. To the best of our knowledge, this is the first report on transgenic plants produced by bombardment DNA transformation with such small peptides.

Level of expression between 1.5 and 2% for KETc7 (21 and 23 clones, respectively) and up to 0.02 % for KETc1.6His of the total extract were obtained (Fig 3), which resemble levels reported by other studies using the same transformation procedure (24).

The histidine tail used to improve the screening of transgenic peptides(25) was successfully used to confirm the presence of KETc1.6His in HPLC peak eluted at 9.76-9.82 min. However, this strategy was not useful for KETc12.6His detection. In contrast to KETc1.6His, the histidine tail of KETc12 was not bound to Ni-NTA column. We speculate that the highly hydrophobic 8 aa KETc12 peptide which

includes 4 Leu, could interfere with the histidine-Ni interactions. Thus, albeit KETc12.6His synthetically produced can be efficiently detected by HPLC we were not able to confirm its presence by previous Ni adsorption. The lack of KETc12.6His peptide detection is probably due to the low level of expression in the transgenic clones. KETc12 can be efficiently detected by HPLC we were not able to confirm its presence by previous Ni adsorption. However, since the presence of the KETc12 transgene was identified in the two transformed clones by PCR, RT-PCR and by their protective capacity, we assume that the peptide was already translated although at an undetectable level of expression. With respect to the antigenic properties of the transgenic papayas, only the p₁KETc1₉ clone was detected by means of anti-histidine antibodies. No clones were detected by antibodies produced by the cysticercal antigens, probably due to a very low peptide expression plus low levels of specific antibodies in the sera of infected mice. Considering the poor capacity of these peptides to elicit the high levels of specific antibodies previously described (7, 8) we were not able to detect the peptides in the transgenic clones using more specific antisera. In addition, antigenic changes could be promoted by the histidine tail. used to improve their detection in the case of the two smaller peptides (KETc1 and KETc12), and/or the result of interactions with other plant components.

In spite of the advantages to express vaccine products using the transgenic plants mentioned above, the low concentration of the expressed antigens constitutes an important limitation. For this reason, over the past decade important efforts have been directed to determine how to enhance expression levels of foreign genes in transgenic plants including the use of stronger promoters (26), and the chloroplast expression system (27).

Regardless of the low level of expression, only a low amount of plant extract was herein needed to elicit protection against murine cysticercosis, probably due to the high immunogenicity that remains in the transgenic peptides (Table 1). Subcutaneous immunization was used as a screening strategy to identify the most promising transgenic clones that include KETc1.6 His, KETc12.6 His and KETc7 peptides. Interestingly, as shown in Table 2, a remarkable protective capacity was induced by some of the transgenic papaya clones: 11 out of 16 KETc1.6 His transgenic clones induced high protection levels. Some of the clones induced almost complete resistance to the parasitosis.

Differences in vaccine efficiency between the clones tested for the same peptide could be related to the content and/or conformation exhibited by the peptide. The two transgenic clones (pKETc12₆ and pKETc12₇) that expressed the 8 aa KETc12 peptide, induced very high levels of protection. As expected, the lowest level of protection was induced by the pKETc7₂₃ transgenic clone as has been observed by the 96 aa KETc7 recombinant protein (28). Currently, we are investigating the immune response induced by the most promising vaccine candidates systemic and orally delivered. Even if the oral route with this transgenic papaya has not been tested yet, the natural bioencapsulation of the transgenic peptides within the cells protects them from degradation by gastrointestinal proteinases and allows their oral administration preserving their immunogenic properties. Another point that merits comment is that the high level of protection induced by the mentioned clones with such small peptides was achieved without the presence of any adjuvant, which emphasizes the efficiency of this new delivery system for subunit vaccines.

One concern about plant-based vaccine is the requirement of additional purification to avoid non-desirable effects from plant components which could certainly increase the costs of the biological products (29). Herein, it is also interesting the significant protection induced by the soluble proteins from papaya itself, with no apparent side effect, which increase the effectiveness of the papaya system in vaccination. The possibility of antigens shared between cysticerci and papaya was discarded since no cross-reactivity was detected between the two different sources of antigen (data not shown). The anthelmintic properties associated to papaya extracts could be involved in the protection observed herein (30).

In summary, this is a major contribution in the development of new vaccine expression and delivery systems. In addition, this plant-derived vaccine version represents a new tool of potential interest for human and pork cysticercosis prevention.

Acknowledgments

We acknowledge Valentin Mendoza, Elva Teresa Aréchiga Carvajal, Sergio Casas, Gerardo Arrellin, Martha Lara and Georgina Diaz for their technical support, Mercedes Baca for administrative support and Isabel Pérez Montfort for English correction of this manuscript, and the Ph. D. Degree Program in Biological Sciences at the Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, Mexico City, where Marisela Hernandez studies her P. D. degree. This research was partially supported by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), British Council, Dirección General de Personal Académico (DGAPA) (IN221905) and The Howard Hughes Medical Institute (55004134).

References

1. Lightowlers, M. N. (2003) *Act. Trop.* **87**, 129-135.
2. Kwa B. H & Liew, F. (1997) *J Exp Med.* **146**, 118-31.
3. Molinari, J. L., Soto, R., Tato, P, Rodriguez, D., Retana, A & Sepulveda, J. (1993) *Am. J. Trop Med Hyg.* **49**, 502-12.
4. Johnson, K.S., Harrison, G.B., Lightowlers, M.W., O' Hoy, K.L., Cogle, W. G., Dempster, R. P., Lawrens, S.B., Vinton, J.G., Heath, D. D & Rickard, M.D. (1989) *Nature.* **338**, 585-7.
5. Sciutto, E., Fragoso, G., Trueba, D., Montoya, R. M., Diaz, M.L., Govezensky, T., Lomeli, C., Tapia, G & Larralde, C. (1990) *Parasite Immunol.* **12**, 687-96.
6. Harrison, L.J., Garate, T., Bryce, D. M., Gonzalez, L. M., Foster-cuevas, M., Warmae, L.W., Onyango-Abuje, J. A & Parkhouse, M. (2005) *Trop Anim Health Prod.* **37**, 103-20.
7. Toledo, A, Larralde, C., Fragoso, G., Gevorkian, G., Manoutcharian, K., Hernandez, M., Acero, G., Rosas, G., Lopez-Casillas, F., Kubli-Garfias, C et al., (1999) *Infect. Immun.* **67**, 2522–2530.
8. Toledo A, Fragoso G, Rosas G, Hernandez M, Gevorkian G, Lopez-Casillas F, Hernandez B, Acero G, Huerta M, Larralde C et al. (2001) *Infect Immun.* **69**, 1766-1773.

9. Huerta M, de Aluja AS, Fragoso G, Toledo A, Villalobos N, Hernandez M, Gevorkian G, Acero G, Diaz A, Alvarez I, et al. (2001) *Vaccine*. **20**, 262-266.
10. Aluja., A. S., Villalobos, N. M., Nava, G., Toledo, A., Martinez, J.J., Plancarte, A., Rodarte, L.F., Fragoso, G. & Sciotto, E. (2005) *Vaccine*. **23**, 4062-9.
11. Manoutcharian, K., Díaz-Orea, A., Gevorkian, G., Fragoso, G., Acero, G., González, E., de Aluja., A., Villalobos, N., Gómez-Conde, E. & Sciotto, E. (2004) *Vet. Immunol. Immunophatol.* **99**, 11-24.
12. Mojica-Henshaw M. P., Francisco A. D., De Guzman F., Tigno X. T. (2003). *Clin Hemorheol Microcirc* **29**: 219-29.
13. Chen., M., Wang, P. & Maeda, E. (1987) *Plant Cell Reports*. **6**, 348-351.
14. Cabrera-Ponce, J. L., A. Vegas & Herrera-Estrella, L. (1995) *Plant Cell Reports*. **15**, 1-7.
15. Rosas, G., Cruz-Revilla, C., Fragoso, G., Lopez-Casillas, F., Perez, A., Bonilla .M. A., Rosales, R & Sciotto., E. (1998) *J. Parasitol.* **84**, 516–523.
16. Herrera-Estrella.
17. Cabrera-Ponce J. L., López, L., Assad-García, C., Medina-Arevalo, N., Maria Bailey, A & Luis Herrera-Estrella. (1997). *Plant Cell Reports*. **16**, 255-260
18. Christou P, Ford T. L & Kofron M (1992) *Trends in Biotechnology*. **10**, 239-246.
19. Shure M, Wessler S & Fedoroff N (1983). *Cell*. **35**, 225-233.
20. Lowry, O.H., Rosebrough, N. J., Farr, A.L & Randall, R.J. (1951). *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
21. Fragoso, G., Lamoyi, e., Mellor, A., Lomeli, Hernandez, M. & Sciotto, E. (1998). *Infect. Immun.* **66**, 760-4.
22. Freeman, R. S. (1962) *Can. J. Zool.* **40**, 969-990.
23. Lindner P, Bauer K, Krebber A, Nieba L, Kremmer E, Krebber C, Honegger A, Klinger B, Mocikat R & Pluckthun A (1997) *Biotechniques*. **22**, 140-9.
24. Streatfield. S. and Howard. J. A. (2003). *Int. J. Parasitol.* **33** 479–493
25. Menassa, R., Kennette, W., Nguyen, V., Rymerson, R., Jevnikar, A. and Brandle, J. (2004). *J. Biotechnol.* **108**: 179-183

26. Sala, F., Rigano, M., Barbante, A., Basso, B., Walmsley, A. & Castiglione, S. (2003). *Vaccine*. **21**, 803-808.
27. Gleba, Y., Klimyuk V & Marillonnet S. *Vaccine*. **18**, 2042-8.
28. Manoutcharian, K., Rosas, G., Hernandez, M., Fragoso, G., Aluja, a., Villalobos, N., Rodarte, L..F. and Sciutto, E. (1996). *J. Parasitol.* **82**: 250-4
29. Daniell, H., Streatfield, S. J. and Wycoff, K. (2001). *Trends Plant Sci.* **6**: 219-26
30. Stepek, G., Behnke, S. G., Buttle, J. M. and Duce I. R. (2004). *Trends Parasitol.* **20**: 322-7.

Figure Legends

Fig. 1. Schematic diagram of gene constructs. P: NOS promoter. NPT-II: plant-selectable kanamycin marker. T: NOS terminator. CAMV 35-35S promoter, with 1 as the first base of the ATG codon. L: P: peptide coding sequence; H: His-tag.

Fig. 2. Agarose gel electrophoresis showing bands generated by PCR amplification of DNA of two representative transgenic clones for KETc1.6His, KETc7 and KETc12.6His (A) and by the reverse transcription PCR amplification of the same clones (B). Lane a: VIII MW marker (Roche), lane b: pUI 235-5.1 vector without insert, lane c, wild-type embryogenic calli, lane d: synthetic peptide, lanes e, f: transgenic clones.

Fig. 3.

A. Detection of the KETc7 transgenic peptide in 4-12 % NuPAGE acrylamide gel (Invitrogen).

Densitometry analysis after staining indicates that KETc7 represents 2 and 1.5% of the total protein content in the pKETc1₂₁ and pKETc1₂₃ respectively. NT: non-transgenic papaya clone.

B. An HPLC profile of non-transgenic crude extract without or with the synthetic KETc1.6His eluted at 9.76-9.82 in a linear gradient is shown. An illustrative HPLC profile of the transgenic clones in which 0.02 % of the total protein content corresponds to pKETc1₉ is included

Table 1. Effective protection induced by subcutaneous immunization with transgenic embryogenic clones of papaya that express KETc7

Control	*1, 56, 135, 153, 203, 224, 245 ^a	**153 [62.5 – 228.4]	***0 ^A
Immunized with:			
200 ug/mouse			
Wild-type embryogenic callus	0, 1, 3, 10, 13, 25, 46, 54, 114 ^b	13 [0.96 – 58.2]	11 ^A
pKETc7 ₂₁	0, 0, 0, 0, 0, 1, 1, 63, 86, 209 ^b	0 [-17.7 – 107]	40 ^A
pKETc7₂₃	0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 1, 3, 12, 66^c	0 [-9.2 – 24.5]	63^B
1000 ug/mouse			
wild-type embryogenic callus	0, 0, 3, 16, 60, 88, 95, 151, 417 ^{a,b}	60 [-9.7 – 194.2]	22 ^A
pKETc7 ₂₁	0, 0, 0, 1, 2, 3, 4, 4, 49 ^b	2 [-5.2 – 19.2]	3 ^A
pKETc7₂₃	0, 0, 0, 0, 0, 2, 8, 73, 241, 249^{b,c}	1 [-15.3 – 129.9]	50^B

*Individual number of cysticerci recovered 40 days after challenge with 10 cysticerci per mouse. **Median [95% confidence limits]

***Percentage of totally protected mice

Different literals indicate the significant differences between parasite intensity (low-case letters) or the percentage of totally protected mice (capital letters) recovered in naïve vs immunized mice with wild-type embryogenic callus-or transgenic papaya clones and between the two different doses tested for each clone (P< 0.05).

Table 2. Effective protection induced by subcutaneous immunization with transgenic embryogenic clones of papaya that express KETc1.6His and KETc12.6His

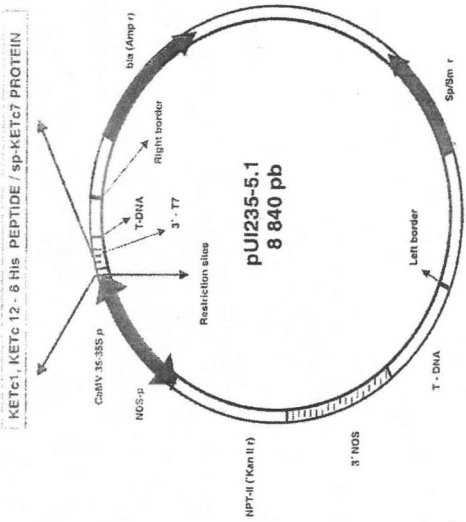
<i>Naive</i>	*26, 19, 31, 34, 39, 128, 139, 7, 93 ^a	34 [19.4 – 95.3]**	***0 ^A
Immunized with:			
Wild-type embryogenic callus	24, 10, 5, 30, 13, 0, 36, 22, 41, 1 ^b	17.5 [7.8 – 28.5]	10 ^A
<i>Transgenic clones</i>			
PKETc1 ₁	0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 1, 29, 127 ^c	0 [-13 – 44.4]	70 ^B
PKETc1 ₂	0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 2, 4, 83 ^c	0 [-8.6 – 24.8]	70 ^B
PKETc1 ₃	0, 0, 0, 0, 0, 0, 1, 1, 1, 5 ^c	0 [-0.3 – 1.9]	70 ^B
PKETc1 ₅	0, 0, 0, 0, 0, 0, 1, 1, 3, 3 ^c	0 [-0.1 – 1.5]	60 ^A
p ₁ KETc1 ₉	0, 0, 0, 0, 0, 1, 2, 4, 1, 1 ^c	1 [-0.02 – 2.0]	50 ^A
p ₂ KETc1 ₉	0, 0, 0, 0, 0, 1, 1, 1, 2, 3 ^c	1 [0.8 – 1.7]	50 ^A
PKETc1 ₁₁	0, 0, 0, 0, 0, 0, 2, 2, 3, 23 ^c	0 [-2.1 – 8.1]	60 ^A
PKETc1 ₁₂	0, 0, 0, 0, 0, 0, 1, 2, 43 ^c	0 [-5.1 – 14.3]	70 ^B
pKETc1 ₁₃	0, 1, 0, 0, 267, 226, 0, 17, 241, 0 ^b	0.5 [-8.8 – 159.2]	50 ^A
pKETc1 ₁₆	2, 0, 0, 0, 284, 0, 0, 0, 1, 190 ^b	0 [-25.4 – 120.8]	60 ^A
pKETc1 ₂₀	2, 3, 0, 0, 298, 102, 9, 16, 0, 0 ^b	2.5 [-26.2 – 110.2]	40 ^A
pKETc1 ₂₁	0, 0, 3, 1, 0, 100, 46, 0, 0, 0 ^b	0 [-8.7 – 38.7]	60 ^A
PKETc1 ₂₅	0, 0, 0, 18, 0, 0, 0, 0, 0, 0 ^c	0 [-2.3 – 5.9]	90 ^B
pKETc1 ₄₀	0, 3, 3, 0, 0, 116, 0, 162, 0 ^b	0 [-16.1 – 79.2]	55 ^A
PKETc1 ₄₁	2, 0, 0, 2, 0, 0, 0, 0, 0, 5 ^c	0 [-0.3 – 2.1]	70 ^B
pKETc1 ₆	0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 1, 2 ^c	0 [-0.1 – 0.7]	80 ^B
PKETc1 ₂₇	0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 1, 1, 1 ^c	0 [-0.04 – 0.58]	70 ^B

*Individual number of cysticerci recovered 40 days after challenge with 10 cysticerci per mouse.

**Median [95% confidence limits]

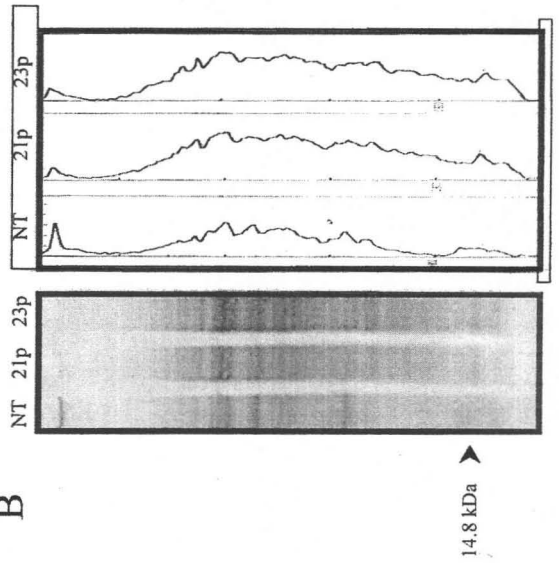
***Percentage of totally protected mice

Different literals indicate the significant differences between parasite intensity (low-case letters) and the percentage of totally protected mice (capital letters) recovered in naïve vs immunized mice with wild-type embryogenic callus-or transgenic papaya clones.

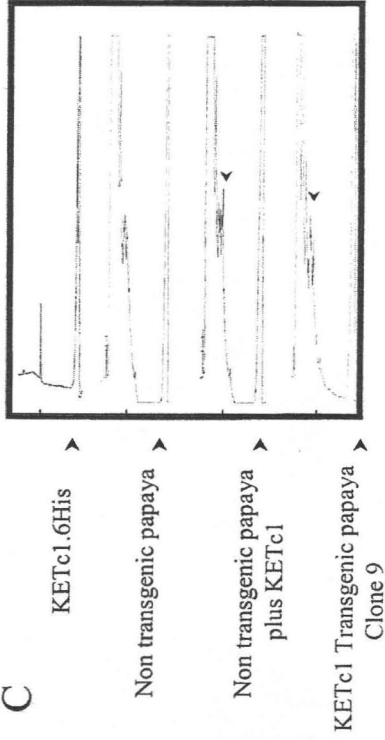


A

B



C



A

KETc1

K1 3 p 9 p

a b c d e f

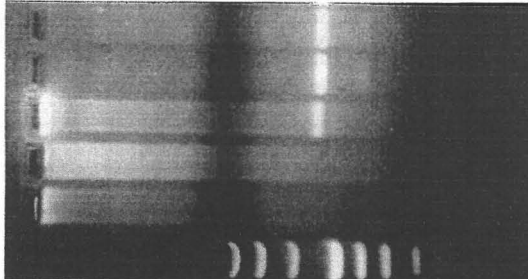


< 163 pb

KETc7

K7 21 p 23 p

a b c d e f

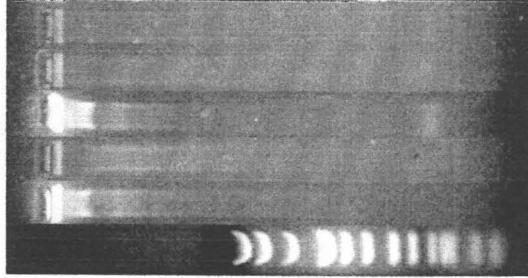


< 544 pb

KETc12

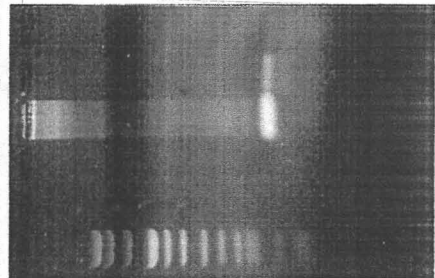
K12 6 p 7 p

a b c d e f

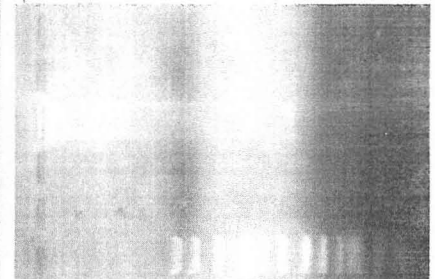


< 154 pb

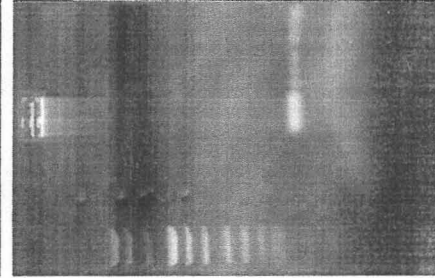
B



< 60 pb



< 294 pb



< 56 pb

10.2. Evaluación de nuevos sistemas para la expresión de vacunas subunitarias

El desarrollo de vacunas ha sido uno de los mayores logros de gran importancia de la inmunología y medicina para la prevención de enfermedades endémicas que afectan a la población. Las vacunas tradicionales fueron diseñadas con el uso de cepas de microorganismos vivos atenuados, inactivados o muertos, o sus productos tóxicos específicos que inducían las enfermedades (Stuart et al., 2001).

En las últimas décadas, y considerando los avances obtenidos en el área de la biotecnología se han dirigido importantes esfuerzos en desarrollar estrategias para reducir o evitar complicaciones asociadas a su uso. El uso de vacunas subunitarias evita el riesgo de una infección por accidente, o la reversión a un estado activo infeccioso (Stuart et al., 2001). Sin embargo, en la mayor parte de los casos los epítopes o proteínas aisladas presentan menor inmunogenicidad que los patógenos atenuados. Es por esta razón que se realizan numerosos esfuerzos para presentar las vacunas subunitarias aumentando sus propiedades inmunogénicas. Entre las últimas tecnologías utilizadas para este propósito figuran la presentación de las vacunas en forma de DNA, utilizando para su síntesis el propio organismo vacunado, el uso de diferentes sistemas acarreadores y adyuvantes para la presentación de antígenos recombinantes o sintéticamente producidos en contra de infecciones causadas por virus, bacterias o parásitos.

Los inmunógenos basados en péptidos sintéticos fueron utilizados por primera vez a principios de los años sesentas con el propósito de analizar las características estructurales de la antigenicidad (Sela et al., 1962). Sin embargo, hasta los años ochentas se logró la aplicación de una vacuna sintética en contra de la difteria (Audibert et al., 1982). Posteriormente, surgieron otro tipo de vacunas sintéticas empleando diferentes acarreadores y adyuvantes para incrementar su inmunogenicidad (Arnon, 1992; Stuart et al., 2001).

El uso de péptidos sintéticos para vacunación es una de las alternativas más atractivas por su simplicidad ya que están constituidas por pequeños péptidos y éstos a su vez por epítopes

del organismo en contra del cual se quiere obtener una respuesta inmune protectora (Brown, 1990). Si bien existen excepciones, el uso de vacunas de tipo sintético requiere de adyuvantes muy potentes debido a que son secuencias muy pequeñas y poco inmunogénicas.

En los últimos años, se han realizado importantes avances de la biotecnología e inmunología que están siendo utilizados para reducir los costos e incrementar la efectividad de las vacunas existentes (Hilleman, Leclerc & Ronco, 1998; Nieba & Bachmann, 2000). Estos incluyen el uso de antígenos asociados a sistemas acarreadores. Un sistema acarreador de vacuna debe permitir 1) la presentación de un gran repertorio de epitopes, mediante el arreglo de las secuencias de antígenos de uno o más agentes patógenos, y 2) el despliegue adecuado de los epitopes de tal modo que permitan obtener una respuesta inmune fuerte, de larga duración y protectora. Además requiere ser un sistema biológico de presentación estable capaz de resistir la degradación química y / o enzimática (Stuart et al., 2001)

Así los avances por entender los mecanismos de la respuesta inmune asociada a protección en contra de la cisticercosis pueden mejorar la S3Pvac. Considerando que la entrada del parásito comienza en la superficie de las mucosas la inducción de una respuesta local inmune efectiva puede ser de importancia en la protección del hospedero. De esta manera, los avances por mejorar la efectividad de la vacuna deben considerar el incremento de la respuesta celular sistémica y local.

Considerando el tamaño reducido de los péptidos de la S3Pvac, se ha recurrido al estudio de distintas alternativas de expresión obteniéndose resultados satisfactorios como estrategia para optimizar la producción de los péptidos en gran escala así como aumentar su capacidad inmunogénica, como se muestra en la Tabla 9.1.

Los fagos filamentosos recombinantes –virus que infectan a bacterias y que han sido modificados mediante ingeniería genética- ofrecen nuevas alternativas y amplias posibilidades para el diagnóstico y el desarrollo de vacunas moleculares que pueden utilizarse contra diferentes enfermedades. La técnica de despliegue en fagos (Phage Display) se basa en la

expresión de hasta 10^{11} péptidos o proteínas fusionadas a la superficie de fagos filamentosos. La primera técnica de "phage display" fue desarrollado con el bacteriófago específico de *Escherichia coli* (M13). Actualmente se han desarrollado numerosos sistemas de despliegue como el fago lambda λ y T4, y sistemas que incluyen virus de eucariotes (Sidhu, 2003). M13 consiste de una cadena sencilla circular de DNA rodeado de cinco diferentes proteínas de cobertura. La longitud del filamento se encuentra cubierta por 2700 copias de la mayor proteína de cubierta (pVIII) y está cerrada en los extremos por 4 ó 5 copias de cada una de las proteínas de menor cobertura pIII, pVI, pVII y pIX (Malik & Perham, 1997; Manoutcharian et al., 2001; Sidhu, 2003). La proteína se asocia frecuentemente a la proteína 3 de la cubierta viral (cpIII) o proteína 8 (cpVIII) sobre la superficie del bacteriófago filamentosos M13. Otro aspecto del Phage Display ha sido el desarrollo de un sistema basado en un gen que permite la expresión de fragmentos de DNA o cDNA, derivados de genes individuales o del genoma completo, fusionados a cpIII o cpVIII de M13.

Las bibliotecas de péptidos expresados en fagos (PDPL) fueron descritas por primera vez en 1990 y han sido utilizadas ampliamente para estudiar los aspectos moleculares de las interacciones entre antígeno-anticuerpo, proteína-proteína y ligando-receptor. Una característica interesante de las PDPL es la posibilidad de seleccionar tanto epítopes originales relacionados al antígeno como mimótopos, péptidos que mimetizan funcionalmente al antígeno original sin compartir homología de secuencia con el epítipo de antígeno original (Manoutcharian et al., 2001).

Entre las principales ventajas de la inmunización en diferentes modelos animales con fagos, se ha observado una importante capacidad para generar una respuesta inmune sin el uso de adyuvantes.

Grupo experimental		Dosis ¹	No. de cisticercos ^a	Intensidad ^b	%Protección ^c
FAGOS	Controles		483, 781, 299, 370, 483	483	
	Inmunizados con:				
	M13	5 X 10 ¹⁰	5, 17 51, 82, 154, 156, 164	82	81.5
	CPhV	5 X 10 ¹⁰	0,0,0,0,0,3,7,144,143,288	1.5	87.9 (5/10)
	M13	5 X 10 ¹¹	1,7,7,8,8,19,36,79,80,110	13.5	92.7
CPhV	5 X 10 ¹¹	0,0,1,2,3,3,3,5,8,60,106	3	96.5 (2/11)	
PLANTAS TRANSGÉNICAS	Inmunizados con papaya:				
	No transgénica	200 µg	0,1,46,25,13,3,114,54,10	13	(1/9)
	9p (KETc1)	200 µg	0, 0, 1, 4, 2, 1, 0, 0, 1, 0	1	96.6 (5/10)
	No transgénica	1000 µg	0,3,16,151,88,60,0,95,417	60	(2/9)
9p (KETc1)	1000 µg	0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 1	0	99.9 (9/10)	

^a Número individual de cisticercos recuperados 30-45 días después de la infección de cada ratón.

^b Mediana (intervalo de confianza 95%). ^c Porcentaje de protección con respecto a los controles (Número de ratones totalmente protegidos)

¹ Dosis empleada en cada sistema por ratón experimental

Tabla 9.1. Evaluación de la capacidad protectora realizada en experimentos independientes, del péptido KETc1 administrado en sistemas diferentes de expresión como estrategia para optimizar una nueva versión de vacuna expresada en fagos filamentosos y plantas transgénicas. En este sentido se han obtenido importantes avances expresando los péptidos vacunales en estos sistemas. Los péptidos expresados en fagos filamentosos recombinantes (M13) inducen altos niveles de protección en contra de la cisticercosis experimental murina y porcina (Manoutcharian et al., 2004). KETc1 y KETc12 han exitosamente sido expresados en papayas transgénicas habiéndose obtenido resultados preliminares que señalan la alta inmunogenicidad de esta forma de expresión de los péptidos vacunales (Hernandez et al., sometido a publicación).

Entre otros sistemas de presentación de vacunas subunitarias que ha comenzado a ser explorado figuran las plantas transgénicas. La integración del gen de un antígeno de interés en el genoma de la planta pretende la producción de extractos crudos o proteínas purificadas, que al ser administrados vía oral o parenteral promuevan una respuesta inmune sistémica y/o local (Sala et al., 2003). La selección de la especie de planta (y el tejido donde se acumula la proteína) considera generalmente la forma de aplicación de la vacuna. Los primeros estudios se realizaron en tabaco y papa, y recientemente se ha comenzado el uso de tomate, lechuga, maíz, entre otros (Walmsley et al., 2000). El primer trabajo de un antígeno vacunal en plantas se realizó en 1990, con la expresión de la proteína A de superficie de *Streptococcus mutans* (SpaA) en tabaco. Posteriormente, han proseguido trabajos de expresión de antígenos protectores de patógenos bacterianos y virales en plantas como el antígeno de superficie de hepatitis B (HbsAg) (Kapusta et al., 1999; Walmsley et al., 2000), la enterotoxina termolábil de *E.coli*

causante de la diarrea , las glicoproteínas del virus de la rabia (Walmsley et al., 2000). También se ha comenzado el desarrollo de una vacuna contra el cáncer mediante la integración del plásmido que contiene un poli-epitope aislado de melanoma humano en DNA de cloroplasto de tabaco (Firat et al., 1999; Walmsley et al., 2000).

La cantidad de proteína presente en el tejido de la planta constituye un parámetro de importancia ya que tiene efecto en la dosis de vacuna empleada y por lo tanto, en la respuesta inmune asociada. Por lo que se han realizado estudios dirigidos a incrementar el nivel de expresión y acumulación del antígeno a un nivel adecuado (Walmsley et al., 2000; Ma et al., 2001). Se ha visto la influencia del sitio de integración del gen en la acumulación del epitope en la planta. La integración del gen en el DNA nuclear ocurre de forma aleatoria en el sitio cromosomal mientras que la integración en el DNA circular de cloroplasto (cpDNA) permite la integración sitio-específica (Daniell et al., 2001). La integración en cpDNA permite dirigir la secuencia foránea mediante el uso de secuencias flanqueadoras lo que elimina la variabilidad en la expresión del gen e incrementa la expresión de la proteína recombinante (46% de la proteína total soluble, comparado con el 0.01-0.4% en genes insertados en núcleo) (Sala et al., 2003). Tanto el genoma nuclear como el de cloroplastos acepta insertos en gran número y tamaño (Daniell et al., 2001).

Distintos agentes infecciosos tienen acceso al organismo a través de las membranas de mucosas. Por lo tanto, se busca la inducción de inmunidad local a través de la vacunación oral. Sin embargo, un obstáculo se presenta por la digestión de la proteína antigénica en el estómago. Las vacunas expresadas en plantas evitan este problema debido al efecto protector que ejerce la pared celular; ésta permite la salida gradual del antígeno a la superficie de las mucosas. Además se presentan problemas asociados a una baja inmunogenicidad o la inducción de tolerancia en la vacunación oral. Se ha visto el uso de moléculas acarreadoras como una estrategia para inducir una respuesta inmune efectiva (Lee et al., 2000; Yu et al., 2001). También el empleo de plantas transgénicas en vacunación es capaz de inducir una respuesta inmune sistémica y humoral (Kong et al; Yu et al., 2001).

Los numerosos estudios realizados en el desarrollo de vacunas derivadas de plantas transgénicas sugieren fuertemente el empleo de estos sistemas en los próximos años. Sin embargo, se requieren de más estudios que permitan demostrar si cumplen con los estándares de calidad definidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS).

Con respecto a los resultados preliminares de la capacidad protectora inducida por los péptidos vacunales anti-cisticercosis expresados en el fago recombinante (M13) y papaya transgénica (Tabla 9.1.), durante mi trabajo de maestría pretendo identificar algunas de las características fisicoquímicas y los mecanismos inmunológicos asociados a la protección inducida por la vacunación con los péptidos KETc1 y KETc12 asociados a estos sistemas, utilizando el modelo de cisticercosis murina.