



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**CARACTERIZACIÓN DE LAS PROPIEDADES INMUNOGÉNICAS  
DEL PÉPTIDO VACUNAL KETc1 ADMINISTRADO EN  
DIFERENTES SISTEMAS DE EXPRESIÓN EMPLEANDO  
UN MODELO DE CISTICERCOSIS MURINA**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS  
P R E S E N T A :**

**Q.A. JACQUELYNNE BRENDA CERVANTES TORRES**

**DIRECTOR DE TESIS: Dr. Enrique Ortega Soto**



**MEXICO, D.F.**

**2011**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Posgrado en Ciencias Bioquímicas, Universidad Nacional Autónoma de México.

A las Dras. Edda Sciutto Conde y Gladis Fragoso, ambas por compartir sus conocimientos y brindarme su apoyo y confianza.

Al Dr. Enrique Ortega Soto por el apoyo incondicional otorgado para poder realizar mis estudios.

Al Biol. Exp. Gonzalo Acero, MVZ Georgina Díaz, y Dra. Marisela Hernández por su apoyo técnico.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo recibido en la otorgación de la beca para realizar mis estudios (Registro de beca 200757).

Este trabajo fue financiado por los siguientes proyectos:

PAPIIT número IN-221905 denominado “Evaluación de la capacidad inmunopotenciadora de los péptidos que constituyen la S3Pvac en modelos experimentales, infecciosos y tumorales e identificación de los mecanismos”

CONACyT número 62471-M denominado “Desarrollo de una vacuna oral contra *Taenia solium* y *Taenia saginata*: una nueva herramienta para el control de teniasis / cisticercosis”.

## **DEDICATORIAS**

A mis grandes amores RENÉ Y VALERIA, quienes han llenado de alegría mi vida y me alientan a ser mejor persona cada día.

A mi mamá SONIA, quien me ha otorgado el mejor ejemplo de honestidad y lucha constante. Y sobretodo por ser la mejor mamá y amiga. Te Quiero Mucho!!!

A mis hermanas KARLA y CHRIS, por apoyarme y demostrarme que a pesar de los momentos difíciles siempre estaremos juntas.

## CONTENIDO

|  |    |
|--|----|
| 1. RESUMEN   | 1  |
| 2. GLOSARIO  | 2  |
| 3. INTRODUCCION  | 3  |
| 4. ANTECEDENTES  | 10 |
| 4.1 Proteína polimérica bacteriana lumazina sintetasa de <i>Brucella</i>           | 11 |
| 4.2 Proteínas de superficie de fagos filamentosos                                  | 12 |
| 4.3 Expresión de antígenos vacunales en plantas transgénicas                       | 16 |
| 5. OBJETIVOS   | 22 |
| 6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL   |    |
| 6.1 Estrategia experimental  | 23 |
| 6.2 Procedimiento  | 23 |
| 7. RESULTADOS  |    |
| 7.1 Inmunización sistémica   | 30 |
| 7.2 Inmunización oral  | 34 |
| 7.3 Estudio comparativo de la capacidad protectora                                 | 38 |
| 7.4 Avances en la caracterización de las propiedades inmunogénicas de los péptidos | 42 |
| 8. DISCUSIÓN   | 50 |
| 9. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS   | 57 |
| 10. BIBLIOGRAFÍA   | 58 |
| 11. APÉNDICES  | 70 |
| 11.1 Dot plot representativos de la respuesta inmune celular                       |    |
| 11.2 Artículo desarrollado en colaboración durante el trabajo de tesis             | 80 |

### I.

Hernández M., Cabrera-Ponce JL., Fragoso G., López-Casillas F., Guevara-García A., Rosas G., León-Ramírez C., Juárez P., Sanchez-García G., Cervantes J., Acero G., Toledo A., Cruz C., Bojalil R., Herrera-Estrella L., Sciutto E (2007). A new highly effective anticysticercosis vaccine expressed in transgenic papaya. *Vaccine* 25(21):4252-60

## LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabla 1.</b> Inducción de inmunidad protectora contra cisticercosis  | 7  |
| <b>Figura 1.</b> Estructura de bacteriófago que muestra la hebra de DNA y las proteínas de cubierta   | 14 |
| <b>Tabla 2.</b> Promotores empleados en la expresión de proteínas recombinantes en plantas  | 20 |
| <b>TABLA 3A.</b> Capacidad protectora del péptido KETc1 administrado en proteína quimérica BLS  | 31 |
| <b>TABLA 3B.</b> Capacidad protectora de la vacuna CPhV   | 32 |
| <b>TABLA 3C.</b> Evaluación de las clonas transgénicas que expresan el péptido KETc1  | 33 |
| <b>FIGURA 2.</b> Evaluación de la capacidad protectora inducida por vacunación oral aplicando 3 dosis de KETc1 asociada a la proteína quimérica BLS | 35 |
| <b>FIGURA 3.</b> Evaluación del número de dosis en la protección inducida por inmunización oral con KETc1 asociada a la proteína quimérica BLS      | 36 |
| <b>FIGURA 4.</b> Evaluación de la capacidad protectora inducida por inmunización oral de KETc1 asociado a la proteína III del fago filamentoso M13  | 36 |
| <b>FIGURA 5.</b> Evaluación de la capacidad protectora inducida por inmunización oral de KETc1 expresado en callos embriogénicos de papaya          | 38 |
| <b>TABLA 4 (A-D).</b> Comparación de la capacidad protectora de KETc1 inducida por vacunación subcutánea u oral                                     | 41 |
| <b>TABLA 5.</b> Porcentaje de proliferación en linfocitos CD4 o CD8   | 42 |
| <b>FIGURA 6.</b> Incremento en la proliferación asociada a inmunización subcutánea en células de bazo   | 44 |
| <b>FIGURA 7 (A-H).</b> Incremento en la proliferación asociada a inmunización oral en células de bazo y Placas de Peyer                             | 46 |

**FIGURA 8.** Niveles de anticuerpos IgG específicos anti-KETc1 detectados en suero de ratones inmunizados vía sistémica u oral 48

**FIGURA 9.** Niveles de anticuerpos IgA específicos anti-KETc1 detectados en suero de ratones inmunizados vía sistémica u oral 49

## 1. RESUMEN

El uso de vacunas sintéticas para vacunación es una de las alternativas más atractivas por su simplicidad ya que están constituidas por pequeños péptidos que representan epítopes del organismo en contra del cual se pretende obtener una respuesta inmune protectora. Sin embargo, el uso de péptidos como vacunas requiere de la adición de adyuvantes eficientes en la formulación para aumentar su inmunogenicidad que frecuentemente resulta insuficiente. Con este propósito, en los últimos años, se han explorado nuevos sistemas de presentación de antígenos que permiten aumentar la inmunogenicidad de las vacunas subunitarias y simultáneamente proveer de sistemas de producción de bajo costo.

En este trabajo de tesis, se evaluó el potencial de distintos sistemas de expresión de antígenos utilizando a uno de los péptidos (KETc1) de la vacuna anti-cisticercosis S3Pvac y el modelo experimental de cisticercosis murina. KETc1 producido sintéticamente (KETc1) y expresado en fagos filamentosos (K1M), en clones embriogénicas de papaya transgénica (pKETc1), y como quimera asociado a lumazina sintetasa (BLS-KETc1) fueron administrados en forma oral o subcutánea. Los diferentes inmunógenos indujeron altos niveles de protección con algunas excepciones, K1M y KETc1 no protegieron cuando se administraron sistémica u oralmente, respectivamente. KETc1 expresado en callos embriogénicos de papaya y en la proteína lumazina sintetasa fueron los más eficientes en inducir una respuesta efectiva en contra de la cisticercosis murina. La inmunización subcutánea y/o oral con las construcciones más protectoras indujeron un incremento en la proliferación de CD4<sup>+</sup> y de células CD8<sup>+</sup> tanto en bazo como en Placas de Peyer. La inmunización oral con los distintos sistemas produjo un incremento significativo en los niveles de IgG en suero que no se asociaron con las diferencias en la protección inducida.



## 2. GLOSARIO

|           |  |
|-----------|--|
| aa        | Aminoácidos                                    |
| APC       | Célula presentadora de antígeno                |
| BLS       | Proteína lumazina sintetasa de <i>Brucella</i> |
| cDNA      | DNA complementario                             |
| cpDNA     | DNA circular de cloroplasto                    |
| CPhV      | Vacuna de fago anti-cisticercosis              |
| Fc        | Fracción cristalizable de inmunoglobulinas     |
| i.e.      | Indice de estimulación                         |
| IFN-g     | Interferon gamma                               |
| Ig        | Inmunoglobulina                                |
| IL-       | Interleucina                                   |
| K1M       | KETc1 asociado al fago filamentoso M13         |
| kDa       | kiloDalton                                     |
| LB        | Linfocitos B                                   |
| LT        | Linfocitos T                                   |
| M13       | Fago filamentoso que infecta a <i>E.coli</i>   |
| NC        | Neurocisticercosis                             |
| OD        | Densidad óptica                                |
| PBS       | Amortiguador de fosfatos/salina                |
| PBS-BSA   | PBS-albúmina sérica bovina                     |
| cpIII     | Proteína 3 de superficie de M13                |
| PP        | Placas de Peyer                                |
| cpVIII    | Proteína 8 de superficie de M13                |
| RPMI 1640 | Medio de cultivo para células eucarióticas     |
| S3Pvac    | Vacuna sintética anti-cisticercosis            |
| TLR       | Receptor de célula dendrítica/macrófago        |

### 3. INTRODUCCIÓN

La cisticercosis causada por el estado larvario de *Taenia solium* es una enfermedad parasitaria que afecta frecuente y gravemente la salud humana y la porcicultura rústica. Esta enfermedad se encuentra profundamente arraigada en países en vías de desarrollo donde prevalecen condiciones que favorecen su transmisión (Cao et al., 1997; Sciutto et al., 2000; Sotelo et al., 1996). Dentro de las zonas más afectadas se encuentran Latinoamérica, África y Asia. 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. En países europeos occidentales, la cisticercosis ha sido controlada progresivamente y finalmente erradicada a través de programas efectivos de control aunados al avance económico y social. Sin embargo, se han reportado nuevos casos en países desarrollados debido al incremento de inmigrantes provenientes de zonas endémicas, los cuales son portadores del estado adulto del parásito (Sotelo and Del Brutto, 2000).

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 es 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). En el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía de México, estudios de prevalencia hospitalaria mostraron que entre 1995 y 2001, la neurocisticercosis fue la novena causa de mortalidad hospitalaria y la quinta causa de morbilidad hospitalaria (Jiménez et al., Velasquez et al., 2004). Además, en dos estudios epidemiológicos realizados en comunidades rurales de Puebla y Morelos se encontró entre el 9.1 y 9.6% de los habitantes afectados por

NC de entre las más de 600 tomografías axiales computarizadas realizadas (Fleury et al., 2003, 2006).

El impacto de esta parasitosis en la salud humana así como sus repercusiones socioeconómicas en la porcicultura en México, requiere de la implementación de diversas medidas de intervención para su control que requieren aplicarse de manera simultánea y sostenida. Para este propósito se han realizado estudios para desarrollar las herramientas necesarias para su control en el área del diagnóstico, tratamiento y la prevención.

Los conocimientos adquiridos nos han permitido proponer y comenzar a implementar programas de educación en materia de salud pública que pretenden aumentar el conocimiento sobre la importancia de la enfermedad así como los riesgos que implican la falta de higiene y el consumo de carne de cerdo contaminada con cisticercos. También se ha propuesto dirigir las intervenciones a la detección y tratamiento de personas portadoras de tenias y de los hospederos intermedios (Sarti et al., 1997; 2000; Roman et al., 2000; Boa et al., 2003; Eddi et al., 2003). Sin embargo, pocos avances se han observado a este nivel debido a las condiciones económicas y sociales en que subyace la transmisión por lo que los estudios dirigidos a disminuir la prevalencia de esta parasitosis se han enfocado en el uso de desarrollos biotecnológicos como la vacunación. Debido a que el cerdo es un hospedero esencial para mantener el ciclo de vida del parásito se ha considerado el desarrollo de vacunas contra la cisticercosis porcina con el propósito de interrumpir el ciclo de vida del parásito debido a que se ha demostrado en diferentes cestodos la susceptibilidad de etapas larvarias tempranas a la inmunidad (Nascimento et al., 1995; Molinari et al., 1997; Huerta et al., 2001; Plancarte et al., 1999; Lightowers et al., 1999, 2000; Sciutto et al., 1990, 2002; Cai et al., 2001; Guo et al., 2004; Manoutcharian et al., 2004; Flisser et al., 2004; Gonzalez et al., 2005). La disminución de la incidencia de la parasitosis en el cerdo a través de la vacunación ofrece ciertas ventajas

sobre los distintos programas de prevención ya que no requiere modificar las condiciones socioeconómicas en las que subyace esta enfermedad; implica una disminución de pérdidas importantes al productor debidas a cerdos cisticercosos y 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 (Morales, 2003).

Considerando las dificultades económicas y experimentales que presenta la investigación con cerdos en la evaluación de inmunógenos de interés para el desarrollo de una vacuna, nuestro grupo de trabajo ha empleado un modelo experimental de cisticercosis murina causada por el cisticerco de *Taenia crassiceps* basado en la similitud en la morfología y la composición antigénica entre ambos cestodos (Gemmell, 1969; Larralde et al., 1989; Garcia-Allan et al., 1996, Lightowlers et al., 2003). Además la conservación de diversos antígenos en los diferentes estadios de los cestodos ha permitido proponer el uso de antígenos heterólogos como vacunas (Larralde et al., 1989; Plancarte et al., 1999; Rosas et al., 2002). Adicionalmente, *T. crassiceps* presenta la ventaja de que se reproduce rápidamente por gemación polar múltiple en la cavidad peritoneal de ratones en algunas semanas, ofreciendo así un modelo que nos permite evaluar antígenos de vacunación en forma accesible y controlada y una fuente de producción de antígenos en forma masiva.

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, 8 mostraron un efecto significativo en la reducción de la carga parasitaria en ratones inmunizados con respecto a los controles. De éstas se seleccionaron 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 (Tabla 1), además 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 (Manoutcharian et al., 1995).

Con el propósito de disponer de cantidades adecuadas de estas fracciones para su empleo extenso en programas de vacunación, se decidió producirlos mediante técnicas de DNA recombinante. Para esto, se construyó una librería de cDNA en el bacteriófago  $\lambda$ ZAP empleando mRNA aislado de cisticercos de *Taenia crassiceps*, seleccionando trece clonas que fueron identificadas por medio de inmunodetección empleando anticuerpos policlonales específicos en contra de las fracciones antigénicas protectoras de 56, 74 y 66 kDa. De las clonas identificadas se seleccionaron aquellas que también fueron reconocidas por sueros de cerdos infectados con cisticercos de *T. solium*, con el fin de asegurar que las clonas codificaban para antígenos compartidos por ambos céstodos. Las clonas se denominaron KETc1, KETc4, KETc7, KETc11 y KETc12 (Manoutcharian et al., 1995, 1996). Los antígenos codificados por estas clonas se evaluaron en el modelo murino encontrándose diferentes niveles de protección en cuatro de las clonas utilizadas (KETc1, KETc4, KETc7 y KETc12). Posteriormente, con base en las secuencias de los antígenos recombinantes denominados KETc1, KETc7 y KETc12, se procedió a identificar las secuencias inmunogénicas de éstos basándose en las regiones hidrofóbicas de acuerdo al método descrito por Hoop y Woods (1981). Así se encontraron los epítopes GK1, KETc1 y KETc12, cuya capacidad protectora ha sido evaluada encontrándose diferentes niveles de protección contra la cisticercosis murina (Toledo et al; 1999, 2001) y porcina (Huerta et al., 2001) (Tabla 1). Las características de los antígenos que indujeron mayor protección son los siguientes:

1) KETc7, pertenece a la clona que proviene de la fracción de 56 kDa y corresponde a un antígeno de 97 aminoácidos (aa) con un alto contenido de prolinas y ha demostrado ser protector en contra de la cisticercosis murina (Manoutcharian et al., 1996). Además ha mostrado ser capaz de inducir protección por vacunación con DNA (Rosas et al., 1998; Cruz-Revilla et al., 2000). El análisis de secuencia permitió realizar una predicción teórica de las regiones de mayor antigenicidad identificándose la secuencia denominada GK1. Este péptido de 18 aminoácidos (aa) es capaz de inducir anticuerpos anti-GK1 que reaccionan con el péptido (Díaz-Orea et al., 2003) y con el antígeno de *T. crassiceps* sin la necesidad de un acarreador. GK1 también induce la proliferación de células CD8+ y en menor proporción de células CD4+ inducidas con el péptido solo o con antígeno total de *T. crassiceps* (Toledo et al., 1999). El perfil de citocinas realizado en el sobrenadante de las células estimuladas muestra la producción de altos niveles de interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) y bajos niveles de interleucina 4 (IL-4) (Toledo et al., 1999).

Tabla 1. Inducción de inmunidad protectora contra cisticercosis (tomado de Sciutto et al., 2002)

|   | Ratón <sup>b</sup>          |                | Cerdo <sup>c</sup> |                  |
|---|-----------------------------|----------------|--------------------|------------------|
|   | Control                     | Vacunado       | Control            | Vacunado         |
| Inmunizados con                         |                             |                |                    |                  |
| <i>T. crassiceps</i> (extracto total)   | 25.8 $\pm$ 1.9 <sup>a</sup> | 0              | 519 $\pm$ 49.2     | 216.8 $\pm$ 53.8 |
| <i>T. solium</i> (extracto total)       | 25.8 $\pm$ 1.9              | 1.0 $\pm$ 0.01 | ND                 |                  |
| <i>T. crassiceps</i> (fluido vesicular) | 38.1 $\pm$ 6.7              | 14.3 $\pm$ 7.2 | 5 $\pm$ 0.85       | 2.5 $\pm$ 1.2    |
| 56+66+74kDa fracciones Ag Tc.           | 38.1 $\pm$ 6.7              | 9.7 $\pm$ 6.6  | 5 $\pm$ 0.85       | 0.2 $\pm$ 0.17   |
| KETc1r                                  | 28.2 $\pm$ 18.4             | 6.6 $\pm$ 4.7  |                    |                  |
| KETc1s                                  | 25.1 $\pm$ 1.5              | 2.6 $\pm$ 1.2  |                    |                  |
| KETc12r                                 | 28.2 $\pm$ 18.4             | 4.4 $\pm$ 5.3  |                    |                  |
| KETc12s                                 | 25.1 $\pm$ 1.5              | 7.8 $\pm$ 3.1  |                    |                  |
| KETc7r                                  | 28.2 $\pm$ 18.4             | 7.6 $\pm$ 7.6  |                    |                  |
| GK1s                                    | 25.1 $\pm$ 1.5              | 1.2 $\pm$ 0.7  |                    |                  |
| GK1s + KETc1s + KETc12s                 |                             |                | 66565 <sup>d</sup> | 1369             |

<sup>a</sup> Media  $\pm$  SD de cisticercos recuperados. El número de animales desafiados en los grupos experimentales varía entre 7-15. <sup>b</sup> ratones desafiados con 10 cisticercos de *T. crassiceps* y <sup>c</sup> cerdos con 10<sup>5</sup> huevos de *T. solium* recuperados de diferentes tenias. <sup>d</sup> Total de cisticercos recuperados en evaluación de campo con un total de 120 cerdos controles y 120 vacunados. r: recombinante, s: sintética

2) KETc1, pertenece a la clona que proviene de la fracción de 56 kDa y es un antígeno recombinante que contiene una secuencia inmunogénica de 12 aa (Manoutcharian et al., 1996). Este péptido induce altos niveles de protección contra la cisticercosis murina. La evaluación de la respuesta inmune inducida por la administración del péptido KETc1 muestra la producción de niveles bajos de anticuerpos y una respuesta celular exacerbada. La determinación de citocinas intracelulares en células estimuladas *in vitro* muestra un incremento en el nivel de citocinas de tipo inflamatorio IFN- $\gamma$  e IL-2 (Toledo et al., 2001).

3) KETc12, pertenece a la clona que proviene de la fracción de 74 kDa y es un antígeno recombinante de 8 aa altamente hidrofóbico y capaz de inducir protección (Toledo et al., 2001). Además de la inmunidad específica inducida por la inmunización con KETc12, este antígeno es capaz de inducir una respuesta inflamatoria temprana incrementando la expresión de TLR3 y TLR4 en macrófagos derivados de médula ósea. Esta respuesta puede mejorar sus propiedades inmunogénicas (Pablo, 2007).

Se ha demostrado la presencia de las secuencias que codifican para estos péptidos así como su expresión en *Taenia saginata* y *Echinococcus granulosus*. El análisis de secuencias de DNA entre los distintos cestodos muestra una homología para KETc1 >85% y para GK1 >90% (Rassy et al., 2010).

Con base en los estudios anteriores, se desarrolló una versión de vacuna sintética, S3Pvac, que está constituida por los tres péptidos KETc1, KETc12 y GK1. S3Pvac ha sido evaluada en el campo encontrando una reducción del 50% en el número de cerdos infectados y del 98% en el número de parásitos instalados (Huerta et al., 2001). Por otro lado, se evaluó la capacidad inmunogénica de la vacuna aplicada en cerdos bajo condiciones sanitarias adecuadas encontrándose un incremento significativo en la producción de citocinas Th1 (IL-2 e IFN- $\gamma$ ) en células mononucleares de sangre periférica (PMBC's) estimuladas con los

péptidos individuales así como niveles de anticuerpos incrementados contra los diferentes péptidos desde tiempos tempranos posteriores a la inmunización (Díaz et al., 2003). Además se ha demostrado que la vacuna tiene propiedades terapéuticas siendo capaz de destruir los cisticercos instalados en forma experimental (de Aluja et al., 2005).



#### 4. ANTECEDENTES

Considerando la relevancia de disminuir los costos de producción de esta versión sintética de la vacuna S3Pvac manteniendo o aumentando la capacidad protectora se han contemplado diferentes estrategias que incluyen el uso de adyuvantes y/o antígenos asociados a sistemas acarreadores (Hilleman; Leclerc & Ronco, 1998; Nieba & Bachmann, 2000). Entre los adyuvantes más empleados como acarreadores o co-administrados con una gran variedad de antígenos se encuentran la subunidad B de la toxina termolábil de *E.coli* (LTB) y *V.cholerae* (CTB). Su estructura permite dirigir los antígenos hacia la superficie de mucosas a mediante su unión con gangliósidos GM1 localizados en células epiteliales de la mucosa lo que permite una presentación más eficiente del antígeno y de esta manera induce una respuesta inmune efectiva (Yu and Langridge., 2001; Rigano et al., 2003; Holmgren et al., 2003, 2005). Sin embargo, se han encontrado efectos tóxicos asociados al empleo de estos adyuvantes y/o al uso de conservadores en vacunas (Offit and Jew, 2003).

Para considerar un sistema acarreador con el propósito de expresar antígenos vacunales el sistema debe permitir 1) la presentación de un gran repertorio de epítopes, mediante el arreglo de las secuencias de antígenos de uno o más agentes patógenos, y 2) el despliegue adecuado de los epítopes de tal modo que permitan obtener una respuesta inmune protectora exacerbada y de larga duración. Además requiere ser un sistema biológico de presentación estable capaz de resistir la degradación química y / o enzimática (Stuart et al., 2001). 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 inmune humoral y celular sistémica y local.

En nuestro grupo de investigación se decidió explorar diferentes sistemas de presentación de los antígenos que constituyen la S3Pvac al sistema inmune. Entre ellos destaca el empleo de dos proteínas acarreadoras: la enzima bacteriana lumazina sintetasa y las proteínas de superficie de fagos filamentosos, así como la expresión en plantas transgénicas.

#### **4.1 Proteína polimérica bacteriana lumazina sintetasa de *Brucella* (BLS)**

Es una proteína citoplasmática de 18 kDa en su forma monomérica, presente en la fracción soluble de cepas del género *Brucella*. Aunque no se conoce la función de esta proteína en su entorno original, la secuencia de aminoácidos muestra una homología con la estructura de enzimas con actividad de lumazina sintetasa presentes en la biosíntesis bacteriana de la riboflavina. Las propiedades fisicoquímicas (Zylberman et al., 2004), estructurales (Goldbaum et al., 1999; Baldi et al., 2000; Laplagne et al., Fornasari et al., Zylberman et al., 2004; Klinke et al., 2007) e inmunológicas (Goldbaum et al., 1992, 1993; Hemmen et al., 1995; Baldi et al., 1996; Letesson et al., 1997; Velikovskiy et al., 2002, 2003; Laplagne et al., 2004; Berguer et al., 2006) de la enzima lumazina sintetasa de *Brucella ssp.* la hacen un candidato prometedor como acarreadora de antígenos en el desarrollo de vacunas.

La lumazina sintetasa de *Brucella* presenta una estructura cuaternaria como dímero de pentámeros, cuya estructura tridimensional 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, funcionando así como proteína acarreadora (Baldi et al., 2000; Laplagne et al., Zylberman et al., 2004).

Usando esta característica, el péptido KETc1 se ha expresado como una proteína quimérica recombinante unida a los 10 residuos amino terminales de lumazina sintetasa de *Brucella* (BLS-KETc1). De esta forma se incrementa su longitud y se logra su expresión en

multicopias volviéndola más antigénica (Sciutto et al., 2005). También es capaz de incrementar la inmunogenicidad sistémica y oral del péptido. La inmunización por vía subcutánea de la quimera BLS-KETc1 indujo niveles de protección similares a los inducidos por el péptido sintético pero sin el requerimiento de adyuvante (Sciutto et al., 2005). Además BLS ha mostrado ser un sistema eficiente como acarreador y adyuvante para vacunación oral; KETc1 indujo un 98% de protección expresado en forma polimérica en la superficie de BLS y hasta 79% empleando BLS como adyuvante con KETc1 (Rosas et al., 2006).

Además de KETc1, otros péptidos de distintas longitudes y secuencias se han construido como proteínas quiméricas asociadas a BLS. La inserción de éstos no afectó el nivel de expresión de las proteínas recombinantes demostrando que la inserción no afecta en el plegamiento y estabilidad de la estructura cuaternaria (Laplagne et al., 2004). La inserción del péptido OMP31, incluido en la proteína de membrana externa de *Brucella melitensis*, no modifica la inmunogenicidad intrínseca de BLS y mantiene la antigenicidad de OMP31.

#### **4.2 Proteínas de superficie de fagos filamentosos**

Los bacteriófagos o fagos filamentosos son virus que infectan a bacterias y que han sido modificados mediante ingeniería genética, ofreciendo nuevas alternativas y amplias posibilidades para el diagnóstico y el desarrollo de vacunas moleculares que pueden utilizarse contra diferentes enfermedades. Los fagos resultan un vehículo adecuado para la producción de vacunas mediante su empleo con antígenos unidos a su superficie (mediante Phage Display o Conjugación química) o a través de su uso en vacunación con DNA, que involucra la incorporación de un cassette que contiene el gen de interés bajo el control de un promotor eucariótico en el genoma del fago lambda (Clark and March, 2006).

La técnica de despliegue en fagos (Phage Display) se basa en la expresión de hasta  $10^{11}$  péptidos o proteínas en la superficie de fagos filamentosos (Scott et al., 1990; Clark and

March, 2006). Esta herramienta permite a través de la manipulación *in vitro* e *in vivo* identificar y producir en gran escala los péptidos de interés en la superficie de los fagos. Los primeros estudios de phage display se realizaron con el bacteriófago específico de *Escherichia coli* (M13). Actualmente, se han desarrollado numerosos sistemas de despliegue en el fago lambda  $\lambda$  y T4, y sistemas que incluyen virus de eucariotes (Sidhu, 2000).

Entre las ventajas de utilizar fagos para la expresión de péptidos vacunales destaca la capacidad adyuvante intrínseca asociada al fago. Se ha demostrado que las partículas de fagos son capaces de generar una respuesta inmune aún sin el uso de adyuvantes. Este sistema resulta además adecuado para la producción masiva de proteínas a bajo costo utilizando los procedimientos estandarizados para el crecimiento de cultivos bacterianos.

#### **4.2.1 Estructura del fago filamentoso M13**

Los fagos requieren de una proteína multi-dominio que contenga una región hidrofóbica, la cual permite la formación de la cápside que protege el material genético. M13 consiste de una cadena sencilla circular de DNA rodeado de cinco diferentes proteínas de cobertura (Figura 1). La longitud del filamento de DNA se encuentra cubierta por 2700 copias de la mayor proteína de cubierta (cpVIII) y está cerrada en los extremos por 4 ó 5 copias de cada una de las proteínas de menor cobertura cpIII, cpVI, cpVII y cpIX (Malik & Perham, 1997; Manoutcharian et al., 2001; Sidhu, 2000). La proteína de interés se asocia frecuentemente a la proteína 3 de la cubierta viral (cpIII) o proteína 8 (cpVIII) sobre la superficie del bacteriófago filamentoso M13.

La proteína III (43kDa, 424 aminoácidos) consta de tres dominios estabilizados por enlaces disulfuro. El dominio amino terminal es el responsable de la penetración a *Escherichia coli* mientras que el segundo dominio reconoce el pili bacteriano. El dominio carboxilo actúa en el anclaje a la membrana además de participar en el ensamblaje del fago

(Jung et al., 1999; Kramer et al., 2003). Los péptidos que se fusionan a cpIII van de 6 a 38 aminoácidos en longitud y esta proteína se expresa en 3-5 copias en el extremo del virión.

La proteína VIII es una proteína de 50 aminoácidos (5.5kDa) y las fusiones a ésta se llevan a cabo en su región amino terminal, siendo este extremo el que se encuentra expuesto en toda la cápside del fago, en tanto el extremo carboxilo está orientado al interior. Estas fusiones son más restringidas y sólo se han reportado unas que permiten la expresión de péptidos de 6-8 aminoácidos de longitud (Kay, 1996) y en aproximadamente 10-30% de las 2700 copias de las proteínas de cpVIII.

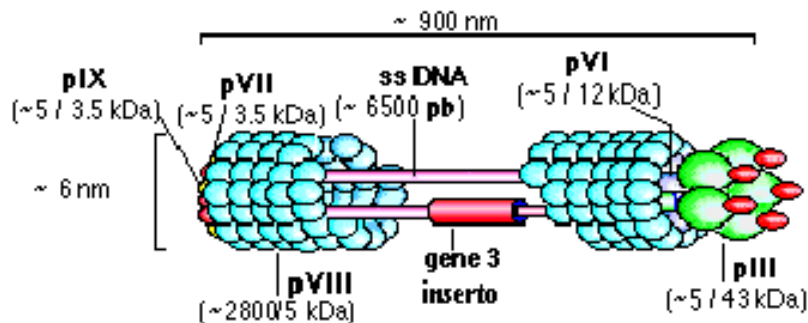


Figura 1. Estructura de bacteriófago que muestra la hebra de DNA y las proteínas de cubierta (cpIII, cpVI, cpVII, cpVIII, pIX)

Otro aspecto del Phage Display ha sido el desarrollo de un sistema que permite la expresión de productos de cDNA fusionados a cpIII o cpVIII de M13. Sin embargo, dado su tamaño es imposible clonarlos directamente en el extremo 5' del gen *III* o gen *VIII* de M13. Cramer et al., 1993; 1994 generaron el vector de expresión pJuFo, basado en la interacción de los zippers de leucina de Jun y Fos, que les permitió expresar proteínas de cDNA fusionados indirectamente a cpIII. (Cramer et al., 1994; Palzkill et al., 1998; Rao et al., 2003).

En ocasiones se utilizan fagémidos para el despliegue de proteínas en la superficie del fago. Los fagémidos son vectores que están formados por dos orígenes de replicación (del fago y del plásmido), la señal de empaquetamiento del fago filamentoso, un gen que codifica

para alguna proteína de superficie del fago (cpIII, cpVI, cpVIII) y algunos genes de resistencia a antibióticos (ampicilina, tetraciclina). En estos casos cuando las células contienen el fagémido y son infectadas con un fago ayudador, éste activa el origen de replicación del fago en el plásmido y provee todas las proteínas restantes para formar la cápside del fago. Por lo tanto, los fagos recombinantes expresarán la proteína silvestre y la proteína recombinante (Manoutcharian et al., 2001; Clark and March 2006).

#### **4.2.2 Ciclo de vida de M13**

Los bacteriófagos M13 infectan cepas de *Escherichia coli* utilizando el pili como receptor. A diferencia de otros fagos, M13 no produce la lisis de *E.coli* sino que induce un estado en la bacteria que promueve la producción y secreción de partículas de fago. La infección se inicia cuando la proteína III del fago se une al pili de *E.coli*, lo que permite la entrada del fago a la bacteria y las proteínas de la cápside son removidas y depositadas en la membrana interna. Al mismo tiempo, la maquinaria de replicación de la bacteria convierte la cadena sencilla de DNA del fago en doble cadena. Después de la replicación, la doble cadena vuelve a convertirse en cadena sencilla que se empaqueta en una nueva partícula de fago. El péptido señal de las proteínas cpIII y cpVIII, las dirige hacia la membrana interna de la bacteria para su ensamble en la nueva partícula de fago. La partícula de fago madura sale a través de la membrana sin que se afecte el crecimiento de la célula. La producción de fagos continúa hasta que la célula muere por acumulación de componentes tóxicos del fago.

Considerando estas características, los péptidos de la vacuna sintética S3Pvac han sido expresados en fagos filamentosos recombinantes (M13) y se han encontrado capaces de inducir altos niveles de protección en contra de la cisticercosis experimental murina y porcina (Manoutcharian et al., 2004).

### 4.3 Expresión de antígenos vacunales en plantas transgénicas

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. De esta manera, la expresión de proteínas en plantas resulta un vehículo adecuado para la producción y presentación oral de antígenos en la superficie de mucosas dado que la pared celular confiere protección contra las condiciones de degradación en el estómago. Entre otras ventajas destacan el bajo riesgo de contaminación por patógenos humanos o veterinarios, la producción de proteínas en cultivos bajo condiciones controladas a costos relativamente bajos, procesos de purificación más sencillos aunado a un menor requerimiento de material asociado a la aplicación de vacunas por otras vías, requerimiento de infraestructura limitada para su cultivo, cosecha, almacenamiento y procesamiento (Tacket et al., 1999; Korban et al., 2002, Streatfield, 2006; Floss et al., 2007).

Diferentes antígenos vacunales se han expresado en forma estable en el genoma de distintas plantas para la producción de vacunas en forma masiva (Sala et al., 2003; Streatfield et al., 2005). Los primeros estudios se realizaron en tabaco y papa, y recientemente se ha ampliado su evaluación utilizando tomate, lechuga, maíz, entre otros (Walmsley et al., 2000; Tacket, 2005; Floss et al., 2007). 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 (Walmsley et al., 2003), las glicoproteínas del virus de la rabia

(Floss et al., 2007). Este sistema de expresión en plantas de antígenos de interés para vacunación oral ha demostrado inducir una respuesta protectora con la producción de anticuerpos IgG e IgA (Tacket et al., 1999; Molina et al., 2005; Webster et al; 2006; Floss et al., 2007).

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. Considerando que la inserción de secuencias exógenas en el genoma de la planta se asocia a niveles relativamente bajos de expresión de las proteínas, 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). Los métodos de transformación incluyen la integración del gen en el DNA nuclear, que ocurre de forma aleatoria en el sitio cromosomal o la integración del gen en el DNA circular del cloroplasto (cpDNA) que permite la integración sitio específica. Tanto el genoma nuclear como el de cloroplasto aceptan insertos en gran número y tamaño (Daniell et al., 2001).

#### **4.3.1 Integración del gen en DNA nuclear**

Entre los métodos más empleados para la integración de secuencias exógenas en el DNA nuclear para la producción de proteínas recombinantes se encuentran: el uso de biobalística, la expresión por vectores virales o la transformación mediada por *Agrobacterium*. La inserción de genes puede realizarse en una misma construcción o mediante el empleo de dos plásmidos (co-transformación); sin embargo, la integración es más eficiente usando un solo plásmido. La co-transformación facilita la eliminación de marcadores de selección y puede realizarse empleando *Agrobacterium* o biobalística.



*Transformación mediada por Agrobacterium.* La bacteria *Agrobacterium tumefaciens* puede transferir una porción de DNA (T-DNA), contenido en su plásmido inductor de tumor (Ti), de la bacteria a la planta de tal manera que se integre al genoma nuclear. Los factores de virulencia que permiten este proceso están codificados en el plásmido Ti y pueden actuar en *trans* en un vector binario que contenga T-DNA. Los genes exógenos usualmente son insertados entre los bordes de los elementos de T-DNA en el vector binario y transferidos a una cepa de *A. tumefaciens* que contiene el plásmido Ti con ausencia de los elementos T-DNA. Una vez que se realiza la infección de la planta hospedera con la bacteria recombinante, la porción de T-DNA se escinde y es transportada al núcleo, donde es insertada en el DNA nuclear de forma aleatoria (Tacket and Mason, 1999). En este método la expresión del gen es más estable ya que se generan pocas copias (Stratfield, 2005) sin embargo, está limitada a la infección de dicotiledóneas.

*Transformación por vectores virales de plantas.* Este método permite altos niveles de acumulación de la proteína en la planta hospedera debido a la rápida capacidad de amplificación del virus y consiste en la inoculación de la planta con virus recombinantes que contienen las secuencias que se desean expresar (Sala et al., 2003; Floss et al., 2007). Pueden usarse distintos tipos de virus vegetales para la construcción de vectores, aunque lo más frecuente es utilizar virus de cadena sencilla de RNA. En este caso, la expresión es transitoria y tanto la secuencia del epítotope como el genoma viral nunca se integran en el genoma de la planta (Sala et al., 2003).

*Transformación por biobalística.* Este método consiste en la inserción de multicopias y en multi-sitios del gen de interés mediante un proceso de bombardeo del tejido que se desea transformar con partículas metálicas micrométricas (Tungsteno u Oro) que se encuentran recubiertas por el material genético. Estas partículas penetran a través de la pared celular y la

membrana plasmática llegando al sitio donde ocurre la inserción. Posterior al bombardeo se debe realizar el seguimiento de las clonas y el análisis de transformantes. Esto incluye la expresión del marcador de selección, generalmente se emplea el gen reportero de  $\beta$ -glucuronidasa, y la confirmación del gen integrado mediante técnicas de PCR, RT-PCR o DBH (Dot Blot Hibridization) (Lessard et al., 2002 ; Vidal et al., 2003; Streatfield et al., 2005).

#### **4.3.2 Integración del gen en DNA de cloroplasto**

El DNA de cloroplasto está presente en múltiples copias y se encuentra secuenciado en un gran número de plantas. En este caso, la integración del gen en cpDNA usualmente se hace mediante transformación por biobalística y se emplean secuencias flanqueadoras que permiten dirigir la secuencia exógena a un sitio específico, lo cual elimina la variabilidad en la expresión del gen y permite incrementar 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; Walmsley and Arntzen, 2003; Tregoning et al., 2004). Además permite la expresión de operones policistrónicos, por lo que se pueden introducir varios genes en un evento de transformación bajo el control de un solo promotor. Algunas de las desventajas que presenta la transformación de cloroplasto se asocia a la falta de modificaciones post-traduccionales de proteínas como la glicosilación.

#### **4.3.3 Estrategias para optimizar la obtención de proteínas recombinantes**

Las estrategias para conseguir una síntesis elevada de la proteína exógena se centran principalmente en optimizar la expresión del gen, en asegurar su estabilidad contra la degradación y en optimizar los procesos de purificación del producto final.

Uno de los aspectos de importancia en el diseño de las construcciones es la selección del promotor. El promotor 35S del virus de coliflor (CaMV 35S) es el más empleado debido a que su expresión es constitutivo; sin embargo, no se expresa bien en monocotiledóneas, por lo que este promotor puede ser modificado mediante la adición de un intron en la región UTR para que funcione adecuadamente en monocotiledóneas (Stoger et al., 2005). También se emplean promotores inducibles o específicos de almacenamiento de proteínas en ciertas regiones de la planta (Tabla 2).

Tabla 2. Promotores empleados en la expresión de proteínas recombinantes en plantas

| Promotor                | Especie                   | Fuente del gen    | Especificidad |
|-------------------------|---------------------------|-------------------|---------------|
| <b>Virales</b>          |                           |                   |               |
| CaMV 35S                | Virus de mosaico coliflor | transcrito 35S    | Constitutivo  |
| <b>Dicotiledóneas</b>   |                           |                   |               |
| lega                    | Chícharo                  | legumbre          | Cotiledoneas  |
| dlec2                   | Frijol                    | Fitohemaglutinina | Cotiledoneas  |
| Lectin                  | Soja                      | Lectina           | Semilla       |
| USP                     | Frijol                    |                   | Semilla       |
| <b>Monocotiledóneas</b> |                           |                   |               |
| Ubi-1                   | Maíz                      | Ubiquitina 1      | Constitutivo  |
| Gt-1                    | Arroz                     | Glutelina 1       | Endospermo    |
| Gb-1                    | Maíz                      | Globulina 1       | Embrión       |
|                         | Arroz                     |                   | Endospermo    |
| Ax                      | Trigo                     | Glutenina alto PM | Endospermo    |
| 1Dx5                    | Trigo                     | Glutenina alto PM | Endospermo    |
|                         |                           | Glutenina bajo    |               |
| LMW                     | Trigo                     | PM                | Endospermo    |

Uno de los principales sistemas que permiten proteger a las proteínas de la degradación es el direccionamiento hacia compartimentos celulares mediante secuencias denominadas péptido señal. Los compartimentos celulares que presentan un ambiente favorable para el almacenamiento hacia los que se puede realizar un direccionamiento son retículo endoplásmico, vacuolas y cloroplastos. Otra estrategia es la acumulación de proteínas en semillas (Twyman et al., 2003; Stoger et al., 2005; Joshi and Lopez, 2005).

Los numerosos estudios realizados en el desarrollo de vacunas derivadas de plantas transgénicas señalan a estos sistemas como alternativas de interés para el desarrollo de nuevas vacunas 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).

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 y sistemas de presentación de antígenos que permitan mejorar el costo / beneficio de ésta y otras vacunas. El trabajo de maestría tuvo como objetivo identificar la capacidad protectora y los mecanismos inmunológicos inducidos por la vacunación con el péptido KETc1 asociado a los distintos sistemas descritos anteriormente.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1 OBJETIVOS GENERALES**

Comparar las propiedades protectoras e inmunogénicas del péptido KETc1 administrado de forma subcutánea u oral en el modelo murino de cisticercosis causado por *Taenia crassiceps* presentando el péptido:

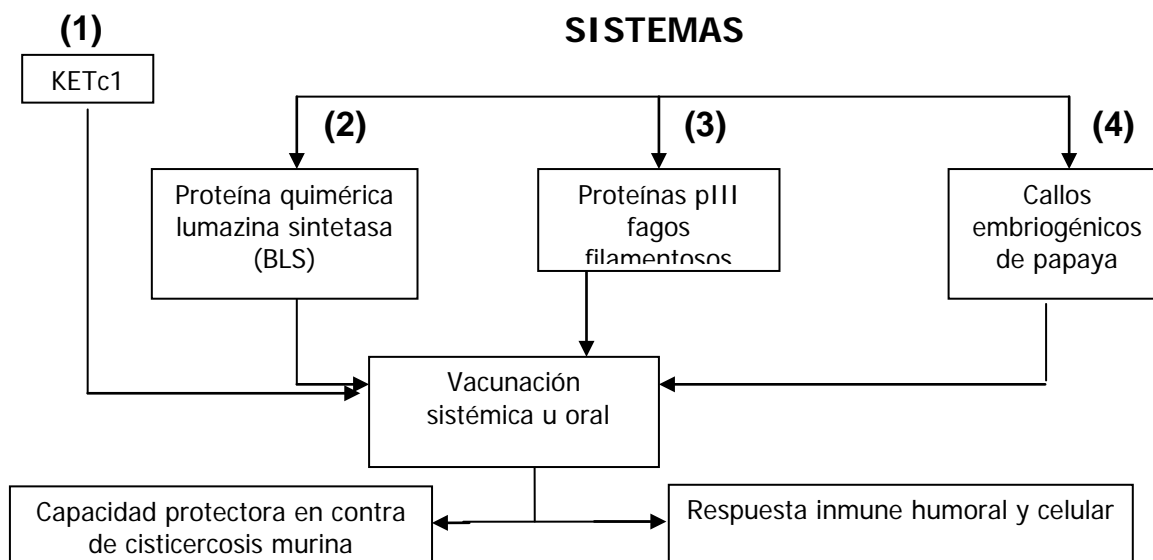
- 1) Como péptido lineal producido por síntesis química
- 2) Fusionado a la proteína cpIII del fago filamentoso M13
- 3) Expresado en callos embriogénicos de papaya transformados genéticamente por biobalística
- 4) Como proteína quimérica asociados a la proteína lumazina sintetasa de *Brucella*

### **5.2 OBJETIVOS PARTICULARES**

- Comparar la capacidad protectora inducida por KETc1 expresado en los diferentes sistemas en el modelo murino de cisticercosis
- Evaluar la respuesta inmune humoral asociada a la inmunización con KETc1 en los diferentes sistemas
- Evaluar y caracterizar la respuesta inmune celular asociada a la inmunización con KETc1 expresado en los tres sistemas en el modelo murino de cisticercosis

## 6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

### 6.1 Estrategia experimental



### 6.2 Procedimiento

Cabe mencionar que las distintas construcciones empleadas para realizar la evaluación de la respuesta inmune del péptido KETc1 en los distintos sistemas fueron realizadas por los autores que corresponden y se mencionan en la metodología.

#### 6.2.1. KETc1

El péptido KETc1 consiste de una secuencia inmunogénica de 12 aa A-P-M-S-T-P-S-A-T-S-V-R (Manoutcharian et al., 1996) producido de forma sintética por AnasPec, Inc.

#### 6.2.2. Obtención de las clonas embriogénicas de papaya modificadas genéticamente

##### *Expresión del péptido KETc1*

La papaya ha demostrado ser un sistema de transformación efectivo y estable de rápido crecimiento, por lo que se ha elegido para la expresión del péptido KETc1. Los frutos

inmaduros se emplearon como fuente de embriones cigotos para la inducción de los callos embriogénicos. La inducción y propagación de los callos embriogénicos se realizó de acuerdo a Hernández et al, 2007. Con la finalidad de incrementar el tamaño del péptido y facilitar su identificación se añadió a la secuencia una cola de histidinas en el extremo 3'. La secuencia KETc1.6His se clonó en el vector pBluescript en los sitios de restricción de *EcoRI/BamHI* y el inserto se subclonó en el vector de expresión constitutiva pUI 235-5.1 bajo el promotor de CAMV35-35S.

#### *Extracción de la proteína*

Cada clona de papaya obtenida (5g) y de callos embriogénicos no transgénicos se sometieron a congelación en N<sub>2</sub> . liofilización y se lisaron a una concentración de 1g/mL de buffer de lisis [PBS pH =7.4, 50 mM ascorbato de sodio, 1 mM EDTA pH=8.0, 0.2% Tritón X-100 y 10 µL/mL de inhibidor de proteasas para uso en purificación de proteínas poli-(histidina) (Sigma)]. Posteriormente se centrifugaron a 36 220 X g a 4° C durante 20 min para remover residuos insolubles. Se colectó el sobrenadante y se determinó la concentración de proteína del extracto soluble por Lowry.

La suspensión de callo embriogénico se realizó mediante el molido de las clonas de papaya en N<sub>2</sub> y su posterior liofilización, obteniendo así un pulverizado que se almacena a -80°C hasta su uso.

#### *Identificación de las clonas transgénicas candidatas para uso en vacunación*

Las clonas embriogénicas de papaya transgénica que expresan el péptido KETc7, se emplearon para evaluar la mejor dosis (200 ó 1000 µg/ratón) para su uso en vacunación en contra de la cisticercosis (Hernandez et al., 2007).

Para identificar a las clonas transgénicas protectoras que expresan KETc1, se inmunizaron grupos de 8-10 ratones hembras BALB/cAnN vía subcutánea empleando 200µg/ratón de los diferentes extractos solubles de las clonas transgénicas y de callos embriogénicos no transgénicos en ausencia de adyuvante. La inmunización se aplicó dos veces en un intervalo de 10 días. Posteriormente, se realizó el desafío con 10 cisticercos (2mm de diámetro) de *T. crassiceps* en 0.8mL de solución salina isotónica (SSI). Para determinar el nivel de protección se realizó el sacrificio de los ratones 40 días después de la infección y se prosiguió a contar la carga parasitaria en la cavidad peritoneal.

### **6.2.3. Construcción de los fagos recombinantes**

Para generar el fago recombinante M13 expresando los péptidos KETc1, KETc12, GK1 y KETc7, los fragmentos de DNA que codifican para estas secuencias fueron clonados en el vector de expresión del fago M13KE para KETc1 y en el vector del fagémido pF8 para el resto de los péptidos. KETc1 fue desplegado en la proteína cpIII (K1M), mientras que los otros péptidos fueron expresados en el fago como fusión a la proteína cpVIII (Manoutcharian et al., 2004). Las clonas obtenidas se inactivaron y esterilizaron por separado.

Para determinar la mejor dosis para evaluar la capacidad protectora inducida por la inmunización con este sistema de expresión, se realizó la vacunación de 7-10 ratones hembras BALB/cAnN vía subcutánea con diferentes dosis ( $5 \times 10^{10}$  ó  $5 \times 10^{11}$  fagos/ratón) empleando la vacuna S3Pvac-fago (CPhV) como inmunógeno. Posteriormente, se realizó el desafío conforme al procedimiento anterior.

### **6.2.4. Método de purificación de las proteínas BLS-WT**

La proteína BLS y la quimera BLS-KETc1 expresadas como cuerpos de inclusión en células transformadas de la cepa de *E.coli* BL21 se solubilizó 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 ditionotreitól (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 al 15%. Posteriormente se concentró (10mg/mL), se congeló en nitrógeno líquido y se almacenó a -80° C.

### **6.2.5. Inmunización de ratones**

Con el propósito de evaluar la inmunogenicidad del péptido recombinante KETc1 expresado en los diferentes sistemas en estudio, se inmunizaron grupos de 7-10 ratones hembras BALB/cAnN vía subcutánea u oral bajo las siguientes condiciones: Para la inmunización vía oral se realizaron curvas dosis-respuesta para cada uno de los sistemas, realizando 2 ó 3 inmunizaciones en intervalos de diez días. Para el caso de las plantas transgénicas se aplicó el extracto soluble o el callo en suspensión.

Para la evaluación de las clonas transgénicas se emplearon los mejores candidatos y callos embriogénicos no transgénicos bajo la mejor dosis encontrada (200 µg/ratón ó 40mg callo/ratón). Para el sistema en fago recombinante M13 o K1M se utilizaron  $1 \times 10^{11}$  fagos/ratón, considerando la información obtenida en la que demostramos que esta dosis induce protección en el modelo murino. Para evaluar la respuesta por la inmunización con la proteína quimérica, se inmunizaron con BLS-WT o BLS-KETc1 (50 ó 25 µg/ratón) (Sciutto et al., 2005; Rosas et al., 2006).

En todos los casos, la inmunización se aplicó dos veces, la segunda dosis diez días después de la primera y se sangró a los animales por punción plexo ocular a los 15 días

posteriores a la última inmunización. Además se incluyó un grupo de 10 ratones como control del experimento.

#### **6.2.6. Evaluación de la capacidad protectora**

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 2 a 3 meses. Los cisticercos empleados han sido mantenidos por pases intraperitoneales sucesivos.

Quince días después de la segunda inmunización, los ratones se infectaron intraperitonealmente con 10 cisticercos (2mm de diámetro) en 0.8mL de solución salina isotónica estéril (SSI). Para determinar el nivel de protección se realizó el sacrificio de los ratones 45-60 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 fueron removidos e inspeccionados cuidadosamente para detectar la presencia de cualquier larva de *Taenia crassiceps*.

#### **6.2.7. Evaluación de la respuesta inmune**

##### *Evaluación de la respuesta celular*

La evaluación de la respuesta celular se realizó mediante un ensayo de proliferación *in vivo* en células de bazo y placas de Peyer (en el caso de grupos inmunizados vía oral) empleando el marcador Bromodeoxiuridina (BrdU), análogo de Timina. Esta técnica nos permite identificar la división celular mediante la incorporación del marcador al DNA recientemente sintetizado por células en fase S, el BrdU incorporado es marcado con un anticuerpo específico anti-BrdU y es analizado mediante citometría de flujo.

*Procedimiento:* Quince días después de la última inmunización se administró BrdU vía intraperitoneal u oral, (2mg y/o 0.8mg por ratón, respectivamente) 4 horas previas al

sacrificio. Posteriormente, se obtuvieron los órganos linfoides bazo y Placas de Peyer de los ratones que recibieron un booster con el inmunógeno en estudio 18 ó 90h previos al ensayo. Los órganos se colocaron en 3mL de medio RPMI 1640 (Gibco, InVitrogen) suplementado con L-glutamina (0.2mM),  $\beta$ -mercaptoetanol (0.05mM), penicilina (100U/mL), estreptomina (100 $\mu$ g/mL) y 10% de suero fetal bovino (FBS). Posteriormente, se perfundieron para obtener las células y la suspensión se centrifugó a 1500 rpm durante 7 minutos a 4°C, se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 2mL de solución de lisis de eritrocitos (NH<sub>4</sub>Cl / EDTA) durante 10 minutos. Se lavaron y se colocaron en 1-3mL de medio RPMI.

Para realizar la caracterización de las células que proliferan, se incubaron 5X10<sup>5</sup> células de cada condición en presencia de un anticuerpo anti-CD4 o anti-CD8 acoplados a Cychrome durante 30 minutos. La incorporación de BrdU se evaluó empleando el kit “Fixation / Permeabilization” (BD Pharmingen) para fijar y permeabilizar las células. Posteriormente, las células se lavaron e incubaron toda la noche en presencia de 200 $\mu$ L de la solución “Cytofix / CytoPerm”. Con la finalidad de exponer la BrdU incorporada durante la proliferación se realizó un tratamiento con DNAsa I (Sigma) durante 1 hora. Finalmente, las células se incubaron en presencia del anticuerpo anti-BrdU-FITC en solución permeabilizante 1X durante 20 minutos. Las células marcadas y sin marcar se lavaron y resuspendieron en 0.5mL PBS\* (PBS pH=7.4 conteniendo 5% FBS y 0.02% azida de sodio NaN<sub>3</sub>) para su análisis en el FACSCalibur.

#### *Técnica de ELISA para la detección de anticuerpos*

Se sensibilizaron microplacas de 96 pozos con 1 $\mu$ g/pozo del péptido sintético KETc1 o BLS-KETc1 y se 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 (1:10000), anti-IgG1 (1:1000), anti-IgG2a (1:1000) o anti-IgA (1:1000) de ratón acoplada a fosfatasa alcalina durante 1 hora a 37°C. El desarrollo de la actividad de la fosfatasa se realizó a temperatura de incubación empleando el sustrato p-nitrofenil fosfato disódico (Sigma) en buffer de dietanolamina por 20 minutos. Finalmente, se midió la absorbancia a 405 nm en un lector de ELISA (VERSAmax, Molecular Devices). Para el caso de los sueros de ratones inmunizados con BLS-WT o BLS-KETc1, se emplearon diluciones 1:5000 en las placas sensibilizadas con BLS-KETc1 siguiendo el procedimiento anterior.

## **7. RESULTADOS**

En este trabajo se evaluaron las propiedades protectoras e inmunogénicas del péptido KETc1 administrado en forma sintética y utilizando diferentes sistemas de expresión en el modelo de cisticercosis murina.

Una de las propiedades inmunogénicas evaluadas fue la capacidad protectora inducida en ratones por la inmunización con KETc1 utilizando los diferentes sistemas de expresión y desafiando los mismos utilizando cisticercos de *Taenia crassiceps*.

Para evaluar la capacidad protectora se consideraron dos parámetros: la reducción en la carga parasitaria promedio y el porcentaje de ratones totalmente protegidos. A este respecto, se realizaron experimentos independientes empleando diferentes dosis de inmunización con los tres sistemas con la finalidad de identificar la dosis óptima para inducir protección utilizando los diferentes sistemas de expresión en contra de la cisticercosis murina para posteriormente analizar la respuesta inmune asociada.

Al respecto de la capacidad protectora inducida con los diferentes sistemas los resultados obtenidos indican:

### **7.1. INMUNIZACIÓN SISTÉMICA**

#### **7.1.1. BLS como sistema acarreador**

Se evaluó la capacidad protectora de los ratones inmunizados con diferentes dosis del péptido KETc1 asociado a la proteína quimérica BLS y se encontró que la dosis de 50µg indujo niveles de protección similares a la del péptido lineal (Tabla 3A: 73 vs 74%, respectivamente). Las dosis superiores a 50 µg indujeron mortalidad en los ratones inmunizados. La inmunización con BLS-WT redujo significativamente la cantidad de parásitos esperada (57%). La adición de KETc1 en la forma quimérica le confiere un 36% de especificidad.

TABLA 3A. Capacidad protectora del péptido KETc1 administrado en proteína quimérica BLS

| Grupo experimental | No. de cisticercos <sup>1</sup>                       | Intensidad <sup>2</sup> | %Eficiencia (%Tpm) <sup>3</sup> |
|--------------------|---|-------------------------|---------------------------------|
| Controles          | 433, 488, 491, 511, 529, 535, 624, 642                | 532 ± 68 <sup>a</sup>   |                                 |
| Inmunizados con:   |   |                         |                                 |
| KETc1              | 2, 3, 47, 99, 104, 108, 155, 165, 208, 214, 238, 317  | 138 ± 96 <sup>b</sup>   | 74 (0%)                         |
| BLS-WT             | 153, 156, 161, 189, 200, 220, 225, 272, 296, 313, 322 | 228 ± 64 <sup>c</sup>   | 57 (0%)                         |
| BLS-KETc1          | 0, 0, 41, 108, 113, 162, 198, 208, 228, 253, 294      | 146 ± 102 <sup>b</sup>  | 73 (18%)                        |

<sup>1</sup> Número individual de cisticercos recuperados 45 días después de la infección con 10 cisticercos.

<sup>2</sup> Media ± SD

<sup>3</sup> Media del número de parásitos: [(X) controles – X vacunados/ Xcontroles ]\*100. (Porcentaje de ratones totalmente protegidos).

Diferentes literales indican diferencia significativa en la carga parasitaria entre el grupo control e inmunizado (p<0.01, ANOVA)

### 7.1.2. M13 como sistema acarreador

La vacuna CPhV está constituida con los péptidos de S3Pvac y el antígeno KETc7 asociado a las proteínas de cubierta del fago filamentoso M13 y se evaluó en el modelo murino encontrándose que reducía con respecto a los controles en un 87-96% la carga parasitaria en las dos dosis utilizadas y protegía totalmente del 22 al 50% de los ratones vacunados según la dosis (Tabla 3B). El fago M13 que no expresa los péptidos redujo significativamente la carga parasitaria aunque con menor eficiencia (35-42%) que cuando los péptidos son expresados en este vector.

Empleando ambas dosis de vacuna se observó protección sin embargo, para evaluar el efecto protector de KETc1 asociado al fago se empleó la mayor dosis con la finalidad de incrementar el número de copias presentadas al sistema inmune considerando que este péptido se encuentra asociado a la proteína menor de cubierta cpIII con respecto de los otros péptidos incluidos en la vacuna completa CPhV.

TABLA 3B. Capacidad protectora de la vacuna CPhV

| Grupo experimental | Dosis              | No. de cisticercos <sup>1</sup>             | Intensidad <sup>2</sup> | %Protección (%Tpm) <sup>3</sup> |
|--------------------|--------------------|---|-------------------------|---------------------------------|
| Controles          |                    | 483, 781, 299, 370, 483 <sup>a</sup>        | 483 [294.7 – 711.7]     |                                 |
| Inmunizados con:   |                    |   |                         |                                 |
| M13                | 1X10 <sup>10</sup> | 5, 27, 51, 82, 159, 156, 164 <sup>b</sup>   | 82 [29.6 – 154.4]       | 81 (0%)                         |
| CPhV               |                    | 0,0,0,0,0,3, 7, 144, 193, 248 <sup>b</sup>  | 1.5 [-9.7 – 128.7]      | 87.5 (50%)                      |
| M13                | 1X10 <sup>11</sup> | 1, 7, 7, 8, 8, 19, 79, 80, 110 <sup>b</sup> | 8 [3.3 – 67.6]          | 92.6 (0%)                       |
| CPhV               |                    | 0, 0, 1, 2, 3, 3, 8, 60, 106 <sup>b</sup>   | 3 [-8.4 – 49.1]         | 96 (22%)                        |

<sup>1</sup> Número individual de cisticercos recuperados 45 días después de la infección con 10 cisticercos.

<sup>2</sup> Mediana [intervalo confianza 95%]

<sup>3</sup> Media del número de parásitos: (X) controles – X vacunados/ Xcontroles \*100 (Porcentaje de ratones totalmente protegidos).

Diferentes literales indican diferencia significativa en la carga parasitaria entre los grupos controles e inmunizados (p<0.01, Kruskal-Wallis test)

### 7.1.3. Callos transgénicos de papaya como sistema acarreador

De acuerdo a Hernández et al., 2007, el empleo de 200 µg extracto soluble de clona transgénica/ratón es capaz de inducir protección en contra de la cisticercosis murina. Por lo tanto, se evaluaron 15 diferentes clonas transgénicas que expresan KETc1 (200 µg/ratón) encontrando altos niveles de protección en términos de reducción de la cantidad de parásitos en 10 de ellas (pKETc1: 1, 2, 3, 5, 9, 11, 12, 25, 41), de las cuales pKETc1: 1, 2, 12, 25, y 41 redujeron del 70-90% el número de ratones totalmente protegidos (Tabla 3C).

Adicionalmente se observó una reducción significativa de la cantidad de parásitos inducida por callos de papaya no transformados (65%) aunque no indujo protección total significativa en los ratones inmunizados.

TABLA 3C. Evaluación de las clonas transgénicas que expresan el péptido KETc1

| Grupo experimental                | No. de cisticercos <sup>1</sup>                     | Intensidad <sup>2</sup> | %Protección (%Tpm) <sup>3</sup> |
|-----------------------------------|---|-------------------------|---------------------------------|
| Controles                         | 26, 7, 19, 31, 34, 39, 128, 139, 7, 93 <sup>a</sup> | 32.5 [17.1 – 87.5]      |                                 |
| Inmunizados con:                  |   |                         |                                 |
| Papaya no transgénica             | 24, 10, 5, 30, 13, 0, 36, 22, 41, 1 <sup>b</sup>    | 17.5 [7.8 – 28.6]       | 65 (10%)                        |
| Clonas papaya transgénica         |   |                         |                                 |
| PKETc1 <sub>1</sub>               | 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 1, 29, 127 <sup>c</sup>        | 0 [-13 – 44.4]          | 67 (70%*)                       |
| PKETc1 <sub>2</sub>               | 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 2, 4, 83 <sup>c</sup>          | 0 [-8.6 – 24.8]         | 83 (70%*)                       |
| PKETc1 <sub>3</sub>               | 0, 0, 0, 0, 0, 0, 1, 1, 1, 5 <sup>c</sup>           | 0 [-0.3 – 1.9]          | 98 (60%*)                       |
| PKETc1 <sub>5</sub>               | 0, 0, 0, 0, 0, 0, 1, 1, 3, 3 <sup>c</sup>           | 0 [-0.1 – 1.5]          | 98 (60%*)                       |
| p <sub>1</sub> KETc1 <sub>9</sub> | 0, 0, 0, 0, 0, 1, 2, 4, 1, 1 <sup>c</sup>           | 1 [-0.02 – 2.0]         | 98 (50%)                        |
| p <sub>2</sub> KETc1 <sub>9</sub> | 0, 0, 0, 0, 0, 1, 1, 1, 2, 3 <sup>c</sup>           | 1 [0.8 – 1.7]           | 98 (50%)                        |
| PKETc1 <sub>11</sub>              | 0, 0, 0, 0, 0, 0, 2, 2, 3, 23 <sup>c</sup>          | 0 [-2.1 – 8.1]          | 94 (60%*)                       |
| PKETc1 <sub>12</sub>              | 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 1, 2, 43 <sup>c</sup>          | 0 [-5.1 – 14.3]         | 90 (70%*)                       |
| pKETc1 <sub>13</sub>              | 0, 1, 0, 0, 267, 226, 0, 17, 241, 0 <sup>ab</sup>   | 1 [-8.8 – 159.2]        | 0 (50%)                         |
| pKETc1 <sub>16</sub>              | 2, 0, 0, 0, 284, 0, 0, 0, 1, 190 <sup>b</sup>       | 0 [-25.4 – 120.8]       | 8.8 (60%*)                      |
| pKETc1 <sub>20</sub>              | 2, 3, 0, 0, 298, 102, 9, 16, 0, 0 <sup>ab</sup>     | 2.5 [-26.2 – 110]       | 17.8 (40%)                      |
| pKETc1 <sub>21</sub>              | 0, 0, 3, 1, 0, 100, 46, 0, 0, 0 <sup>b</sup>        | 0 [-8.7 – 38.7]         | 71 (60%*)                       |
| PKETc1 <sub>25</sub>              | 0, 0, 0, 18, 0, 0, 0, 0, 0, 0 <sup>c</sup>          | 0 [-2.3 – 5.9]          | 96 (90%*)                       |
| pKETc1 <sub>40</sub>              | 0, 3, 3, 0, 0, 116, 0, 162, 0 <sup>ab</sup>         | 0 [-16.1 – 79.2]        | 40 (56%*)                       |
| PKETc1 <sub>41</sub>              | 2, 0, 0, 2, 0, 0, 0, 0, 0, 5 <sup>c</sup>           | 0 [-0.3 – 2.1]          | 98 (70%*)                       |

<sup>1</sup> Número individual de cisticercos recuperados 45 días después de la infección con 10 cisticercos.

<sup>2</sup> Mediana [intervalo confianza 95%]

<sup>3</sup> Media del número de parásitos: (X) controles – X vacunados/ Xcontroles (Porcentaje de ratones totalmente protegidos).

Diferentes literales indican diferencia significativa en la carga parasitaria entre los grupos controles e inmunizados (p<0.05, Kruskal Wallis test). Los asteriscos (\*) indican significancia por Fisher's test en el porcentaje de ratones totalmente protegidos



## **7.2. INMUNIZACIÓN ORAL**

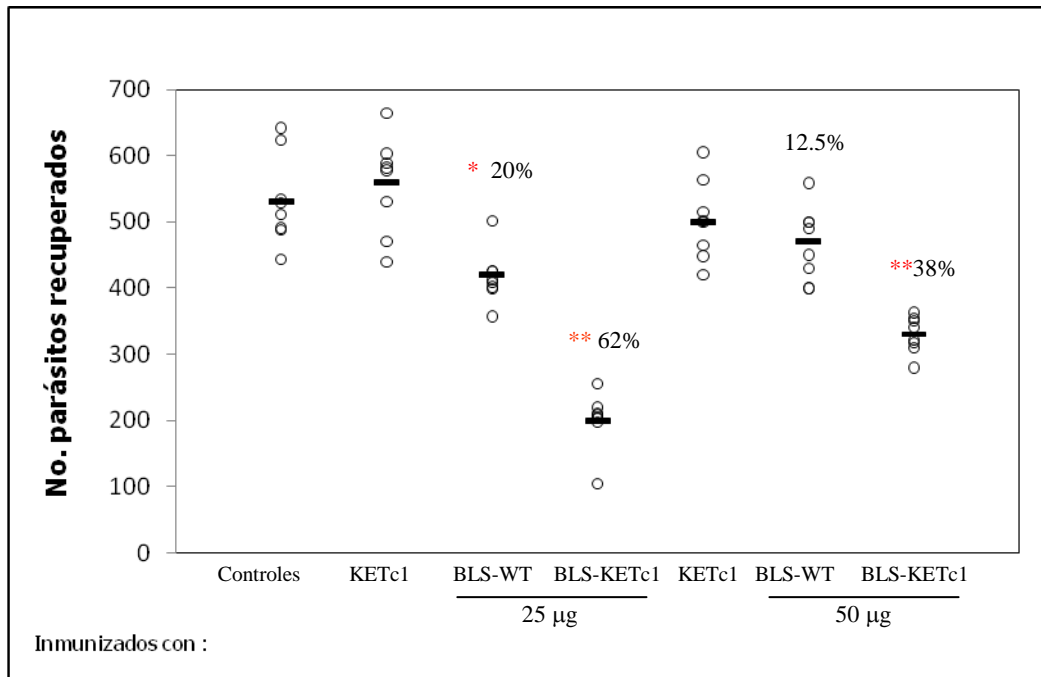
Con el propósito de aumentar la eficiencia de la presentación de los antígenos solubles a la membrana de mucosas se han considerado diferentes estrategias de presentación del antígeno que permitan incrementar su absorción, prevenir su degradación y favorecer una respuesta protectora contra el agente infeccioso evitando un fenómeno de tolerancia. Entre los diferentes sistemas utilizados para estos propósitos figuran el empleo de sistemas de presentación que incluyen vectores bacterianos o virales, la expresión en plantas transgénicas o el encapsulamiento de los antígenos (Mestecky et al., 1997).

Considerando la posibilidad de que los sistemas de expresión utilizados en este trabajo aumentaran la inmunogenicidad del péptido KETc1 administrado por vía oral, se evaluó la respuesta protectora inducida por la vacunación oral con los tres sistemas de expresión del péptido KETc1, realizando en cada caso curvas dosis-respuesta basados en las dosis empleadas por inmunización subcutánea.

### **7.2.1 BLS como sistema acarreador**

Para este sistema primero se evaluó la carga parasitaria de ratones inmunizados 3 veces con BLS-KETc1 a dos diferentes dosis (25 ó 50 µg/ratón). Como se observa en la Figura 2, la inmunización con la dosis más baja (25µg) de BLS-KETc1 indujo una disminución significativa en el número de parásitos recuperados (62%) con respecto a los controles y que no difiere significativamente de la protección inducida con la dosis de 50µg (38%). No se observó protección total en los ratones inmunizados. Por otro lado, la inmunización oral con la proteína BLS-WT redujo la carga parasitaria (12.5%-20%) en menor extensión que cuando contiene fusionado al péptido KETc1 (30-52%).

FIGURA 2. Evaluación de la capacidad protectora inducida por vacunación oral aplicando 3 dosis de KETc1 asociada a la proteína quimérica BLS.



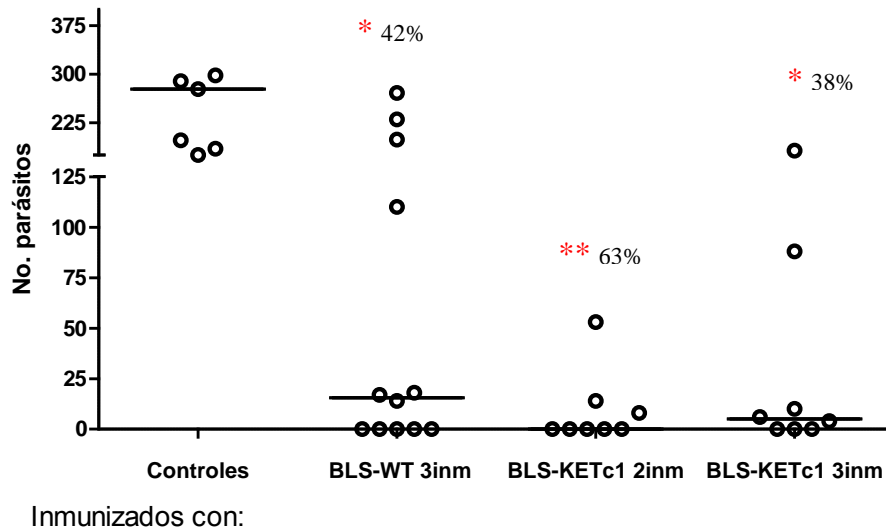
\* Diferencia significativa con respecto al grupo control (\* $p < 0.01$  o \*\* $p < 0.001$  ANOVA). Porcentaje de reducción de la carga parasitaria

Posteriormente, se evaluó el efecto del número de inmunizaciones de BLS como sistema acarreador de KETc1 empleando 25µg/ratón, observando protección inducida por dos y tres inmunizaciones con respecto al grupo control; sin embargo, no se encontró diferencia significativa entre 2 y 3 inmunizaciones (Figura 3). Con base en esta información se decidió utilizar para los siguientes experimentos dos dosis de 25µg/ratón.

### 7.2.2. M13 como sistema acarreador

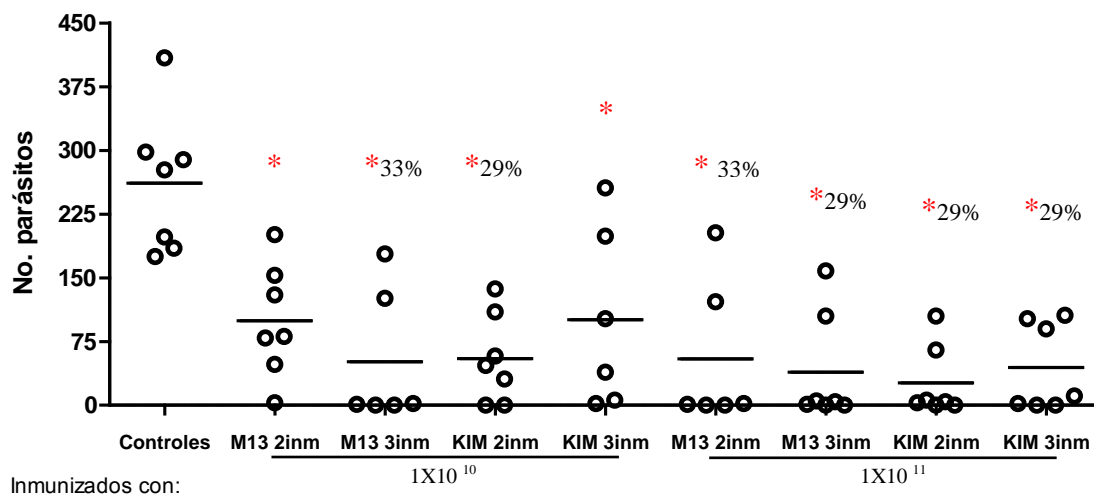
Con respecto al empleo de fagos filamentosos en la dosis baja ( $1 \times 10^{10}$ ) se encontró que la inmunización con M13 fue capaz de disminuir el número de parásitos recuperados con respecto al grupo control. Sin embargo, la presencia de KETc1 induce un mayor porcentaje de animales protegidos totalmente aplicando dos inmunizaciones (Figura 4).

FIGURA 3. Evaluación del número de dosis en la protección inducida por inmunización oral con KETc1 asociada a la proteína quimérica BLS



Inmunizados con:  
 Número individual de cisticercos recuperados 45 días después de la infección con 10 cisticercos. Diferencia significativa entre los grupos controles e inmunizados (\*p<0.05 o \*\*p<0.01, ANOVA, K-W). Porcentaje de ratones totalmente protegidos.

FIGURA 4. Evaluación de la capacidad protectora inducida por inmunización oral de KETc1 asociado a la proteína III del fago filamentoso M13



Inmunizados con:  
 Número individual de cisticercos recuperados 45 días después de la infección con 10 cisticercos. Diferencia significativa en la carga parasitaria entre los grupos controles e inmunizados (\*p<0.01 ANOVA). Porcentaje de ratones totalmente protegidos

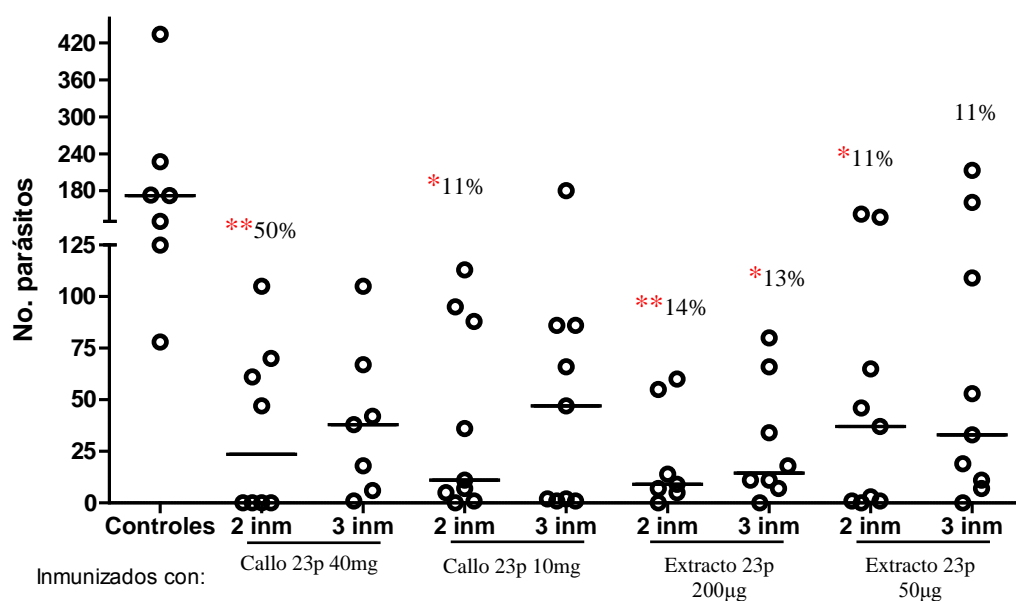
En la dosis más alta empleada ( $1 \times 10^{11}$ ) no hubo diferencia en la capacidad protectora inducida por el acarreador M13 y la construcción K1M (Figura 4). Sin embargo, se decidió emplear esta dosis aún cuando no se encontró diferencia significativa considerando que la expresión de proteínas en la proteína cpIII implica un bajo número de copias por partícula de fago. Es factible que el aumento en la cantidad de fago recombinante permita incrementar tanto al péptido KETc1 como a las proteínas propias del fago y dado que el fago *per se* estimula una respuesta inmune, podría enmascarar el efecto protector inducido por KETc1 en la construcción.

### **7.2.3 Callos transgénicos de papaya como sistema de expresión**

Para evaluar la capacidad protectora de la expresión de KETc1 en papaya transgénica se emplearon dos formas de presentación del antígeno: el callo en suspensión y como extracto soluble. En la Figura 5 se observa que ambas formas de administración fueron capaces de proteger en contra de la cisticercosis murina empleando dos inmunizaciones, tanto para la dosis mayor (40mg de callo en suspensión ó 200µg extracto soluble) como para la más baja (10 mg callo ó 50µg extracto). Además se observa protección total en la mitad de los animales vacunados cuando se administra el callo en suspensión en la mayor concentración.

Considerando la mayor capacidad protectora, la simplicidad en la obtención de callos en suspensión y que la presentación en suspensión mantiene la pared celular ofreciendo la posibilidad de mayor preservación del péptido se decidió utilizar la forma de callos embriogénicos en suspensión en dosis de 40mg/ratón como forma de administración de la vacuna oral.

FIGURA 5. Evaluación de la capacidad protectora inducida por inmunización oral de KETc1 expresado en callos embriogénicos de papaya



Diferencia significativa en la carga parasitaria entre los grupos controles e inmunizados (\*  $p < 0.05$  ó \*\* $p < 0.01$ , K-W ANOVA). Porcentaje de ratones totalmente protegidos

### 7.3. Estudio comparativo de la capacidad protectora utilizando los diferentes sistemas de expresión

Con base en los resultados anteriores se determinaron las condiciones de inmunización y se realizaron experimentos comparativos para cada una de las vías de administración de los inmunógenos. Las condiciones de inmunización utilizadas para cada una de las presentaciones de KETc1 fueron:

|           | SISTEMICA (VIA SC)           | ORAL                 |
|-----------|------------------------------|----------------------|
| CONTROLES | SSI                          | SSI                  |
| KETc1     | 10µg                         | 10µg                 |
| BLS-KETc1 | 50µg                         | 25µg                 |
| K1M       | $1 \times 10^{11}$           | $1 \times 10^{11}$   |
| pKETc1    | 200 µg<br>(extracto soluble) | 40mg<br>(suspensión) |

### **7.3.1 Por vía sistémica**

En las Tablas 4A, 4B y 4D se observan tres experimentos independientes realizados para evaluar el efecto de los inmunógenos aplicados por vía subcutánea. Los resultados indican que la inmunización con el péptido sintético, asociado a BLS (BLS-KETc1) o expresado en callos transgénicos (pKETc1) disminuyen de forma significativa la carga parasitaria (81-99%) y el número de ratones totalmente protegidos en la misma extensión (29-71%). En uno de los tres experimentos el inmunógeno BLS-KETc1 no indujo la protección esperada (Tabla 4B) sin embargo en estudios previos se ha demostrado su capacidad protectora (Sciutto et al., 2005).

La cantidad de parásitos recuperados de los ratones inmunizados con el péptido asociado al fago M13 (K1M) no se redujo significativamente con respecto a los controles. Los niveles de protección observados con este inmunógeno fueron inferiores a las otras tres formas de presentación del péptido. Al respecto, cabe considerar que KETc1 está asociado a la proteína cpIII lo que implica un menor número de copias con respecto de los otros 3 péptidos recombinantes que constituyen la vacuna CPhV que se han asociado a cpVIII en mayor número de copias y cuya capacidad protectora resultó en este estudio del 77% (Tabla 4B).

### **7.3.2 Por vía oral**

Se realizaron dos experimentos independientes de la capacidad protectora de los 4 inmunógenos administrados por vía oral, cuyos resultados se ilustran en las tablas 4C y 4D.

Como se observa, KETc1 en forma sintética administrado por vía oral en ausencia de adyuvante no redujo la carga parasitaria esperada.

La inmunización con el péptido asociado a BLS o expresado en callos transgénicos resultaron las dos presentaciones que indujeron el mayor porcentaje de protección con respecto a los controles en términos de la reducción de la carga parasitaria promedio (73-100%) así como en el porcentaje de ratones totalmente protegidos (50-88%).

La inmunización con KETc1 expresado en M13 redujo la parasitosis a través de la disminución de la carga parasitaria (98%) o mediante la protección total de los ratones (57%).

De acuerdo al experimento comparativo de la capacidad protectora inducida por inmunización subcutánea u oral con los distintos inmunógenos (Tabla 4D) podemos señalar que el sistema de expresión de péptidos recombinantes en callos embriogénicos de papaya y en la proteína lumazina sintetasa son los más eficientes en inducir una respuesta efectiva en contra de la cisticercosis murina.

TABLA 4. Comparación de la capacidad protectora de KETc1 inducida por vacunación subcutánea u oral

| A                               | GRUPO EXPERIMENTAL              | No. de cisticercos <sup>1</sup>                                       | Intensidad <sup>2</sup>          | %Protección <sup>3</sup>        |              |
|---------------------------------|---------------------------------|---|----------------------------------|---------------------------------|--------------|
|                                 | Controles                       | 65, 118, 101, 178, 34, 69, 119  | 101 [54.2- 141.2 ] <sup>a</sup>  |                                 |              |
| Inmunizados vía subcutánea con: |                                 |   |                                  |                                 |              |
|                                 | KETc1                           | 0, 1, 13, 8, 0, ,18, 2  | 2 [-65 – 12.6 ] <sup>b</sup>     | 98 (29%)                        |              |
|                                 | BLS-KETc1                       | 0, 0, 2, 1, 9, 1  | 1 [-1.4 - 5.8] <sup>b</sup>      | 99 (33%)                        |              |
|                                 | pKETc1 <sub>41</sub>            | 0, 1, 1, 4, 0, 17, 1  | 1 [-2.2 - 9.1] <sup>b</sup>      | 99 (29%)                        |              |
|                                 | K1M-p3                          | 0, 81, 2, 15, 0, 9, 53  | 9 [-6.5 – 52.2] <sup>a,b</sup>   | 91 (29%)                        |              |
| B                               | Controles                       | 47, 48, 46, 116<br>172, 173, 130, 227, 434, 78                        | 123 [62.4 - 231.8 ] <sup>a</sup> |                                 |              |
|                                 | Inmunizados vía subcutánea con: |   |                                  |                                 |              |
|                                 |                                 | KETc1   | 1, 3, 0, 160, 0, 2, 0            | 1 [-31.9 - 79.3 ] <sup>b</sup>  | 84 (43%*)    |
|                                 |                                 | BLS-KETc1   | 2, 0, 154, 230, 6, 102, 66       | 66 [-1.5 - 161.5] <sup>a</sup>  | 46 (14%)     |
|                                 |                                 | pKETc1 <sub>3</sub>   | 0, 191, 0, 0, 2, 0, 1            | 0 [-38.9 - 94.3] <sup>b</sup>   | 81 (57%*)    |
|                                 |                                 | K1M-p3  | 25, 201, 0, 34, 58, 270, 337     | 58 [7.0 - 257.2] <sup>a,b</sup> | 10 (14%)     |
|                                 |                                 | CPhV  | 7, 66, 27, 64, 65, 0, 0          | 27 [3.6 - 61.9] <sup>b</sup>    | 77 (28.5%)   |
| C                               | Controles                       | 277, 185, 198, 175, 298, 289, 409<br>125, 172, 173, 130, 227, 434, 78 | 191 [166 - 286.5 ] <sup>a</sup>  |                                 |              |
|                                 | Inmunizados vía oral con:       |   |                                  |                                 |              |
|                                 |                                 | BLS-KETc1   | 14, 0, 8, 53, 0, 0, 0, 0         | 0 [-6 - 24.7] <sup>b</sup>      | 100 (62.5%*) |
|                                 |                                 | pKETc1  | 70, 61, 0, 0, 0, 47, 0, 105      | 23.5 [0.98 - 69.7] <sup>b</sup> | 87 (50%*)    |
|                                 |                                 | K1M-p3  | 3, 6, 105, 0, 65, 0, 4           | 4 [-12.6 - 64.8] <sup>b</sup>   | 98 (29%)     |
| D                               | Controles                       | 493, 166, 291, 130, 69, 453<br>173, 480, 503, 293                     | 292 [186 – 424] <sup>a</sup>     |                                 |              |
|                                 | Inmunizados vía subcutánea con: |   |                                  |                                 |              |
|                                 |                                 | KETc1   | 0, 106, 0, 0, 20, 0, 0           | 0 [-18.5 – 54.5] <sup>b</sup>   | 94 (71%*)    |
|                                 |                                 | BLS-KETc1   | 0, 3, 47, 0, 0, 0, 0             | 0 [-9 - 23.4] <sup>b</sup>      | 97 (71%*)    |
|                                 |                                 | pKETc1 <sub>9</sub>   | 0, 0, 0, 0, 1, 0, 1              | 0 [-0.2 - 0.7] <sup>b</sup>     | 99 (71%*)    |
|                                 |                                 | K1M-p3  | 86, 363, 0, 0, 4, 511, 172       | 86 [-24.8 – 349] <sup>a,b</sup> | 46 (29%)     |
|                                 | Inmunizados vía oral con:       |   |                                  |                                 |              |
|                                 |                                 | KETc1   | 451, 525, 462, 361, 419, 1, 500  | 451 [222 – 553] <sup>a</sup>    | 0 (0%)       |
|                                 |                                 | BLS-KETc1   | 0, 374, 2, 142, 0, 62, 0         | 2 [-45.6 – 211] <sup>b</sup>    | 73 (43%)     |
|                                 |                                 | pKETc1 <sub>9</sub>   | 0, 0, 0, 0, 122, 0, 0, 0         | 0 [-20.8 – 51] <sup>b</sup>     | 95 (87.5%*)  |
|                                 |                                 | K1M-p3  | 510, 0, 0, 7, 0, 337, 0          | 0 [-74 – 318] <sup>a,b</sup>    | 60 (57%*)    |

<sup>1</sup>Número de parásitos recuperados en cada ratón. <sup>2</sup>Mediana de los parásitos recuperados  
<sup>3</sup>% Protección =  $X_{\text{controles}} - X_{\text{vacunados}} / X_{\text{controles}}$  (Porcentaje de ratones totalmente protegidos)  
 Las literales indican diferencia entre los grupos inmunizados y el control (K-W,  $p < 0.05$ ). Los asteriscos (\*) indican significancia por Fisher's test en el porcentaje de ratones totalmente protegidos



## 7.4. Avances en la caracterización de las propiedades inmunogénicas de los péptidos

En esta parte del trabajo se pretendió explorar la respuesta humoral y celular asociada a la protección inducida con las diferentes construcciones.

### 7.4.1 Respuesta inmune celular

Para comenzar a estudiar el efecto de la vacunación oral y sistémica en la respuesta inmune celular se estandarizó la técnica de proliferación celular *in vivo* medida por la incorporación de BrdU aunado a la caracterización del fenotipo celular en distintos órganos linfoides.

La Tabla 5 ilustra el porcentaje de proliferación de células CD4 y/o CD8 obtenidas de bazo o placas de Peyer (PP) de ratones inmunizados (n=3) y que recibieron estímulo a distintos tiempos antes de su sacrificio con el inmunógeno respectivo. Imágenes representativas de los datos obtenidos se ilustran en el apéndice 11.1.

TABLA 5. Porcentaje de proliferación *in vivo* (BrdU<sup>+</sup>) en linfocitos CD4 o CD8

|                       |             | Estímulo (18Hrs) |             | Estímulo (90Hrs)   |                    |
|-----------------------|-------------|------------------|-------------|--------------------|--------------------|
|                       |             | %CD4+            | %CD8+       | %CD4+              | %CD8+              |
| Naive                 |             | 3,6              | 6,5         | 1.54 ± 0.4         | 1.43 ± 0.3         |
| Inmunizados con :     |             |                  |             |                    |                    |
| Vía de administración |             |                  |             |                    |                    |
| <b>Subcutánea</b>     | <b>Bazo</b> |                  |             |                    |                    |
|                       | KETc1       | 4,1              | <b>10,4</b> | 1.78 ± 0.3         | <b>1.79 ± 0.26</b> |
|                       | BLS         | 3,6              | 7,4         | 1.38 ± 0.6         | 1.55 ± 0.4         |
|                       | BLS-KETc1   | <b>10,1</b>      | <b>8,2</b>  | <b>1.93 ± 0.2</b>  | <b>1.78 ± 0.2</b>  |
|                       | NP          | 3,5              | <b>9,8</b>  | 1.51 ± 0.4         | <b>3.23 ± 0.08</b> |
|                       | pKETc1      | <b>5,65</b>      | <b>8,7</b>  | 1.81 ± 0.3         | <b>2.18 ± 0.08</b> |
|                       | K1M-p3      | 4,2              | 7,4         | <b>2.17 ± 0.05</b> | <b>2.12 ± 0.16</b> |
| <b>Oral</b>           | <b>Bazo</b> |                  |             |                    |                    |
|                       | KETc1       | 4,1              | <b>10,2</b> | 1.4 ± 0.4          | 1.31 ± 0.4         |
|                       | BLS         | 3,8              | <b>8,2</b>  | 1.38 ± 0.24        | 1.53 ± 0.18        |
|                       | BLS-KETc1   | 4,05             | <b>12,7</b> | 1.66 ± 0.2         | <b>2.49 ± 0.14</b> |
|                       | NP          | <b>4,5</b>       | 7,6         | 1.64 ± 0.03        | <b>3.7 ± 0.3</b>   |
|                       | pKETc1      | <b>5,24</b>      | <b>8,24</b> | <b>1.93 ± 0.1</b>  | <b>4.3 ± 1.4</b>   |
|                       | K1M-p3      | <b>6,35</b>      | 7,9         | 1.08 ± 0.3         | <b>3.7 ± 1.1</b>   |

**Placas de Peyer**

|           |             |             |             |              |
|-----------|-------------|-------------|-------------|--------------|
| Naive     | 3.06 ± 0.02 | 8.8 ± 0.8   | 3,1         | 7,04         |
| KETc1     | 2,88        | 7,8         | 3,59        | <b>8,91</b>  |
| BLS       | 2,79        | 10,46       | 2,34        | 7,27         |
| BLS-KETc1 | <b>7,91</b> | <b>21,7</b> | 2,47        | <b>11,86</b> |
| NP        | 3,39        | 9,22        | 3,6         | <b>9,02</b>  |
| pKETc1    | 2,49        | 10,36       | <b>4,19</b> | <b>16,67</b> |
| K1M-p3    | <b>5,07</b> | <b>11,4</b> | <b>5,44</b> | <b>22,51</b> |

Se marcan en negritas las condiciones en las que se encontraron incremento en las poblaciones proliferadas (índice de estimulación (i.e.) > 1.25)

Para analizar los resultados obtenidos se compararon los porcentajes celulares de proliferación en los animales inmunizados relativos a los controles X 100 (i.e. X 100). En la Figura 6, se ilustra el incremento en la población de células CD4+ en tiempos tempranos de estimulación (18hrs), misma que se mantiene aún después de 90 hrs de estímulo para todas las construcciones independientemente del nivel de protección inducido. También se observa el incremento de células CD8+ provenientes de ratones inmunizados con KETc1, BLS-KETc1 y pKETc1 desde tiempos tempranos de estimulación, lo cual no ocurre con la construcción de K1M sino hasta tiempos tardíos. Este resultado señala a la aparición temprana de la población CD8+, como posiblemente relevante en la protección inducida por la inmunización subcutánea.

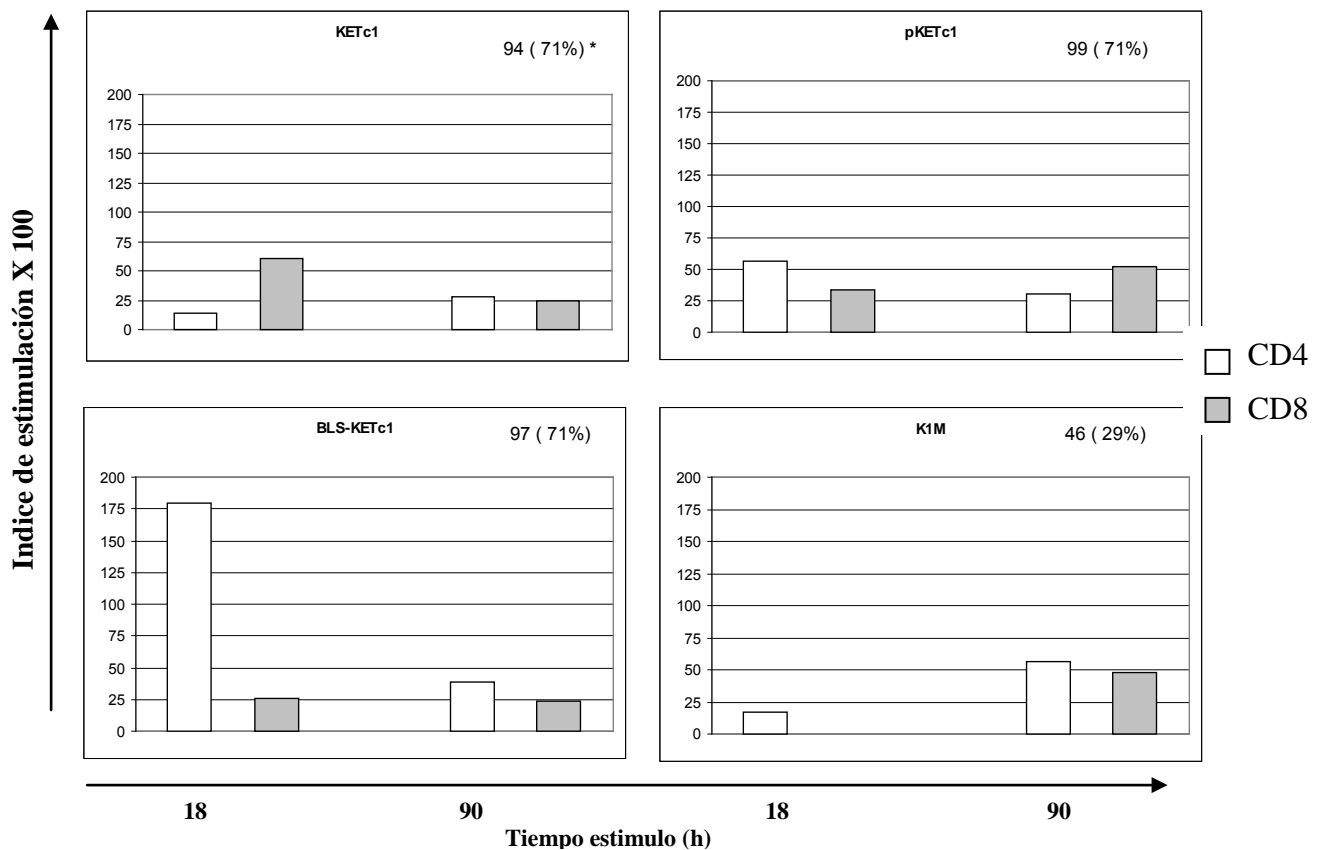


FIGURA 6. Incremento en la proliferación asociada a inmunización subcutánea en células de bazo  
 \* Porcentaje de protección inducido por la inmunización sistémica con cada inmunógeno

Las Placas de Peyer (PP) son uno de los compartimentos linfoides asociado a la inmunidad de mucosas de mayor importancia en donde se lleva el procesamiento y presentación de antígenos a linfocitos T. Por este motivo se evaluó la proliferación en células de bazo y PP de los diferentes sistemas en los ratones inmunizados por vía oral.

Cuando los ratones se inmunizaron con KETc1 sintético se encontró que un estímulo temprano favorece la proliferación y migración hacia bazo de células CD4+ y CD8+ (Figura 7A); mientras que estas poblaciones permanecen en PP en tiempos mayores (Figura 7B). La inmunización oral con BLS-KETc1 y pKETc1, produjo un incremento en la población de CD8+ y CD4+ desde tiempos tempranos en bazo (Figura 7C, 7E) así como de CD8+ en PP (Figura 7D, 7F). Con respecto a la inmunización con K1M observamos que un estímulo

específico induce la proliferación de CD4+ y CD8+ en PP (Figura 7H) y de CD8+ en bazo; sin embargo, no favorece la migración de CD4+ en tiempos tardíos (Figura 7G).

De acuerdo a estos resultados podríamos proponer que una respuesta protectora inducida por vacunación oral se encuentra asociada a la migración oportuna de linfocitos CD4+ y CD8+ activados desde el sitio de inducción (PP) hacia órganos linfoides periféricos (bazo), así como a la presencia de CD8+ activados en PP.

Cabe mencionar que aun no se ha evaluado la respuesta efectora de las células CD8+ en la parasitosis causada por *Taenia crassiceps*.

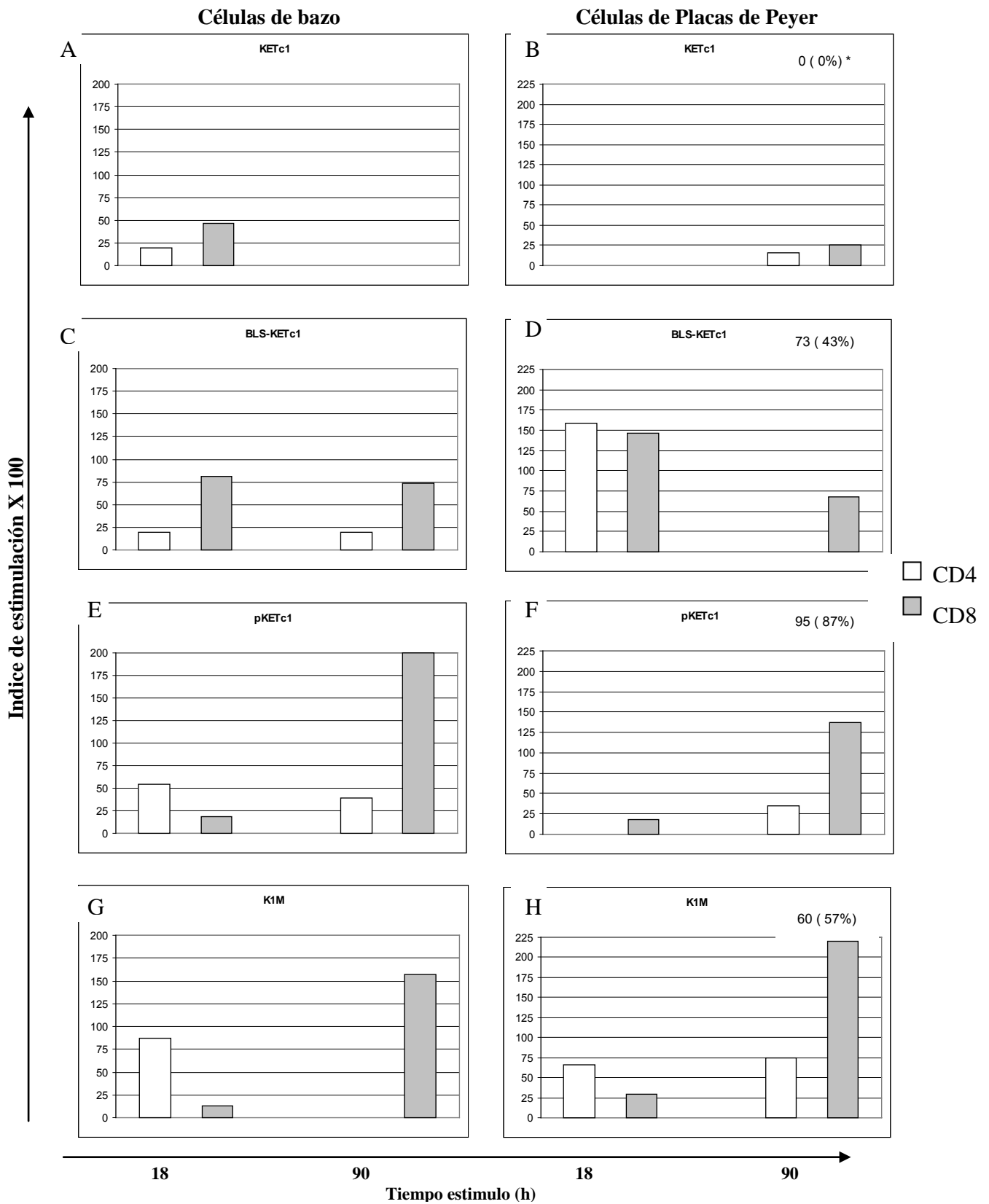


FIGURA 7. Incremento en la proliferación asociada a inmunización oral en células de bazo (A, C, E, G) y Placas de Peyer (B, D, F, H)

\* Porcentaje de protección inducido por la inmunización sistémica con cada inmunógeno

#### **7.4.2 Respuesta inmune humoral**

La respuesta inmune humoral asociada a los diferentes inmunógenos se determinó por medio de la identificación de anticuerpos específicos en contra del péptido sintético en los sueros de los ratones inmunizados utilizando la técnica de ELISA.

Como se observa en la Figura 8a, la inmunización oral con KETc1 expresado en los distintos sistemas indujo niveles de anticuerpos (IgG total) significativos detectables en suero contra el péptido. También la inmunización subcutánea con K1M indujo un incremento en los niveles de IgG que no son diferentes de los obtenidos por vacunación oral. Con el propósito de aumentar la cantidad de péptido asociado a la placa de ELISA capaz de capturar anticuerpos anti-KETc1 presentes en suero se empleó como antígeno BLS-KETc1 asociado a la placa. Los resultados se ilustran en la Figura 8b que muestran un patrón de respuesta similar a la obtenida con el péptido sintético; sin embargo en este caso también se detectaron altos niveles de IgG asociados a la inmunización subcutánea con BLS-KETc1.

Estos incrementos en los niveles de anticuerpos son bajos (menores a una densidad óptica del 0.5) aunque significativos en algunos de los grupos vacunados que se marcan en la Figura 8, y en su conjunto no se encontraron asociados con las diferencias de protección observadas.

No se detectaron niveles de anticuerpos –IgG1 e IgG2a- en ninguno de los casos de vacunación sistémica u oral. Es factible que la baja cantidad de IgG's totales inducida no permita detectar subclases de anticuerpos.

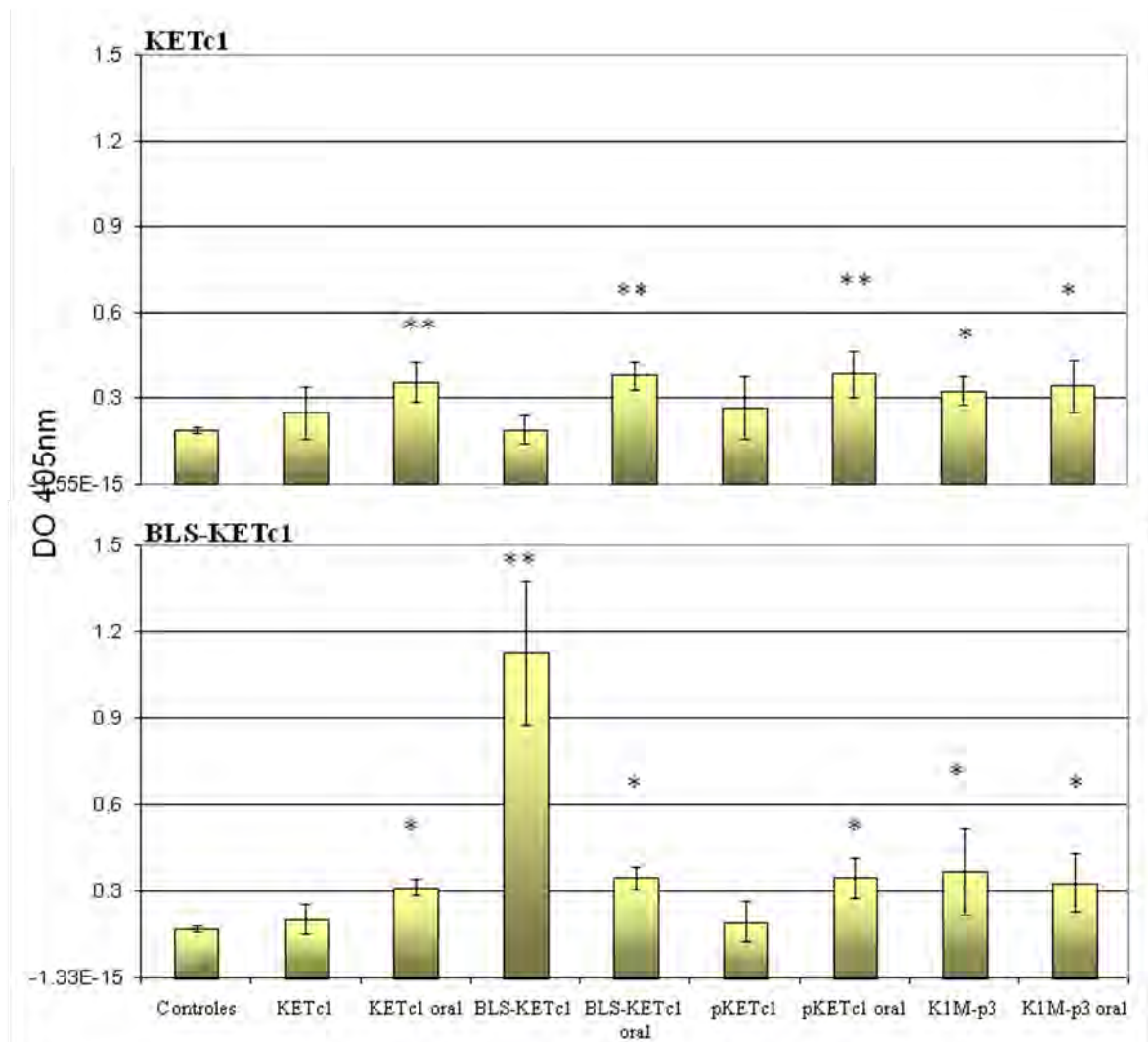


FIGURA 8. Niveles de anticuerpos IgG específicos anti-KETc1 detectados en suero de ratones inmunizados vía sistémica u oral. \* Diferencia significativa con respecto al grupo control

Considerando que la IgA es la principal clase de inmunoglobulina asociada a la respuesta en mucosas, se determinaron los niveles de IgA en suero de los ratones controles e inmunizados utilizando la metodología anteriormente mencionada. Encontramos que la inmunización oral con BLS-KETc1 y KETc1 indujo un incremento significativo en los niveles de IgA (Figura 9) cuando se utilizó como antígeno asociado a la placa de ELISA KETc1 o BLS-KETc1. También se observa un incremento en los niveles inducidos por inmunización por vía subcutánea de BLS-KETc1 cuando se empleó BLS-KETc1 en la placa. En algunos ratones inmunizados con pKETc1 y K1M se detectaron incrementos de IgA

aunque las diferencias del grupo no fueron significativas respecto al grupo control dada la heterogeneidad de la respuesta.

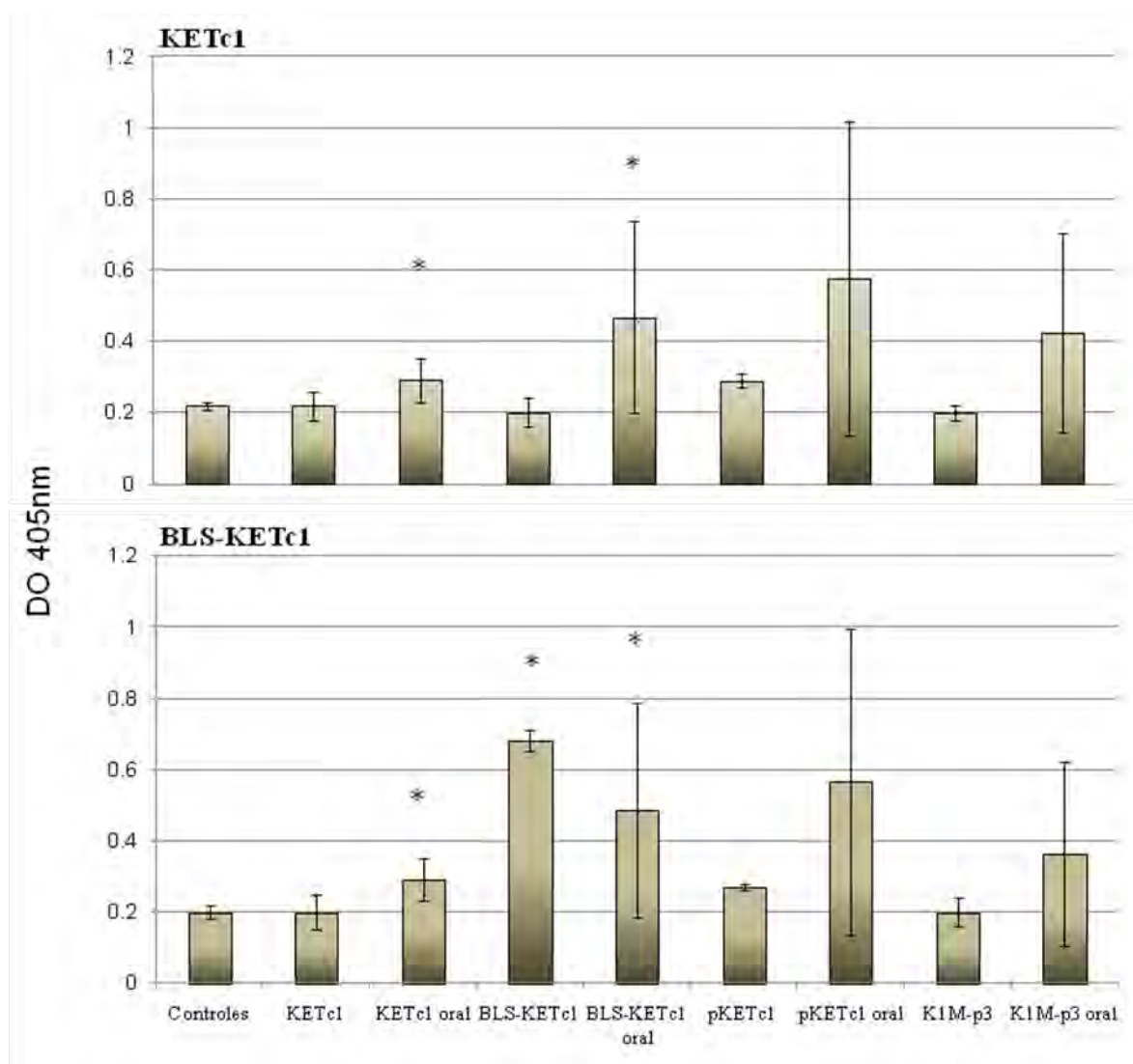


FIGURA 9. Niveles de anticuerpos IgA específicos anti-KETc1 detectados en suero de ratones inmunizados vía sistémica u oral. \*Diferencia significativa con respecto al grupo control.



## 8. DISCUSIÓN

En este estudio se evaluó el potencial de distintos sistemas de expresión de antígenos para mejorar la inmunogenicidad de los péptidos de S3Pvac. Para esto se utilizó el modelo de cisticercosis experimental murina con el propósito de evaluar la capacidad protectora y las propiedades inmunogénicas asociadas a la vacunación subcutánea y oral del péptido KETc1 administrado en forma sintética o utilizando los diferentes sistemas.

Al respecto de la capacidad protectora inducida, encontramos que los mejores candidatos para la expresión de péptidos recombinantes para uso en vacunación en contra de la cisticercosis fueron los sistemas de expresión en callos embriogénicos de papaya (pKETc1) y la proteína polimérica lumazina sintetasa (BLS-KETc1). Ambos sistemas mostraron ser efectivos al administrarse de forma subcutánea u oral. Por otro lado, el fago recombinante como sistema acarreador de KETc1 (K1M) mostró niveles de protección inferiores a los inducidos por las otras construcciones principalmente cuando se aplicó subcutáneamente. Así mismo, KETc1 expresado como péptido sintético lineal indujo protección en un nivel similar al inducido expresado en callos embriogénicos o asociado a BLS aunque sólo cuando se aplicó vía subcutánea.

Resulta de interés el alto nivel de protección inducido por un péptido lineal en particular considerando la baja capacidad inmunogénica reportada para péptidos pequeños no asociados a moléculas acarreadoras (Arnon and Regenmortel, 1992; De Berardinis et al., 2000; Manoutcharian et al., 2001; Storni et al., 2005). En este sentido hemos demostrado que los péptidos que componen la vacuna S3Pvac (KETc1, KETc12 y GK1) poseen capacidad de estimular la respuesta inmune innata a través de su capacidad para activar macrófagos (Pablo, 2007) y células dendríticas (Segura-Velázquez et al., 2009), adicional a su capacidad para inducir una respuesta inmune adaptativa. Considerando que la activación de células

presentadoras (APC) se ha reportado como uno de los eventos asociados a la inmunopotenciación de la respuesta inmune mediado por adyuvantes, interpretamos que KETc1 tiene asociada capacidad adyuvante que potencia su propia inmunogenicidad. Adicionalmente, la activación de la respuesta innata inducida por KETc1 podría directamente aumentar la resistencia a la parasitosis. En este sentido, cabe señalar que evidencias previas señalan la susceptibilidad de la cisticercosis murina a la respuesta inmune innata (Rosas et al., 1998, Terrazas et al., 2004; Meneses et al., 2009). Así, es factible que la capacidad protectora *per se* inducida por los diferentes sistemas de expresión resulte consecuencia de la exacerbación de la inmunidad innata que promueva la resistencia a la infección durante el fenómeno de instalación del parásito. Este aspecto solo se ha explorado en el caso de BLS que en estudios previos han demostrado su capacidad de activar células dendríticas a través de TLR4 (Berguer et al., 2006). Es factible que esta capacidad para activar APC medie la exacerbación de la respuesta inmune humoral mediada por BLS-WT, favorecida por el rearreglo polimérico de los antígenos presentados (Velikovsky et al., 2003).

Al respecto de la capacidad protectora inducida por el fago M13, cabe mencionar que sus propiedades adyuvantes que promueven en particular una respuesta de anticuerpos han sido previamente reportadas aunque no se han explorado los mecanismos que median este efecto. La proteína cpVIII del fago M13 contiene una región dirigida a linfocitos B restringida a los 12 residuos amino terminales así como algunos epítopes dirigidos a linfocitos T (van Houten et al., 2006). Es de interés notar que la magnitud del efecto protector inducido por el propio fago probablemente enmascare el efecto inducido por el fago recombinante. Esto es particularmente factible en la construcción utilizada en la que KETc1 se asoció a la proteína cpIII, proteína que se expresa en bajo número de copias. Con base en esta observación se decidió expresar KETc1 asociado a cpVIII como fagémido para evaluar en experimentos

posteriores si esta nueva clona presenta mayor capacidad protectora administrada por vía sistémica.

Al respecto del efecto protector de la papaya, no se ha reportado el efecto de sus componentes sobre el sistema inmunológico. Sin embargo, algunos efectos anti-parasitarios se han reportado mediados por su actividad enzimática. La papaya posee un alto contenido de cistein-proteinasas que causan daño en la cutícula de diversos nemátodos (Hammond et al., 1997; Stepek et al., 2007). También se ha demostrado la capacidad antioxidante de extractos fermentados de papaya en la línea de macrófagos RAW 264.7, en los que promueve la activación y producción de óxido nítrico (NO) y secreción de TNF- $\alpha$  (Rimbach et al., 2000). La capacidad de activación de macrófagos podría promover el daño temprano de los parásitos e interrumpir su instalación. La posibilidad de que en el fenómeno de activación de macrófagos participe la actividad enzimática de la papaya o la identificación de otros factores que participen queda aún por explorar. Estas características podrían explicar el efecto inespecífico de los callos no transgénicos sobre la reducción de la carga parasitaria.

Otra información que se reporta en esta tesis y merece comentarios adicionales es la capacidad protectora asociada a la inmunización oral utilizando callos embriogénicos de papaya genéticamente transformados. El nivel de protección inducido es similar al generado por inmunización con la quimera BLS-KETc1. Sin embargo, consideramos que el sistema de plantas confiere características ventajosas adicionales siempre que se trata de una suspensión de los callos que no requiere procesos de purificación para la obtención del antígeno y no presenta componentes bacterianos que pudieran asociarse a efectos colaterales no deseados inducidos por vacunación. Cabe considerar que la inmunización oral resulta especialmente pertinente para la prevención de la cisticercosis, que en condiciones naturales de transmisión se adquiere con la entrada de los huevos a través del intestino. Así la inducción de una respuesta inmune en mucosas adicional a la respuesta inmune sistémica representa una

primera barrera de defensa contra la entrada del patógeno (Kiyono and Fukuyama., 2004; Molina et al., 2005; Webster et al; Rosas et al., 2006)

Al respecto de la respuesta inmune celular asociada a la inmunización subcutánea y/o oral con las construcciones más protectoras (pKETc1 y BLS-KETc1, KETc1 o K1M, respectivamente) se observa que éstas inducen un incremento en la proliferación de CD4+ y de células CD8+ de bazo, lo cual indica un eficiente priming *in vivo* de esta población celular inducida por la vacunación s.c. u oral (Figura 6 y 7). También la inmunización oral produjo la proliferación de CD8+ en Placas de Peyer (Figura 7). El aumento de las células CD8+ asociadas a la vacunación ha sido previamente reportado utilizando diferentes sistemas de vacunación. En vacunación génica en contra de la cisticercosis murina la inmunización intradérmica e intramuscular con la construcción pTc-sp7 (Cruz-Revilla et al., 2000) así como la inmunización intraesplénica con pcDVH18 (Cano et al., 2001) indujeron una respuesta celular específica a antígenos de *T. crassiceps*, en la que la población proliferada resultó esencialmente CD8+. Clásicamente, se ha reportado la actividad citotóxica de las células CD8+ por contacto, mediada por receptores TCR específicos (Pedro-Vasconcelos et al., 1996). Considerando los mecanismos probables que resulten en el control de la parasitosis mediados por CD8+, se han reportado mecanismos de activación de linfocitos citotóxicos (CTL) independientes de contacto con CD4+ empleando *B.abortus* atenuada (Huang et al., 2005). Además de la co-participación de las citocinas IL-2 e IL-6 en la generación de CTL a partir de precursores CD8+CD45RA+ (Bass et al., 1993). Durante la infección se ha encontrado que la población de linfocitos CD4+ TCRαβ+ tiene un papel importante en el control de la cisticercosis murina (López-Briones et al., 2001), con lo que el incremento en la población de CD4+ asociada a la inmunización (Tabla 5) pudiera tener una importancia en la protección inducida a través de la activación de linfocitos CD8+ o de macrófagos.

Es también factible que la actividad antiparasitaria de CD8+ se deba a su capacidad para secretar citocinas proinflamatorias (IFN- $\gamma$ , LT y TNF $\alpha$ ) que generen un ambiente celular capaz de dañar al parásito temprano y evitar su instalación (Vasconcelos et al., 1996). En este sentido, mientras que en algunas infecciones causadas por helmintos el conjunto de citocinas Th2 (IL-4, IL-5 e IL-13) participan en la eliminación del parásito con incrementos en los niveles de IgE y de eosinófilos (Cortes et al; Sher et al., 2003), este no parece ser el mecanismo en la cisticercosis murina. Trabajos reportados por diferentes autores indican que la inducción de la respuesta Th1 es capaz de controlar la parasitosis por *Taenia crassiceps* (Bojalil et al., 1993; Terrazas et al., 1999; Rodriguez-Sosa et al., 2004; Alonso et al., 2007). En otras infecciones relacionadas (*Echinococcus multilocularis*, *E. granulosus*, *Schistosoma*) también se ha observado la relevancia de la respuesta Th1 en la protección (Terrazas et al., 2004; Al Qaoud et al., 2005; Van Riet et al., 2007).

En este trabajo no se cuantificaron niveles citocinas, sin embargo estudios realizados con BLS-WT (Velikovsky et al., 2003; Rosas et al., 2006) y el fago M13 (Manoutcharian et al., 1999, 2004) apuntan hacia la inducción de una respuesta celular Th1 relacionada con la resistencia a la cisticercosis.

Cabe señalar que durante el desafío se produce la fragmentación del cisticerco mediante el uso de una jeringa de bajo calibre (27G), los cuales en algunos días pueden reconstituirse en cisticercos (Sciutto et al., 1997). Esta forma de infección induce una respuesta temprana mediada por la llegada de macrófagos y células NK a la cavidad peritoneal del ratón (Meneses et al., 2009). La llegada de estas células pudieran ser las primeras responsables de inhibir la capacidad de instalación del cisticerco mediante la producción de IFN- $\gamma$  por células NK que activan a los macrófagos, los cuales inducen la diferenciación de linfocitos Th1 (producción de IL-12) y la producción de NO que podría asociarse a la destrucción del parásito. La inducción de células CD4+ Th1 ejerce una

respuesta restrictiva del crecimiento del parásito y a su vez podría estimular la diferenciación de linfocitos CD8<sup>+</sup> en CTL's. Otro mecanismo temprano involucrado posiblemente es la participación de los anticuerpos que podrían opsonizar los fragmentos parasitarios, promoviendo su fagocitosis y presentación antigénica así como posible daño del parásito a través del sistema de complemento.

Al respecto de la respuesta de anticuerpos, aún se desconoce su relevancia en el control de la cisticercosis murina. En los resultados obtenidos podemos observar un incremento significativo en los niveles de IgG en suero inducidos por la inmunización oral con los distintos sistemas (Figura 8) que no se asociaron con las diferencias en la protección inducida. Sin embargo, esta respuesta humoral podría ser de relevancia considerando la capacidad de los anticuerpos anti-GK1 para interferir en el desarrollo de cisticercos de *T. solium* al estado adulto o bien en la transformación a cisticercos a partir de células de cisticercos de *T. crassiceps* (Garcia et al., 2001). Estudios de la infección temprana con *T. taeniaformis* en ratas han demostrado la capacidad protectora asociada a anticuerpos enriquecidos principalmente en IgG2a; además se ha descrito la participación del complemento en la protección mediada por anticuerpos (Lightowers et al., 2003). Por otro lado, la inmunización de cerdos con la vacuna Tso118-Tso145 indujo un incremento en los niveles de IgG1 que no se asociaron a protección pero que fueron capaces de destruir oncosferas activadas de *T. solium in vitro* mediada por complemento (Kyngdon et al., 2006). Así, aunque no parece existir una relación directa entre los niveles de protección y la cantidad de anticuerpos inducidos, éstos parecen poder afectar el desarrollo del parásito (Briones et al., 2001; Baz et al., 2008).

Otro mecanismo anti-parasitario que merece mención es el efecto de las cistein-proteinasas en diversos protozoarios y helmintos. Estas enzimas juegan un papel importante en la capacidad de infección y adaptación del parásito en el hospedero (Izuhara et al., 2008).

Las cistein-proteinasas identificadas en metacéstodos de *T. crassiceps* y *T. solium* son capaces de degradar IgG del hospedero, a través de su captación vía receptores Fc (White et al., 1997; Li AH et al., 2006) y de eliminar e inducir apoptosis de linfocitos CD4+ *in vitro* (Tato et al., 2004).

Estos efectos podrían aumentar la complejidad en la interpretación del papel de los anticuerpos en la resistencia inducida por vacunación en contra de la cisticercosis y señalan el interés de ahondar en el estudio de la funcionalidad de los anticuerpos en el daño a los cisticercos instalados.

## 9. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Este trabajo de tesis establece los datos necesarios para describir el potencial de distintos sistemas de expresión de antígenos vacunales. Los sistemas empleados como acarreadores de antígenos parecen modificar el fenómeno de presentación antigénica y representan sistemas de interés potencial para la producción de moléculas para uso inmunoterapéutico y de vacunación. Durante el estudio realizado se identificó como el mejor sistema de expresión a los callos embriogénicos de papaya modificados genéticamente considerando la capacidad protectora inducida administrados oral y sistémicamente, el bajo costo de producción de los callos recombinantes, la ausencia del requerimiento de cualquier tratamiento o purificación adicional considerando que se produce en un sistema inocuo para el hombre y en ausencia de componentes bacterianos.

Con respecto a la respuesta celular inducida, se encontró un aumento en la proliferación de CD4+ y CD8+ de células de bazo o Placas de Peyer en los grupos donde se observaron los mayores niveles de protección.

En cuanto a la respuesta humoral, se encontró un aumento de anticuerpos IgG anti-KETc1 con respecto al grupo control en aquellos ratones que recibieron los distintos inmunógenos por vía oral pero este incremento no se asoció a la protección inducida.

Los resultados obtenidos señalan el interés de ahondar en los mecanismos que median la protección inducida y en aquellos relacionados con el efecto protector de los sistemas acarreadores que permitiría incrementar nuestro conocimiento en esta área. En este sentido, cabe mencionar el interés de utilizar ratones KO en MHC-I o MHC-II para identificar el papel que desempeñan las células CD8+ y CD4+ en la respuesta celular. También resultará de interés evaluar la importancia de los anticuerpos en la respuesta protectora principalmente en etapas tempranas de la parasitosis.



## 10. BIBLIOGRAFÍA

- Alonso-Trujillo J, Rivera-Montoya I, Rodríguez-Sosa M, Terrazas LI (2007). Nitric oxide contributes to host resistance against experimental *Taenia crassiceps* cysticercosis. *Parasitol Res* 100(6):1341-50.
- Al-Qaoud K., Abdel-Hafez S (2005). Humoral and cytokine response during protection of mice against secondary hydatidosis caused by *Echinococcus granulosus*. *Parasitol Res* 98: 54–60
- Arnon R and Regenmortel M.H. (1992). Structural basis of antigenic specificity and design of new vaccines. *The FASEB Journal* 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
- Bass H., Yamashita N., Clement L (1993). Heterogeneous Mechanisms of Human Cytotoxic T Lymphocyte Generation. *Journal of Immunology* 151 : 2895-2903
- Baz A., Carol H., Fernández V., Mourglia-Ettlin G., Nieto A., Dematteis S (2008). *Echinococcus granulosus*: Induction of T-independent antibody response against protoscolex glycoconjugates in early experimental infection. *Experimental Parasitology* 119:460–466
- Berguer PM, Mundiñano J, Piazzon I, Goldbaum FA (2006). A polymeric bacterial protein activates dendritic cells via TLR4. *J Immunol* 176(4):2366-72
- Boa M, Mukaratirwa S, Willingham AL, Johansen MV (2003). Regional action plan for combating *Taenia solium* cysticercosis/taeniosis in Eastern and Southern Africa. *Acta Trop.* 87(1):183-6
- 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
- Cabrera-Ponce JL, Vegas JA, Herrera-Estrella L (1995). Herbicide resistant transgenic papaya plants produced by and efficient particle bombardments transformation methods. *Plant Cell Reports* 15:1–7.
- Cai X., Chai Z., Wang P., Luo X., Chen J., Dou Y., Feng S., Jin J (2001). Studies on the development of DNA vaccine against *Cysticercus cellulosae* infection and its efficacy. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 32 (2):105-10.

- Cano A, Fragoso G, Gevorkian G, Terrazas LI, Petrossian P, Govezensky T, Sciutto E, Manoutcharian K (2001). Intraspleen DNA inoculation elicits protective cellular immune responses. *DNA Cell Biol* 20(4):215-21.
- Cao W., Van der Ploeg C.P.B., Xu J., Gao C., Ge L and Habbema J.D.F. (1997). Risk factors for human cisticercosis morbidity: a population-based case-control study. *Epidemiol. Infect.* 119:231-235
- Cortes I., Molinari JL., Solano S., Hernandez-Mendoza L., Ramirez A., Tato P (2003). *Taenia solium* metacestode antigens which are protective for pigs induce Th1/Th2 mixed responses in mice. *Parasitol Res* 90: 273–279
- Cramer R., Suter M (1993). Display of biologically active proteins on the surface of filamentous phages: A cDNA cloning system for selection of functional gene products linked to the genetic information responsible for their production. *Gene* 137: 69-75
- Cramer R., Jaussi R., Menz G., Blaser K (1994). Display of expression products of cDNA libraries on phage surfaces. *Eur J Biochem* 226: 53-58
- Clark J and March J (2006). Bacteriophages and biotechnology: vaccines, gene therapy and antibacterials. *Trends in Biotechnology* 24:212-218
- Cruz-Revilla C. (1999). Evaluación de las posibilidades de la inmunización con DNA en la cisticercosis experimental murina. Tesis. Facultad de Ciencias. UNAM. México
- Cruz-Revilla C, Rosas G, Fragoso G, López-Casillas F, Toledo A, Larralde C, Sciutto E (2000). *Taenia crassiceps* cysticercosis: protective effect and immune response elicited by DNA immunization. *J Parasitol* 86(1):67-74
- 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 Aluja AS, Villalobos NM, Nava G, Toledo A, Martínez JJ, Plancarte A, Rodarte LF, Fragoso G, Sciutto E (2005). Therapeutic capacity of the synthetic peptide-based vaccine against *Taenia solium* cysticercosis in pigs. *Vaccine* 23(31):4062-9.
- De Berardinis P., Sartorius R., Fanutti C., Perham R., Del-Pozzo G., Guardiola J (2000). Phage display of peptide epitopes from HIV-1 elicits strong cytolytic responses. *Nature Biotechnology* 18: 873-878
- 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
- Eddi C, Nari A, Amanfu W (2003). *Taenia solium* cysticercosis/taeniosis: potential linkage with FAO activities; FAO support possibilities. *Acta Trop* 87(1):145-8

- Fack F., Hügle-Dörr B., Song D., Queitsch I., Petersen G., Bautz KFE (1997). Epitope mapping by phage display: random versus gene fragment libraries. *J Immunol Methods* 206: 43-52
- 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., Chavarría A., Carrillo Mezo R.A., Lloyd C., Dessein A., Preux P.M., Dumas M., Larralde C., Scitutto E., and Frafoso G (2003). High prevalence of calcified silent neurocysticercosis in a rural village of Mexico. *Neuroepidemiology.* 22(2): 139-145.
- Fleury A, Morales J, Bobes RJ, Dumas M, Yáñez O, Piña J, Carrillo-Mezo R, Martínez JJ, Fragoso G, Dessein A, Larralde C, Scitutto E. (2006). An epidemiological study of familial neurocysticercosis in an endemic Mexican community. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 100(6):551-8.
- Flisser A, Gauci CG, Zoli A, Martinez-Ocaña J, Garza-Rodriguez A, Dominguez-Alpizar JL, Maravilla P, Rodriguez-Canul R, Avila G, Aguilar-Vega L, Kyngdon C, Geerts S, Lightowers MW. (2004). Induction of protection against porcine cysticercosis by vaccination with recombinant oncosphere antigens. *Infect Immun.* 72(9):5292-7.
- Floss DM, Falkenburg D, Conrad U (2007). Production of vaccines and therapeutic antibodies for veterinary applications in transgenic plants: an overview. *Transgenic Res* 16(3):315-32.
- 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., Scitutto 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.
- Gevorkian G., Manoutcharian K., Almagro J.C., Govezensky T. and Dominguez V (1998). Identification of autoimmune thrombocytopenic purpura. Related epitopes using phage display library. *Clin Immun. And Immunopathology* 86:305-309

- 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., 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
- Gonzalez AE; Gauci CG; Barber D; Gilman RH; Tsang VCW; Garcia HH; Verastegui M; Lightowers MW (2005) Short report: Vaccination of pigs to control human neurocysticercosis. *American Journal of Tropical medicine and Hygiene*, 72:837-839.
- Guo YJ., Sun SH., Zhang Y., Chen ZH., Wang KY., Huang L., Zhang S, Wang QM., Zhu WJ (2004). Protection of pigs against *Taenia solium* cysticercosis using recombinant antigen or in combination with DNA vaccine. *Vaccine* 22(29-30):3841-7
- Hammond, J. A., Fielding, D., Bishop, S. C. Prospects for plant anthelmintics in tropical veterinary medicine. *Vet. Res. Commun.* 1997. 21:213-28.
- 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
- Hernandez M., Cabrera-Ponce JL., Fragoso G., Lopez-Casillas F., Guevara-Garcia A., Rosas G., Leon-Ramirez C., Juarez P., Sanchez-Garcia G., Cervantes J., Acero G., Toledo A., Cruz C., Bojalil R., Herrera-Estrella L., Sciutto E (2007). A new highly effective anticysticercosis vaccine expressed in transgenic papaya. *Vaccine* 25(21):4252-60
- Hilleman M.R. (1998). Six decades of vaccine development-a personal history. *Nature Med.* 4:507-514
- Holmgren J., Czerkinsky C., Eriksson K., Mharandi A (2003). Mucosal immunization and adjuvants: a brief overview of recent advances and challenges. *Vaccine* 21: 89-95
- Holmgren J., Adamsson J., Anjuere F., Clemens J., et al (2005). Mucosal adjuvants and anti-infection and anti-immunopathology vaccines based on cholera toxin, cholera toxin B subunit and CpG DNA. *Immunology Letters* 97:181-188
- Holzem A., Nähring JM., Fischer R (2001). Rapid identification of a tobacco mosaic virus epitope by using a coat protein gene-fragment pVIII fusion library. *J Gen Virol* 82: 9-15

- Hoop T and Woods K (1981). Prediction of protein antigenic determinants from aminoacid sequences. Proc. Nati. Acad. Sci. 78: 3824-3828
- Huang L., Ishii K., Shizuo Akira S., Aliberti J., Golding B (2005). Th1-Like Cytokine Induction by Heat-Killed *Brucella abortus* Is Dependent on Triggering of TLR9. The Journal of Immunology 175: 3964–3970.
- 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 (2001). Synthetic peptide vaccine against *Taenia solium* pig cisticercosis successful vaccination in a controlled field trial in rural México. Vaccine. 2793: 1-5.
- Izuhara K, Kanaji S, Arima K, Ohta S, Shiraishi H (2008). Involvement of cysteine protease inhibitors in the defense mechanism against parasites. Med Chem 4(4):322-7
- Jiménez-Marcial ME, Velásquez-Pérez L (2004). Morbilidad en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez” 1995-2001. Gac Med Mex 140 (2): 155-162
- Joshi L and Lopez L (2005). Bioprospecting in plants for engineered proteins. Current Opinion in Plant Biology 8: 223-226
- Jung S., Arndt K.M., Muller L.M., Pluckthun A (1999). Selectively infective phage (SIP) technology: scope and limitations. J Immuno. Meths. 231:93-104
- Kapusta J., Modelska A., Figlerowicz M., et al (1999). A plant derived edible vaccine against hepatitis B virus. FASEB J 13:1796-1799
- Kiyono H, Fukuyama S (2004). NALT- versus Peyer's-patch-mediated mucosal immunity. Nat Rev Immunol 4(9):699-710
- 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. 353(1):124-37.
- Korban SS, Krasnyanski SF, Buetow DE (2002). Foods as production and delivery vehicles for human vaccines. J Am Coll Nutr 21:212S-217S
- Kramer RA, Cox F, van der Horst M, van den Oudenrijn S, Res P, Bia J, de Kruif J (2003). A novel helper phage that improves phage display selection efficiency by preventing the amplification of phages without recombinant protein. Nucleic Acids Research 31: 1-9
- Kyngdon C., Gauci C., Gonzalez A., Flisser A., Zoli A., Read A., Martínez-Ocaña J., Strugnell R., Lightowlers M (2006). Antibody responses and epitope specificities to the *Taenia solium* cysticercosis vaccines TSOL18 and TSOL45-1A. Parasite Immunology 28:191–199

- 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
- Larralde 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
- Lessard PA, Kulaveerasingam H, York GM, Strong A, Sinskey AJ (2002). Manipulating gene expression for the metabolic engineering of plants. *Metab Eng* 4(1):67-79.
- 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
- Li A., Moon S., Park Y., Na B., Hwang M., Oh C., Cho S., Kong Y., Kim T., Chung P (2006). Identification and characterization of a cathepsin L-like cysteine protease from *Taenia solium* metacestode. *Veterinary Parasitology* 141:251–259
- Lightowers M.(1999). Eradication of *Taenia solium* cysticercosis: a role for vaccination of pigs. *International Journal of Parasitology* 29:811-817
- Lightowers 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
- Lightowers MW; Colebrook AL; Gauci CG; Gauci SM; Kyngdon CT; Monkhouse JL; Rodriguez CV; Read AJ; Rolfe RA; Sato C (2003). Vaccination against cestode parasites: anti-helminth vaccines that work and why. *Veterinary Parasitology*,115:83-123
- López-Briones S, Soloski MJ, Bojalil R, Fragoso G, Sciutto E (2001). CD4+ TCRalpha T cells are critically involved in the control of experimental murine cysticercosis in C57BL/6J mice. *Parasitol Res.* 87(10):826-32.
- 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., Larralde 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* Cold Spring Harbor. P. 63-68.

- Manoutcharian K; Rosas G; Hernández M; Fragoso G; Aluja A; Villalobos N; Rodarte L.F.; Sciutto 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., Rodríguez 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., Sciutto E (2004). *Veterinary Immunology and Immunopathology* 99:11-24
- Meneses G, Berzunza M, Becker I, Bobes RJ, Rosas G, Sciutto E, Fragoso G (2009). *Taenia crassiceps* cysticercosis: variations in its parasite growth permissiveness that encounter with local immune features in BALB/c substrains. *Exp Parasitol* 123(4):362-8
- Mestecky J, Michalek SM, Moldoveanu Z, Russell MW (1997). Routes of immunization and antigen delivery systems for optimal mucosal immune responses in humans. *Behring Inst Mitt.* 98:33-43
- Molina A., Veramendia J., Herva's-Stubbs S (2005). Induction of neutralizing antibodies by a tobacco chloroplast-derived vaccine based on a B cell epitope from canine parvovirus. *Virology* 342:266 – 275
- Molinari J.L. et al (1983). *Taenia solium*: immunity in hogs to the cysticercus. *Exp. Parasitol.* 55:340-357
- Molinari JL, Rodríguez D, Tato P, Soto R, Arechavaleta F, Solano S. (1997). Field trial for reducing porcine *Taenia solium* cysticercosis in Mexico by systematic vaccination of pigs. *Vet Parasitol.* 69(1-2):55-63.
- Morales J., 2003. La producción porcina y la presencia de la cisticercosis por *Taenia solium* en una comunidad indígena de Morelos, México. Tesis. Facultad de Ciencias Agropecuarias Universidad Autónoma del Estado de Morelos, México.
- Nascimento E; Costa J.O; Guimaraes M.P; Tavares C.A. (1995). Effective immune protection of pigs against cysticercosis. *Vet Immunolomunol Immunopathol.* 45:127-137
- Nieba L., Bachmann M.F (2000). A new generation of vaccines. *Modern Aspects Immunobiol.* 1(2):36-39

- Offit PA and Jew RK (2003). Addressing Parents' Concerns: Do Vaccines Contain Harmful Preservatives, Adjuvants, Additives, or Residuals? *Pediatrics* 112(6): 1394-1397
- Pablo A (2007). Estudio de la capacidad de activación de S3Pvac en células presentadoras de antígeno. Tesis. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. IPN. México
- Palzkill T., Huang W., Weinstock GM (1998). Mapping protein-ligand interactions using whole genome phage display libraries. *Gene* 221:79-83
- Pedras-Vasconcelos JA, Pearce EJ (1996). Type 1 CD8+ T cell responses during infection with the helminth *Schistosoma mansoni*. *J Immunol* 157(7):3046-53
- Plancarte A. et al (1999). Vaccination against cysticercosis in pigs using native and recombinant oncosphere antigens. *Int.J. Parasitol.* 29:643-647
- Rao KV, He YX, Kalyanasundaram R (2003). Expression of a 28-kilodalton glutathione S-transferase antigen of *Schistosoma mansoni* on the surface of filamentous phages and evaluation of its vaccine potential. *Clin Diagn Lab Immunol* 10(4):536-41
- Rassy D, Bobes RJ, Rosas G, Anaya VH, Brehm K, Hernández B, Cervantes J, Pedraza S, Morales J, Villalobos N, de Aluja AS, Laclette JP, Nunes CM, Biondi GF, Fragoso G, Hernández M, Sciutto E (2010). Characterization of S3Pvac anti-cysticercosis vaccine components: implications for the development of an anti-cestodiasis vaccine. *PLoS One* 5(6): e11287
- Rigano MM, Sala F, Arntzen CJ, Walmsley AM (2003). Targeting of plant-derived vaccine antigens to immunoresponsive mucosal sites. *Vaccine* 21(7-8):809-11. Review.
- Rimbach G., Park Y. C., Guo, Q., Moini, H., Qureshi, N., Saliou, C, Takayama, K., Virgili, F., Packer L. Nitric oxide synthesis and TNF-alpha secretion in RAW 264.7 macrophages: mode of action of a fermented papaya preparation. *Life Sci.* 2000. 67:679-94.
- Rodríguez-Sosa M, Saavedra R, Tenorio EP, Rosas LE, Satoskar AR, Terrazas LI (2004). A STAT4-dependent Th1 response is required for resistance to the helminth parasite *Taenia crassiceps*. *Infect Immun* 72(8):4552-60.
- Román G, Sotelo J, Del Brutto O, Flisser A, Dumas M, Wadia N, Botero D, Cruz M, Garcia H, de Bittencourt PR, Trelles L, Arriagada C, Lorenzana P, Nash TE, Spina-França A (2000). A proposal to declare neurocysticercosis an international reportable disease. *Bull World Health Organ* 78(3):399-406
- Rosas G, Cruz-Revilla C, Fragoso G, López-Casillas F, Pérez A, Bonilla MA, Rosales R, Sciutto E. (1998). *Taenia crassiceps* cysticercosis: humoral immune response and protection elicited by DNA immunization. *J Parasitol.* 84(3):516-23.
- Rosas G, Fragoso G, Garate T, Hernández B, Ferrero P, Foster-Cuevas M, Parkhouse RM, Harrison LJ, Briones SL, González LM, Sciutto E (2002). Protective immunity against *Taenia crassiceps* murine cysticercosis 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 (2006). *Brucella spp.* lumazine synthase: A novel adjuvant and antigen delivery system to effectively induce oral immunity. *Microbes and Infection* 8:1277-86
- 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 (1997). Taeniasis and cysticercosis due to *Taenia solium*. *Salud Publica Mex.* 39(3):225-31
- Sarti E, Schantz PM, Avila G, Ambrosio J, Medina-Santillán 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
- 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., 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, Martínez JJ, Huerta M, Avila R, Fragoso G, Villalobos N, de Aluja A, Larralde C (2003). Familial clustering of *Taenia solium* cysticercosis in the rural pigs of Mexico: hints of genetic determinants in innate and acquired resistance to infection. *Vet Parasitol* 116(3):223-9
- Sciutto E., Toledo A., Cruz-Revilla C., Rosas G., Meneses G., Laplagne D., Ainciart N., Cervantes J., Fragoso G., Goldbaum F (2005). *Brucella spp.* Lumazine synthase: A novel antigen delivery system. *Vaccine* 23(21):2784-90
- Scott J.K. and Smith G (1990). Searching for peptide ligands with an epitope library. *Science* 249:386-390
- Segura-Velázquez R, Fragoso G, Sciutto E, Sarukhan A (2009). Towards identification of the mechanisms of action of parasite-derived peptide GK1 on the immunogenicity of an influenza vaccine. *Clin Vaccine Immunol* 16(9):1338-43
- Sher A, Pearce E and Kaye P (2003). Shaping the immune response to parasites: role of dendritic cells. *Current Opinion in Immunology* 14:421-429
- Sidhu S (2000). Phage display in pharmaceutical biotechnology. *Curr Opin Biotechnol* 11(6):610-6.

- Somers VA., Brandwijk RJ., Joosten B., Moerkerk PT., Arends JW., Menheere P., Pieterse WO., Claessen A., Hufton SE (2002). A panel of candidate tumor antigens in colorectal cancer revealed by the serological selection of a phage displayed cDNA expression library. *J Immunol* 169: 2772-80
- Sotelo J, Del Brutto OH, Roman GC (1996). Cysticercosis. *Curr Clin Top Infect Dis.*;16:240-59.
- Sotelo J., Del Brutto O.H. (2000). Brain cysticercosis. *Arch. Med. Res.* 31:3-14
- Steppek G, Curtis RH, Kerry BR, Shewry PR, Clark SJ, Lowe AE, Duce IR, Buttle DJ, Behnke JM (2007). Nematicidal effects of cysteine proteinases against sedentary plant parasitic nematodes. *Parasitology* 134:1831-8
- Stoger E, Ma JK, Fischer R, Christou P (2005). Sowing the seeds of success: pharmaceutical proteins from plants. *Curr Opin Biotechnol.* 16(2):167-73.
- Storni T, Kündig T, Senti G, Johansen P (2005). Immunity in response to particulate antigen-delivery systems. *Advanced drug delivery Reviews* 57:333-355
- Streatfield SJ (2005). Delivery of plant-derived vaccines. *Expert Opin Drug Deliv* 2(4):719-28
- Streatfield SJ (2006). Mucosal immunization using recombinant plant based oral vaccines. *Methods* 38: 150-157
- Stuart E., Morshed F., Sremac M., DasSarma S (2001). Antigen presentation using novel particulate organelles from halophilic archaea. *Journal of Biotechnology* 88:119-128
- Tacket CO, Mason HS (1999). A review of oral vaccination with transgenic vegetables. *Microbes Infect* 1(10):777-83.
- Tacket CO. (2005). Plant-derived vaccines against diarrheal diseases. *Vaccine* 23:1866-1869
- Tato P, Fernández AM, Solano S, Borgonio V, Garrido E, Sepúlveda J, Molinari JL (2004). A cysteine protease from *Taenia solium* metacestodes induce apoptosis in human CD4+ T-cells. *Parasitol Res* 92(3):197-204.
- 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., 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.
- Toledo A. (2004). Cisticercosis: Identificación y Caracterización Inmunológica de Epítopes para el Diseño de una Vacuna Polivalente. Tesis. Facultad de Ciencias. UNAM. México
- Tregoning J, Maliga P, Dougan G, Nixon PJ (2004). New advances in the production of edible plant vaccines: chloroplast expression of a tetanus vaccine antigen, TetC. *Phytochemistry* 65(8):989-94.
- Twyman RM, Stoger E, Schillberg S, Christou P, Fischer R (2003). Molecular farming in plants: host systems and expression technology. *Trends Biotechnol* 21(12):570-8. Review
- Valdez F., Hernandez M., Govezensky T., Fragoso G. And Sciutto 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
- van Houten NE, Zwick MB, Menendez A, Scott JK (2006). Filamentous phage as an immunogenic carrier to elicit focused antibody responses against a synthetic peptide. *Vaccine* 24(19):4188-200
- van Riet E., Hartgers F., Yazdanbakhsh M (2007). Chronic helminth infections induce immunomodulation: Consequences and mechanisms. *Immunobiology* 212:475-490
- Velásquez-Pérez L, Jiménez-Marcial ME (2004). Mortalidad hospitalaria en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suárez" (1995-2001). *Gac Med Mex* 140 (3): 289-294
- 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
- Vidal JR, Kikkert JR, Wallace PG, Reisch BI (2003). *Plant Cell Rep* 22(4):252-60.
- Walmsley AM., Arntzen CJ (2000). Plants for delivery of edible vaccines. *Curr Opin Biotechnol* 11:126-129
- Walmsley AM, Arntzen CJ.(2003). Plant cell factories and mucosal vaccines. *Curr Opin Biotechnol*. 14(2):145-50

- Webster DE, Smith SD, Pickering RJ, Strugnell RA, Dry IB, Wesselingh SL (2006). Measles virus hemagglutinin protein expressed in transgenic lettuce induces neutralising antibodies in mice following mucosal vaccination. *Vaccine* 24(17):3538-44
- White A., Baig S., Chappell C (1997). Characterization of a cysteine proteinase from *Taenia crassiceps* cysts. *Molecular and Biochemical Parasitology* 85:243-253
- 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

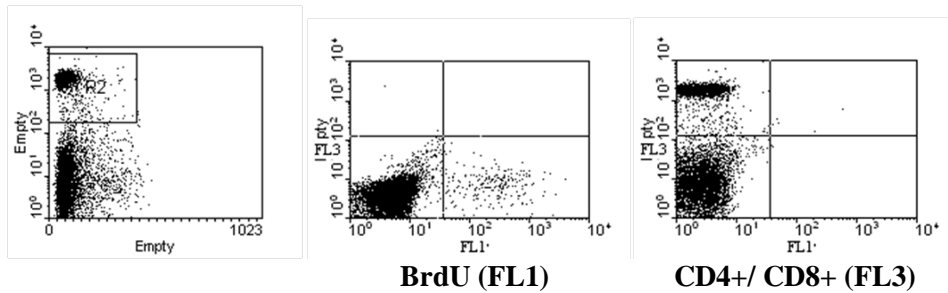
## 11. APENDICES

### 11.1 Dot plot representativos de la respuesta inmune celular

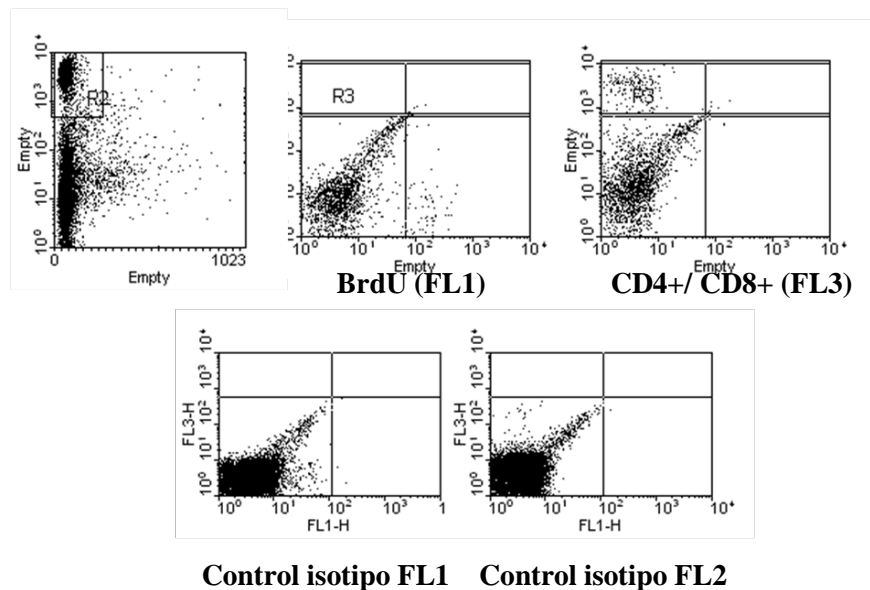
A) Dot plots correspondientes al porcentaje de proliferación de células CD4 y/o CD8 obtenidas de bazo de ratones inmunizados (n=3) y que recibieron estímulo a distintos tiempos antes de su sacrificio con el inmunógeno respectivo.

#### BAZO

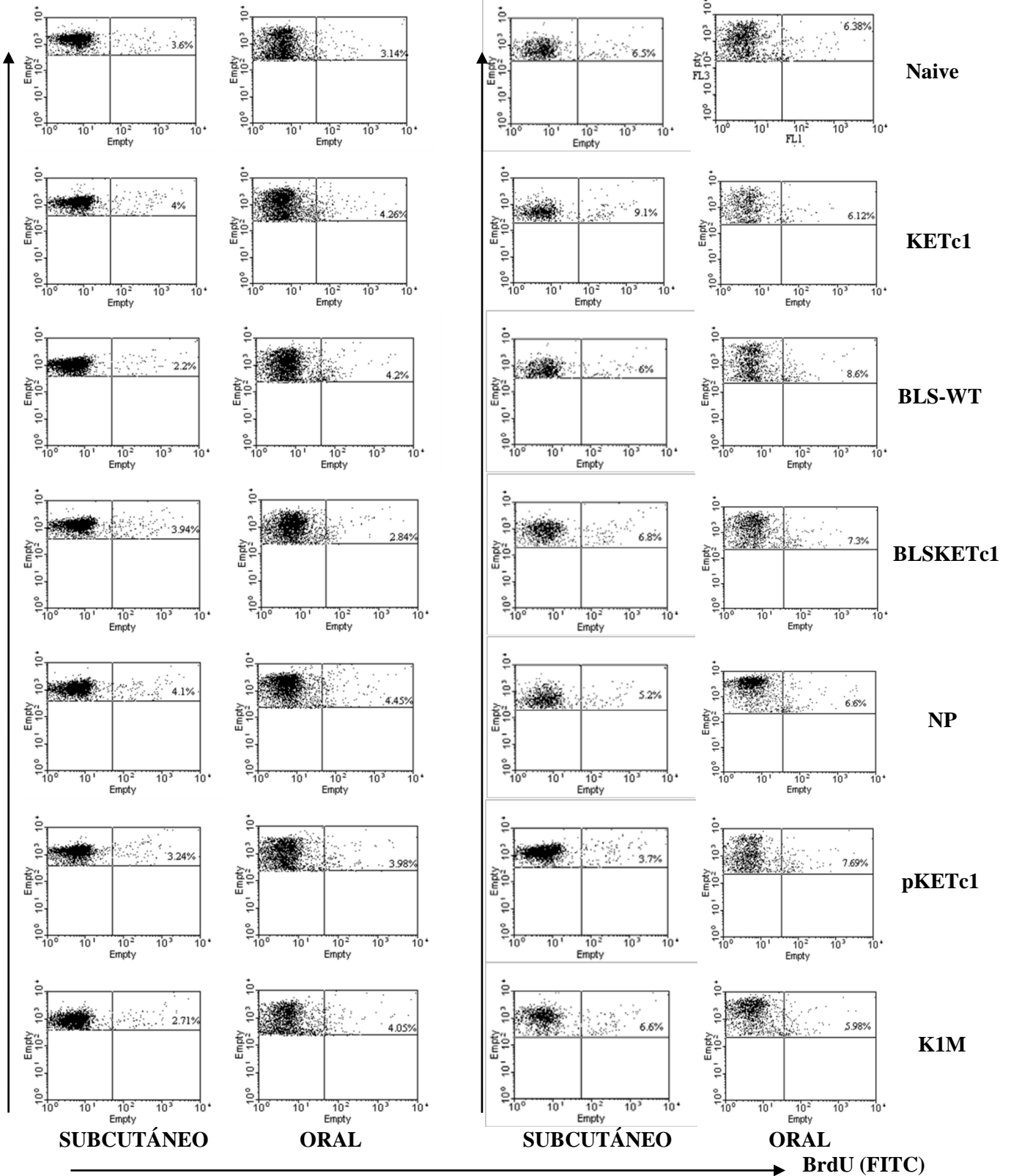
##### Controles 18h subcutáneo / oral



##### Controles 90h subcutáneo / oral



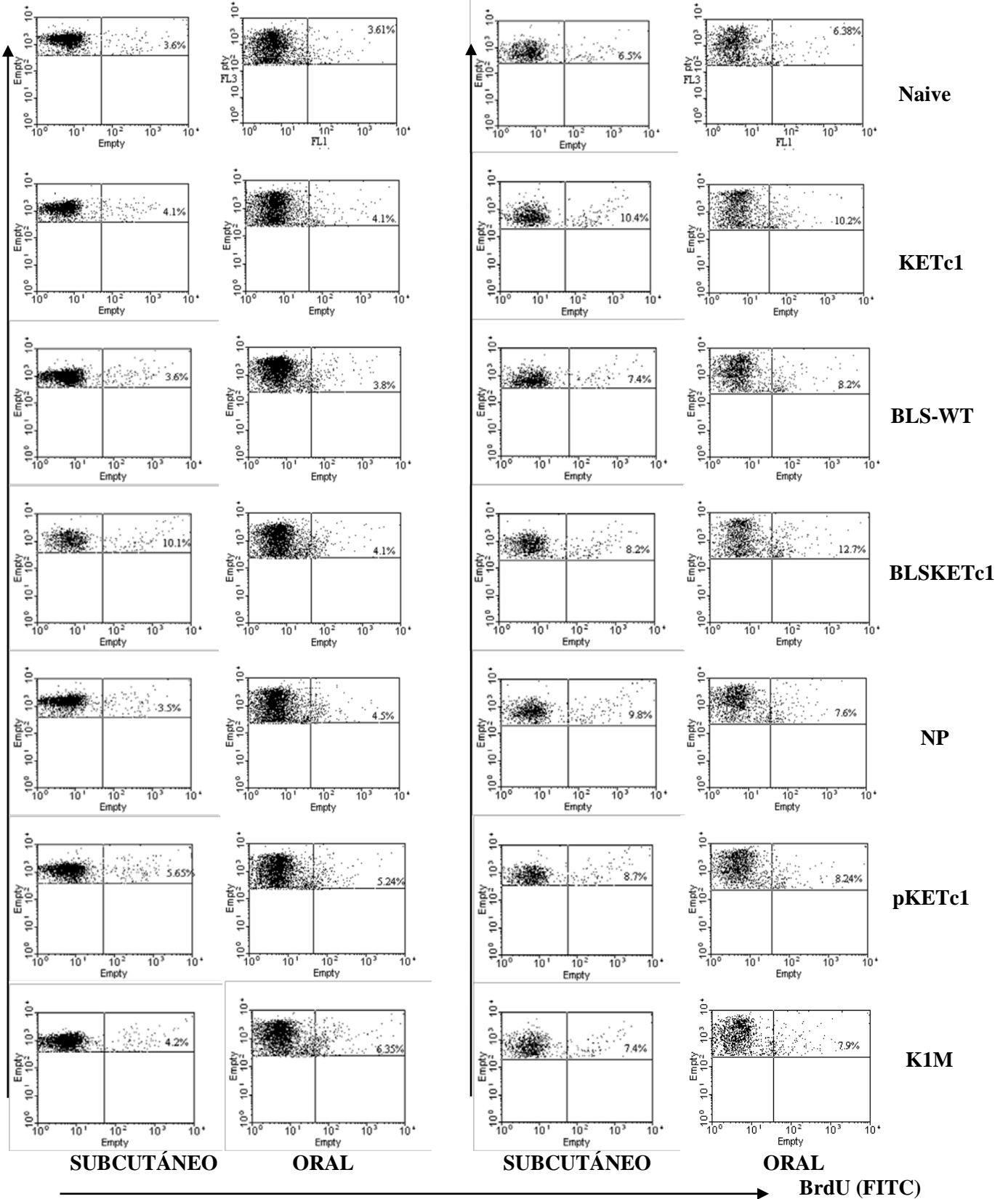
**Sin estímulo (15d post-inmunización)**  
**CD4+ (PerCP-Cy5.5)**                      **CD8+ (PerCP-Cy5.5)**



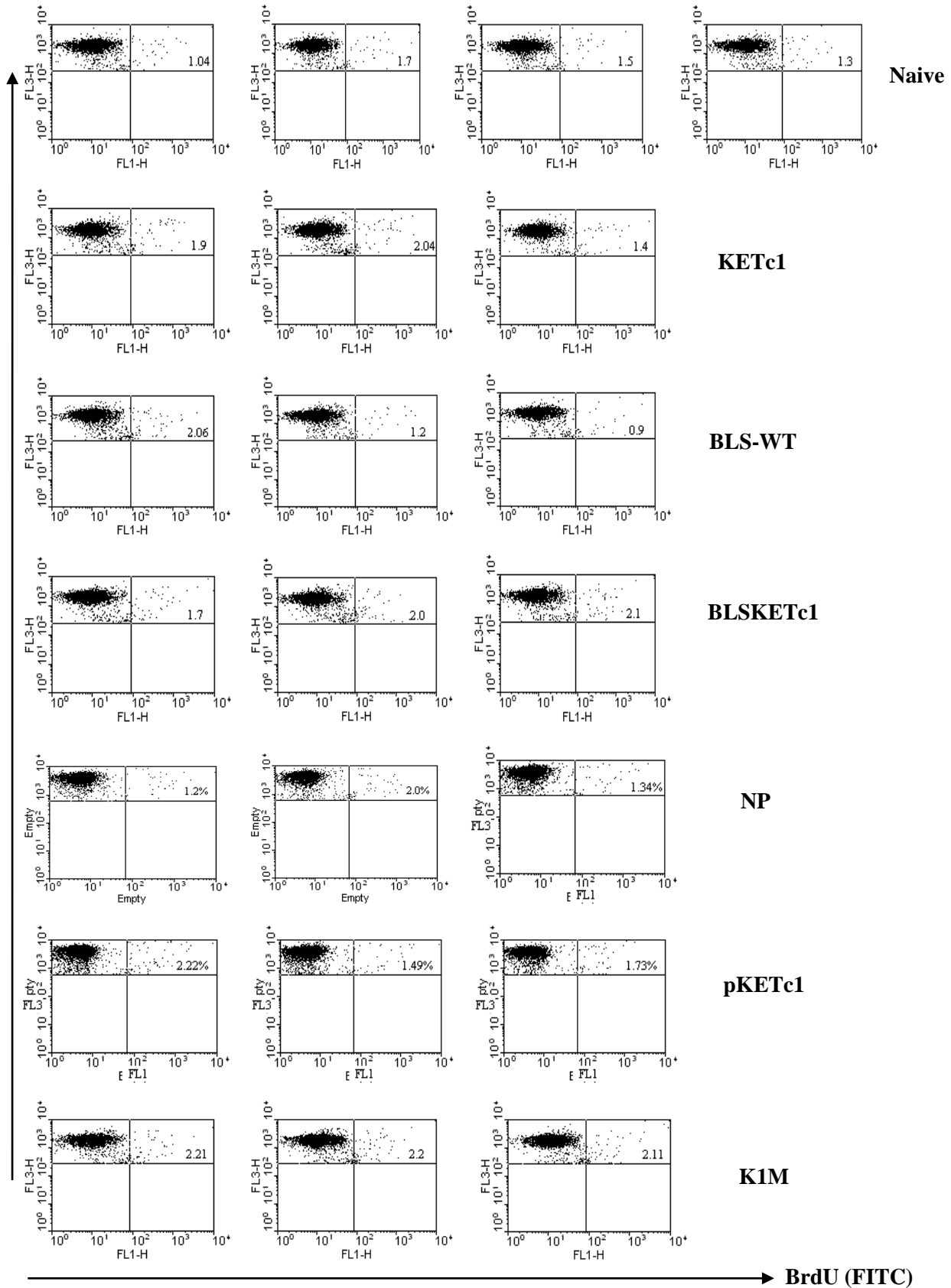
**Tiempo de estímulo 18h**

**CD4+ (PerCP-Cy5.5)**

**CD8+ (PerCP-Cy5.5)**

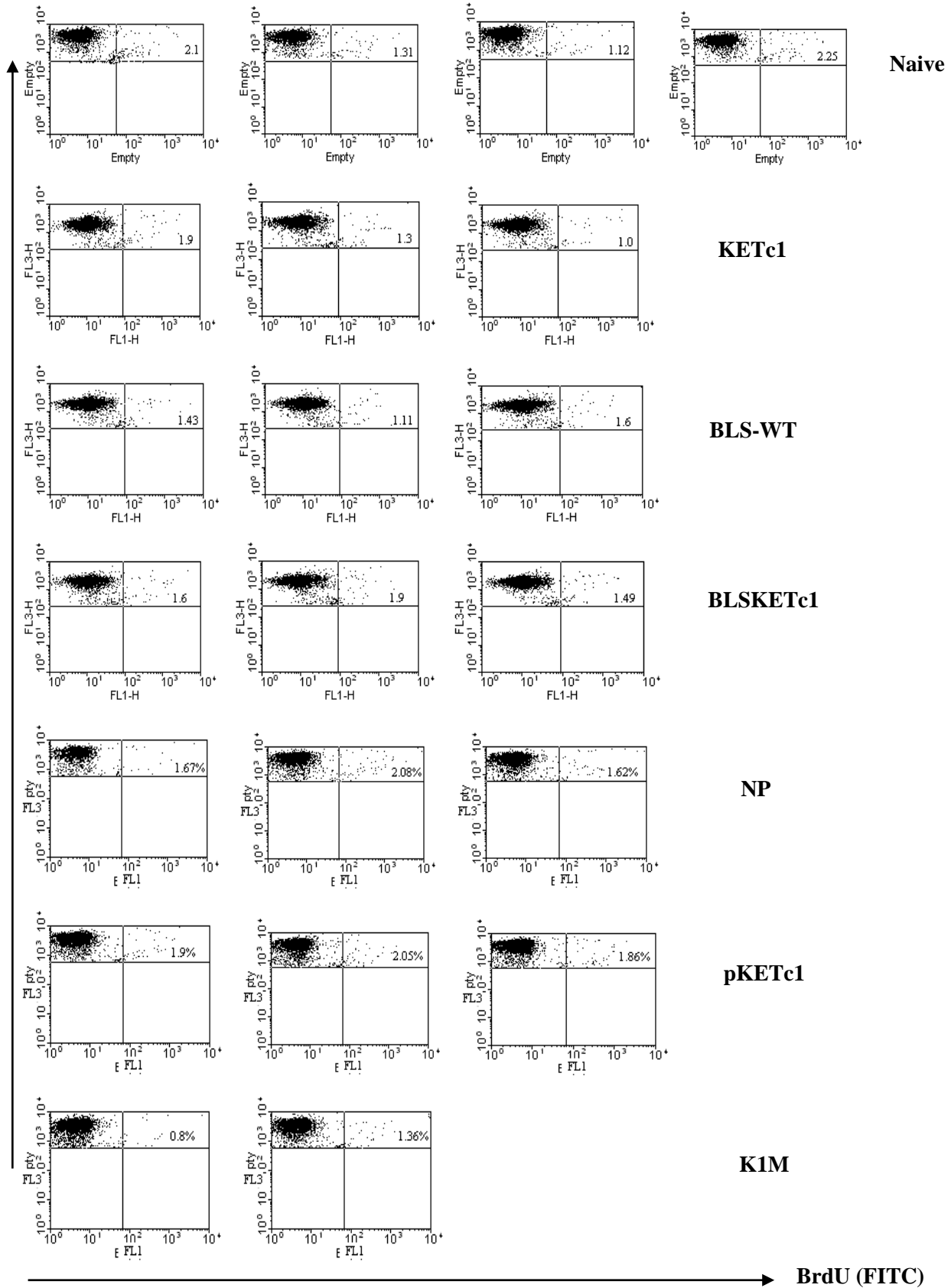


**Tiempo de estímulo 90h (sc)**  
**CD4+ (PerCP-Cy5.5)**

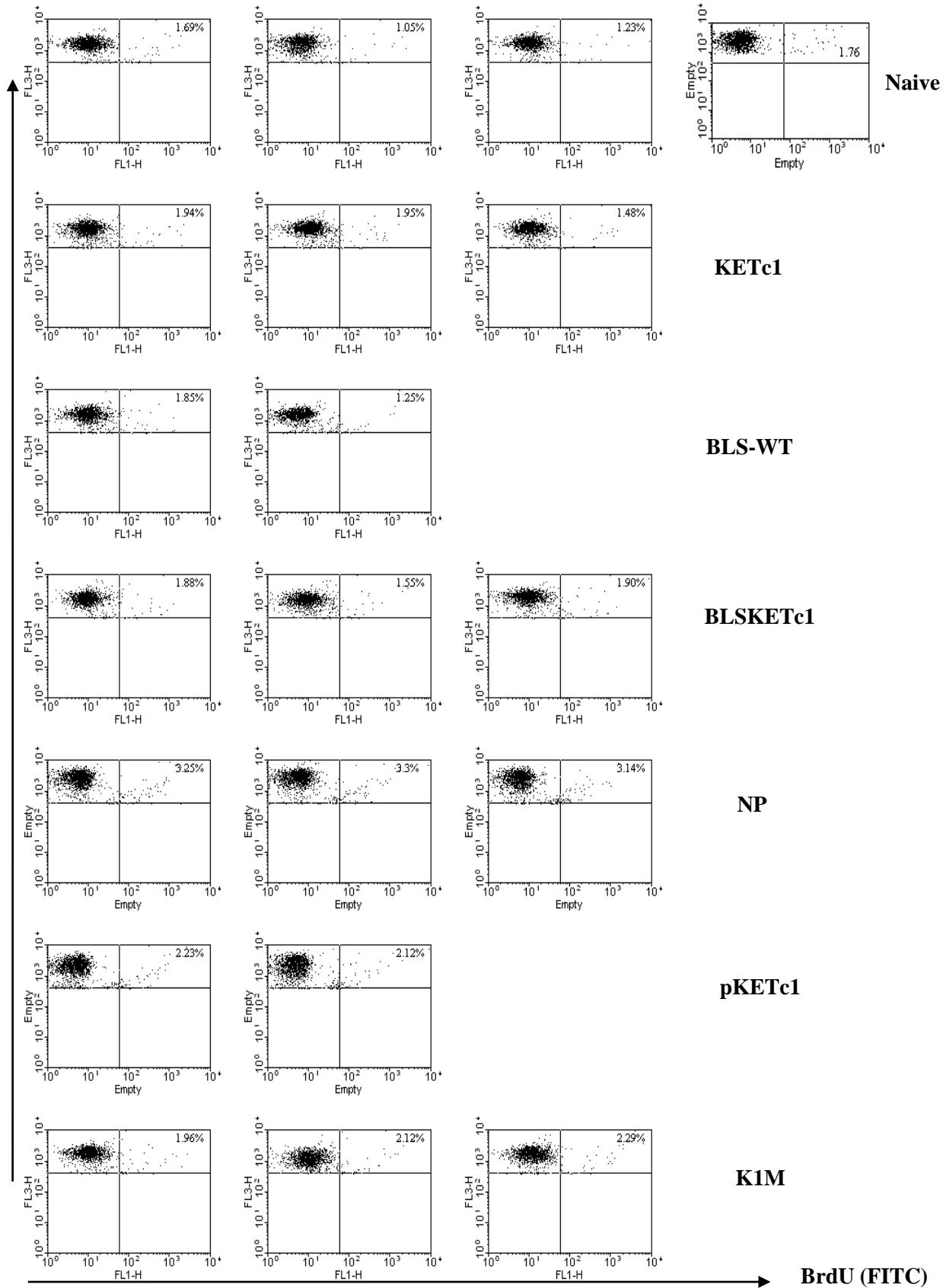




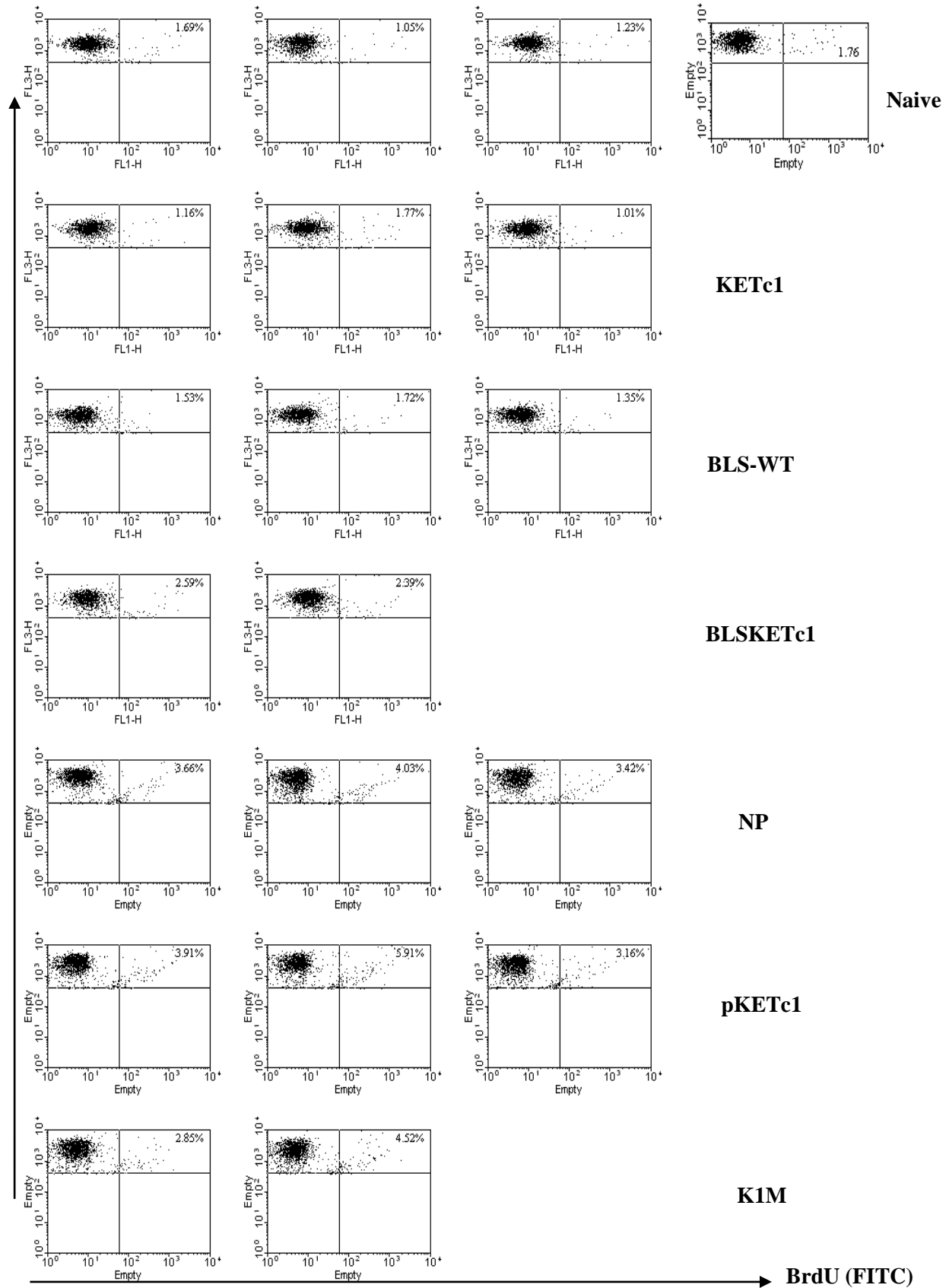
**Tiempo de estímulo 90h (oral)**  
**CD4+ (PerCP-Cy5.5)**



**Tiempo de estímulo 90h (sc)**  
**CD8+ (PerCP-Cy5.5)**



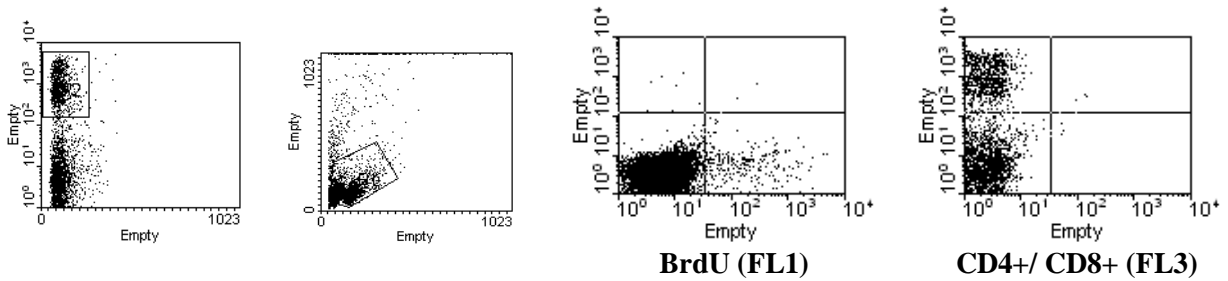
**Tiempo de estímulo 90h (oral)**  
**CD8+ (PerCP-Cy5.5)**



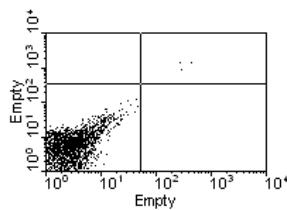
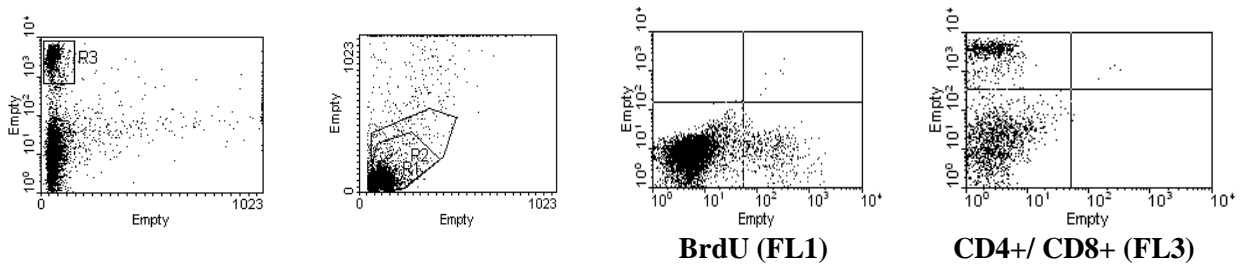
B) Dot plots correspondientes al porcentaje de proliferación del pool de células CD4 y/o CD8 obtenidas de placas de Peyer (PP) de ratones inmunizados (n=3) y que recibieron estímulo a distintos tiempos antes de su sacrificio con el inmunógeno respectivo.

## PLACAS DE PEYER

### Controles 18h oral



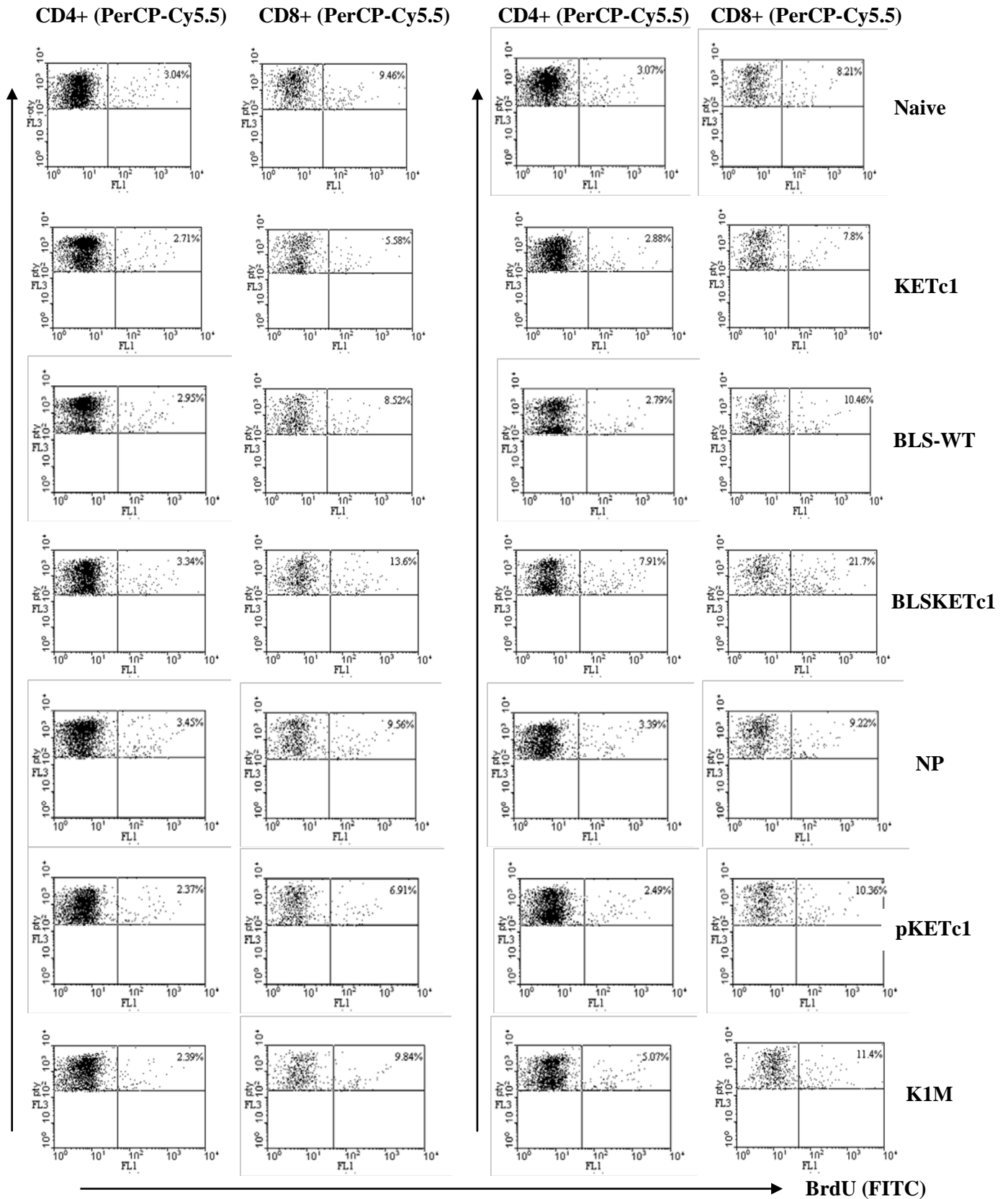
### Controles 90h oral



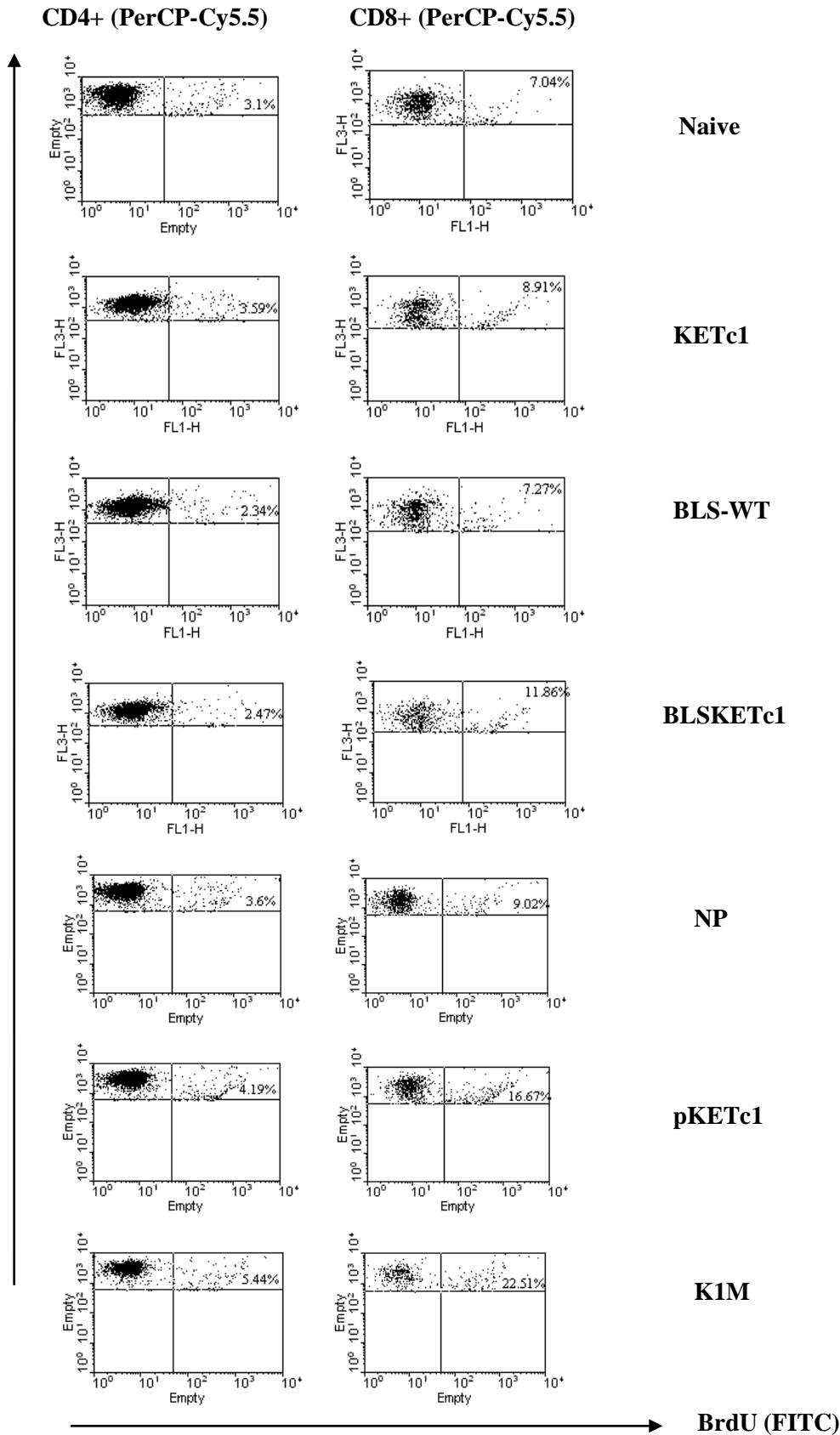
### Control isotipo FL2

**Sin estímulo (15d post-inmunización)**

**Tiempo de estímulo 18h**



# Tiempo de estímulo 90h



## **11. 2 Artículo desarrollado en colaboración durante el trabajo de tesis**

Hernández M., Cabrera-Ponce JL., Fragoso G., López-Casillas F., Guevara-Garcia A., Rosas G., León-Ramírez C., Juárez P., Sanchez-García G., Cervantes J., Acero G., Toledo A., Cruz C., Bojalil R., Herrera-Estrella L., Sciotto E (2007). A new highly effective anticysticercosis vaccine expressed in transgenic papaya. *Vaccine* 25(21):4252-60

## A new highly effective anticysticercosis vaccine expressed in transgenic papaya

Marisela Hernández<sup>a</sup>, José Luis Cabrera-Ponce<sup>b</sup>, Gladis Fragoso<sup>a</sup>, Fernando López-Casillas<sup>c</sup>, Arturo Guevara-García<sup>d</sup>, Gabriela Rosas<sup>e</sup>, Claudia León-Ramírez<sup>b</sup>, Patricia Juárez<sup>c</sup>, Guadalupe Sánchez-García<sup>b</sup>, Jaquelynn Cervantes<sup>a</sup>, Gonzalo Acero<sup>a</sup>, Andrea Toledo<sup>a</sup>, Carmen Cruz<sup>a</sup>, Rafael Bojalil<sup>f</sup>, Luis Herrera-Estrella<sup>b,g,\*\*</sup>, Edda Sciutto<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. 04510, México

<sup>b</sup> Centro de Investigaciones y de Estudios Avanzados, Unidad Irapuato, Irapuato, Guanajuato, México

<sup>c</sup> Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. 04510, México

<sup>d</sup> Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos 62271, México

<sup>e</sup> Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, Morelos, México

<sup>f</sup> Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, México, D.F. 04960, México

<sup>g</sup> Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad, Irapuato, Guanajuato, México

Received 5 December 2006; received in revised form 20 February 2007; accepted 23 February 2007

Available online 16 March 2007

### Abstract

The use of transgenic plants as new antigen-delivery systems for subunit vaccines has been increasingly explored. We herein report progress toward a papaya-based vaccine against cysticercosis. Synthetic peptides (KETc1, KETc12, KETc7) were successfully expressed in 19 different transgenic papaya clones and found to be immunogenic. Complete protection against cysticercosis was induced with the soluble extract of the clones that expressed the higher levels of transcripts in up to 90% of the immunized mice. This study represents a key step towards the development of a more effective, sustainable and affordable oral subunit vaccine against human and pig cysticercosis.

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** Transgenic papaya; Anti-cysticercosis vaccine; Cysticercosis control

### 1. Introduction

Cysticercosis due to *Taenia solium* occurs worldwide, frequently and severely affecting human health, particularly in underdeveloped Latin American, Asian and African countries [1,2]. Vaccination is considered a promising biotechnological intervention to control this infectious disease because of the essential role of pigs in the parasite's life-cycle. Vaccination

of the porcine host could reduce or eliminate transmission to humans, thus lowering the environmental contamination with *T. solium* eggs and diminishing the impact of transmission and disease. Thus, it is urgent to develop an effective and inexpensive vaccine and delivery strategy to fight against cysticercosis, particularly in the large population of the most impoverished countries where the disease is endemic. Various whole or subunit vaccine candidates with promising protective effects against porcine cysticercosis have been reported, but their effectiveness has been generally assessed in experimental rather than in complex field conditions [3–10]. Recently, a porcine-cysticercosis vaccine was developed, based on three synthetic-peptides (S3Pvac) (KETc1, KETc12 and (GK1) KETc7 of 12, 8 and 18 amino acids, respectively), originally identified in *T. crassiceps* [9,10].

**Abbreviations:** S3Pvac, synthetic anti-cysticercosis vaccine; EmpCL, embryogenic papaya cell line; ETgpC, embryogenic transgenic papaya clone; Km<sup>R</sup>, kanamycin resistance gene; Hyg<sup>R</sup>, hygromycin resistance gene

\* Corresponding author. Tel.: +52 55 56223153; fax: +52 55 56223369.

\*\* Corresponding author. Tel.: +52 462 6239600; fax: +52 462 6245849.

E-mail addresses: [lherrera@ira.cinvestav.mx](mailto:lherrera@ira.cinvestav.mx) (L. Herrera-Estrella), [edda@servidor.unam.mx](mailto:edda@servidor.unam.mx) (E. Sciutto).



Its protective capacity was demonstrated (50% reduction in prevalence levels and 98% reduction of infection intensity) in piglets under endemic field conditions, i.e., exposed to the natural infection pressure [11,12]. Moreover, S3Pvac immunization of previously infected pigs reduced cysticercus viability, and exhibited additional therapeutic properties [13]. Thus, S3Pvac represents a powerful means of controlling cysticercosis infection. Nevertheless, some aspects of this vaccine could still be improved for an effective, nationwide vaccination program: its high cost, considering that the vaccine is targeted for animals that belong to a low income population, and the needle requirement of this and other currently available vaccine candidates makes vaccine application difficult. An oral vaccine expressed in transgenic plants could cope with both limitations. Plants can be a massively produced, inexpensive source of antigens, and an ideal system for oral delivery in the form of an edible vaccine. In the case of cysticercosis, oral vaccination seems to be an optimal choice for pigs and human vaccination since both acquire the cysticerci by ingestion of *T. solium* eggs. Thus, a local immune response could avoid parasite entrance through the gut, and the elicited systemic immunity could destroy the parasites that managed to elude mucosal defenses [14,15].

To explore on ways to lower vaccine production costs and to approach an oral vaccine, we chose to transform an embryogenic papaya cell line, because it is easily amenable for genetic transformation and because it can be propagated in low-cost cell cultures systems. The use of cell cultures avoids non-desirable environmental effects due to the release of transgenic plants into the environment, and embryogenic papaya callus can be eaten raw with additional side-benefits considering its immunomodulatory properties [16].

We herein describe the use of transgenic embryogenic papaya clones as a new subunit vaccine delivery system which is effective in protecting mice against intraperitoneal challenge with cysticerci of *Taenia crassiceps*, a widely used experimental infection in studying diverse aspects of metacestode infections [6,9,10]. Our results encourage further investigation into this new antigen delivery system as an oral vaccine in mice and against *Taenia solium* cysticercosis in the relevant hosts.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Plant material

Seeds of papaya (*Carica papaya* L.) “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 papaya cells line (EmpCL) induction and propagation was performed according to Cabrera-Ponce et al. [17].

### 2.2. Sequence modifications

In order to increase the translational efficiency of the peptides in plant cells, KETc1 and KETc12 sequences were optimized in the ANNATGGCUNN context around the start ATG codon (where N corresponds to any nucleotide). Under this context, the KETc1 amino acid sequence remained as the original reported (APMSTPSATSVR). For KETc12 and additional GCT that codifies for an alanine was inserted after the ATG codon yielding the KETc12 sequence as AGNLLSCL. In addition, to increase the peptide size and facilitate their eventual identification a six histidine tail (5' GATCCTCAATGGTGATGGTGATG 3') was also included at the 3' end.

This required the alignment of the synthetic primers for KETc1 (forward: 5' ATG AAT TCA CAA TGG CTC CAA TGT CTA CAC CAT CGG CTA CAT CGG TT 3') and (reverse: 5' ATG GAT CCT CCA TGG TGA TGG TGA TGG TGC CGA ACC GAT GTA GCC GA 3'), and for KETc12 (forward: 5' ATG AAT TCA CAA TGG CTG GCA ACC TCT TAT TGA GTT GTT TGC A 3') and (reverse: 5' ATG GAT CCT CAA TGG TGA TGG TGA TGG TGC AAA CAA CTC AAT 3') resulting in the KETc1.6His and KETc12.6His sequences, respectively. In both cases, primers were designed to have an *Eco* RI restriction site at the 5' end and a *Bam* HI restriction site at the 3' end. Complementary DNA was synthesized with Klenow (from *Escherichia coli*, Roche). The KETc7 cDNA contained the optimal sequences of translation initiation around the start ATG recovered from the pTc-sp7 construction containing the betaglycan signal peptide [18].

### 2.3. Cloning of KETc1.6His, KETc12.6His and KETc7 into the plant transformation vector

The KETc1.6His and KETc12.6His sequences were cloned into pBluescript vector (Stratagen, West Cedar Creek, TX), at the *Eco*RI/*Bam*HI sites, and the constructions were sequenced to verify the correct ORF (open reading frame). Thereafter, the inserts were subcloned into the *Eco*RI/*Bam*HI of the constitutive plant expression vector pUI 235-5.1 behind the CAMV35-35S promoter [19]. This vector contains the kanamycin resistance gene ( $Km^R$ ). The resulting vectors contained a 79 bp and 70 bp fragment, corresponding to KETc1.6His and KETc12.6His peptides respectively. The 446 bp cDNA sequence of KETc7 was then subcloned into pUI 235-5.1 at the *Bam*HI/*Stu* I site (Fig. 1A). The correct ORFs of the constructions were confirmed by sequencing.

### 2.4. Genetic transformation

EmpCL at the globular stage was co-transformed using the particle bombardment system [17,20] with the pWRG1515 plasmid containing GUS-A ( $\beta$ -glucuronidase reporter gene) and the hygromycin resistance gene ( $Hyg^R$ ) [21], and with the pUI 235-5.1 vector containing the KETc1.6His or

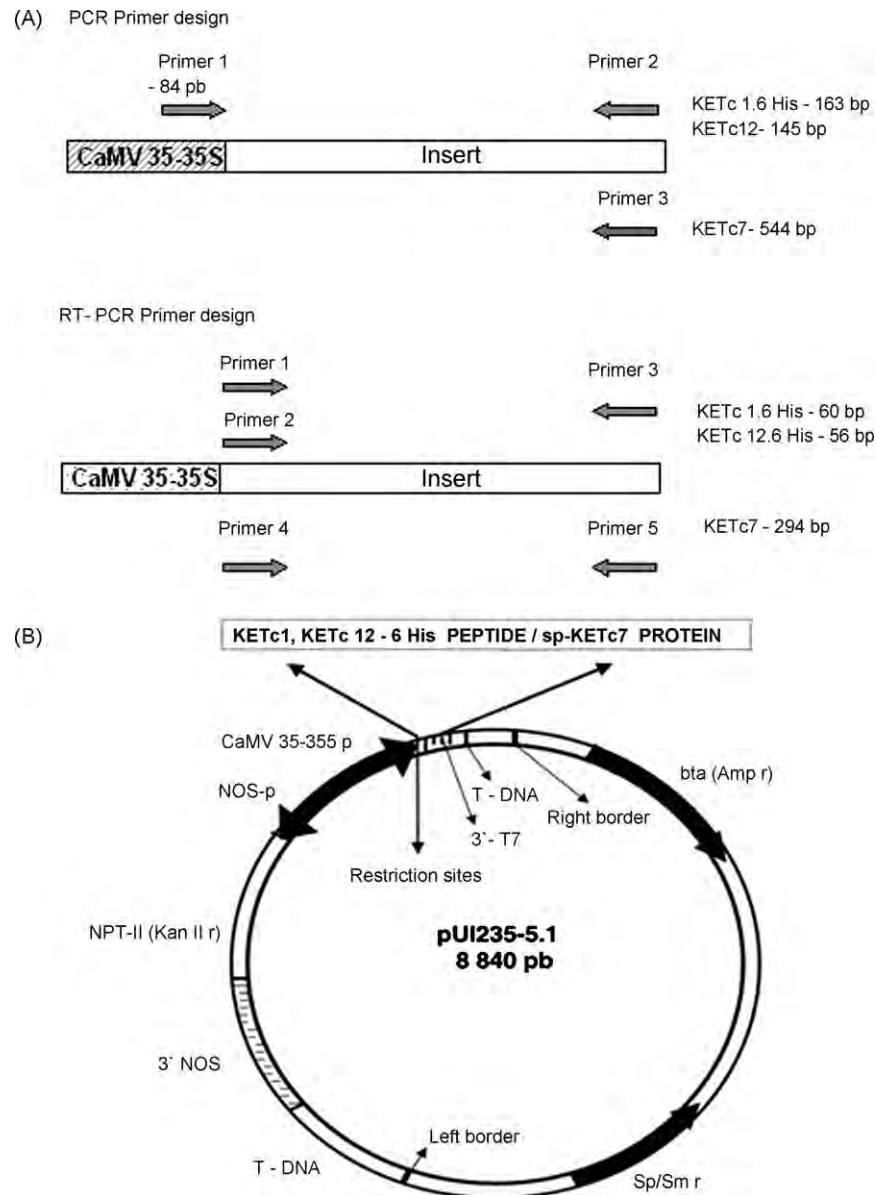


Fig. 1. (A) Design of primers used in PCR and RT-PCR for the detection of the transgene in ETgpC. (B) Schematic diagram of gene constructs.

KETc12.6His or KETc7 insert and the kanamycin resistance gene ( $Km^R$ ). Embryonic transgenic papaya clones (ETgpC) were selected by their properties to be  $Hyg^R$  and  $Km^R$ , and were named according to the identified progressive clone, adding an initial p for papaya, e.g. pKETc7<sub>21</sub>.

### 2.5. Transitory and stable $\beta$ -glucuronidase expression

Expression was detected by incubating a sample of each ETgpC in 200  $\mu$ l of GUS staining buffer (100 mM sodium phosphate, pH 7.0, 1mM 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-glucuronide, 0.5 mM potassium ferrocyanide, 10 mM  $Na_2EDTA$  pH 8.0, and 0.1% Triton X-100) for 1 h at room temperature.

### 2.6. PCR and RT-PCR analyses

The presence of the KETc1.6His or KETc12.6His or KETc7 transgen in the ETgpC were detected by PCR using genomic DNA isolated with DNeasy Plant Mini kit (Qiagen, Valencia, CA). The following primers were employed: forward LHE-1700 (5' GGA TGA CGC ACA ATC CCA CTA T 3') from -84 pb of the CAMV 35-35S promoter for the KETc1.6His, KETc12.6His and KETc7, the reverse primer LHE-178 (5' GAT CCT CAA TGG TGA TGG TGA TG 3') based on the six histidine tail at the 3' end of KETc1.6His and KETc12.6His (yielding the products of 163 bp and 154 bp, respectively), and the A05 reverse primer (5' CTA AAG ATT CTT CTT ATC TTC TGG TTC CAT 3') for the detection of KETc7, yielding the product of 544 pb (Fig. 2A). The PCR

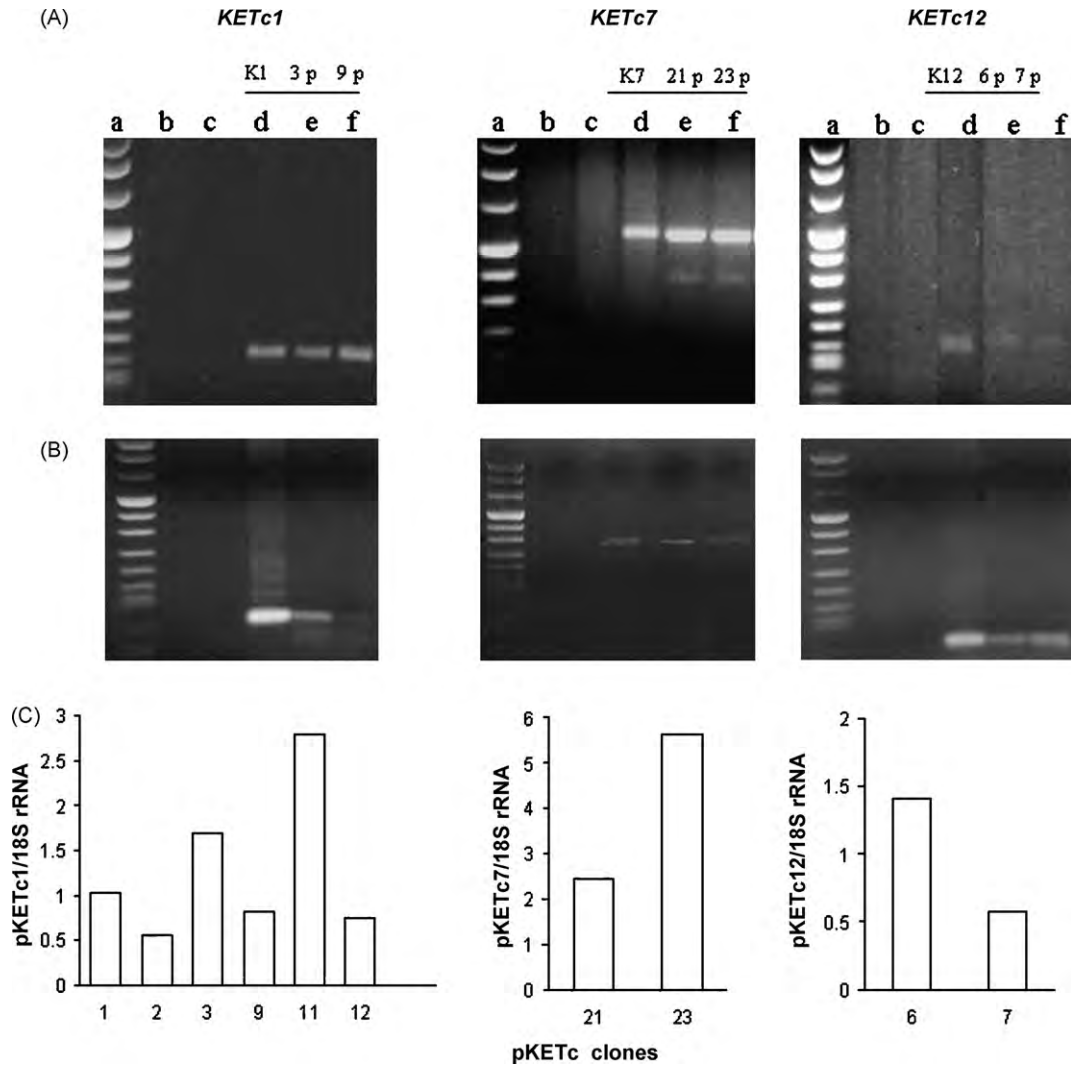


Fig. 2. Analysis of ETgpC revealed the presence of the KETc1.6His, KETc7 and KETc12.6His transgenes by PCR (A) and RT-PCR of the same clones (B), lanes a: VIII MW marker, b: pUI 235-5.1 vector without insert, c: EmpCL, d: pUI 235-5.1 vector with KETc1.6His or KETc7 or KETc12.6His peptide, e, f: KETc1.6His or KETc7 or KETc12.6His ETgpC. (C) Real-time quantitative RT-PCR of KETc1.6His or KETc12.6His or KETc7 content in ETgpC. The transcripts of the indicated clones were quantified and normalized to papaya18S rRNA expression. a.u. are plotted.

reaction was prepared with Platinum Taq Polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA). The amplified products were analyzed on 2% (w/v) agarose gels. The transcription of the transgenes was analyzed by RT-PCR specific for each transcripts in the ETgpC, total RNA extraction was performed from 100 mg using Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA) following the protocol previously described [22]. Reverse transcription was performed using the following specific primers, for KETc1.6His: forward 5' ATG GCT CCA ATG TAC AC 3' and reverse 5' GGA TCC TCA ATG GTG 3'); for KETc12.6His: forward 5' ATG GCT GGC AAC CTC TT 3' and the reverse previously described for KETc1.6His; and for KETc7: forward 5' AGA TCA CCC GGG AAT TC 3' and the reverse A05 described above. The reaction was performed for 1 h at 50 °C in 50 µl final reaction volume containing 5 µg total RNA, 20 ng of specific primers, a mixture of dNTPs (10 mM each), 10 mM DTT, and 200 units of M-MLV reverse tran-

scriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA). The amplified products were analyzed on 2% (w/v) agarose gels. As control of specific amplification the mRNA from EmpCL was included.

2.7. Real time quantitative RT-PCR

ETgpC in which the presence of the peptides was confirmed by PCR, and RT-PCR were further analyzed by real time quantitative RT-PCR using cDNA of each ETgpC. RNA of EmpCL was used as a negative control. cDNA was synthesized from 10 µg of total RNA purified using Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA), as described by standard reverse transcription conditions. The specific pairs of primers used were, for KETc7 (forward 5' CTTATCCGACCGGTG-GTC 3' and reverse 5' GGTGCTGAAGCCTGGCTGTA 3') and the 18S rRNA papaya was used as control (forward: 5' CCACGGGTCGTGAACCTTCTT 3' and reverse:

5' TCCTCTGTATTACCGCGGCT 3'). For KETc1.6His and KETc12.6 His, it was used the same pairs of primers employed for RT-PCR. Real time RT-PCR was performed using quantitec SYBR Green PCR Kit (Qiagen, Valencia, CA) in a final volume of 25  $\mu$ l mixture containing 1  $\mu$ l of cDNA of each sample tested and 20 pmols of each set of specific primers. Standard curves were generated by using serially diluted papaya18S rRNA as standard control sample, and the input amounts of unknown test samples were calculated using these standard curves. Finally, the expression level of each transgene was normalized with respect to the expression level of the papaya 18S rRNA. Results were expressed as a.u. of transgene/ribosomal gene transcription.

### 2.8. Protein extraction

Soluble extract from ETgpC (5 g) and EmpCL were powdered in liquid nitrogen and homogenized in extraction buffer (PBS pH 7.4, 50 mM sodium ascorbate, 1 mM EDTA pH 8.0, 0.2% Triton X-100 and 10  $\mu$ l/ml of protease inhibitor to His-tag protein (Sigma, St. Louis, MI)) and centrifuged at  $21,320 \times g$  at 4 °C for 20 min to remove insoluble debris. The supernatant was collected, and the protein concentration was determined by Lowry [23].

### 2.9. Detection of transgenic recombinant peptides

ELISA was employed to detect the recombinant peptides in soluble extracts of the ETgpC using MaxiSorp 96-well plates (Nalgen-Nunc, Rochester, NY) coated overnight at 4 °C with soluble extracts from each ETgpC at 10  $\mu$ g/ml in carbonate buffered saline and using Anti-His (C-Term) HRP (Invitrogen, Carlsbad, CA), specific antibodies against cysticercal antigens or specific antibodies against the respective peptides [10,11].

### 2.10. Mice

BALB/cAnN female mice ( $n = 10$  per experimental group) bred and kept in our animal facilities were used for vaccine trials. 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 for Care and Use of Experimental Animals.

### 2.11. Immunizations

The immunogenicity of the recombinant KETc1.6His, KETc12.6His and KETc7 peptides expressed in transgenic callus were tested by with a total extract of each on the different clones generated. Group of 10 mice were subcutaneously immunized with doses of 200 or 1000  $\mu$ g of ETgpC

and EmpCL in 200  $\mu$ l without adjuvant. One booster immunization was applied 15 days later. Mice were bled 10 days after the last immunization and challenged with cysticerci as described below.

### 2.12. Immunohistochemistry

Paraffin sections of *T. crassiceps* cysticerci, free of host proteins [18] and fixed in 4% paraformaldehyde for 10 min were used to detect the presence of specific antibodies in mice immunized with ETgpC. Endogenous peroxidase activity was inhibited using 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solution in PBS for 10 min. Immunodetection was performed with the HISTOMOUSE™SP kit (Zymed, Carlton Court, CA), following the kit manufacturers' instructions. Sections were incubated with sera from un-immunized mice (negative control), cysticercotic mice (positive control) or sera from mice immunized with extracts from ETgpC and EmpCL in 1% BSA-PBS. Antibody binding was visualized with streptavidine-peroxidase method with DAB (3'-3'-diaminobenzidine, Zymed, Carlton Court, CA) as substrate. All slides were counterstained with hematoxylin from the same kit, mounted with the HISTOMOUSE™SP kit and visualized with an Optical microscope using the MetaMorph Imaging System 4.5 software.

### 2.13. Parasite and infections

For infections, *T. crassiceps* ORF cysticerci were harvested from the peritoneal cavity of mice, 1–3 months after inoculation of 10 cysticerci per mouse as described [24]. 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. Mice were sacrificed 40 days after infection and the cysts inside their peritoneal cavity were harvested and counted as previously reported [24].

Effect of vaccination was evaluated by the mean number of cysticerci recovered and the percentage of totally protected mice.

### 2.14. Statistical analysis

Statistical comparison of individual parasite intensities between groups was performed by the Kruskal–Wallis non-parametric analysis of variance ANOVA test. Data were considered statistically significant at  $P \leq 0.05$ . The percent of mice totally protected were compared by Fisher's exact test.

## 3. Results

### 3.1. Production and selection of embryogenic transgenic papaya clones

EmpCL were co-transformed by biobalistic using the pWRG1515 plasmid [21], and the gene constructs in pUI

235-5.1 containing the KETc1.6His, KETc12.6His or KETc7 coding sequences (Fig. 1A). Forty one ETgpC were obtained all of them with stable  $\beta$ -glucuronidase activity and were isolated and propagated for further analysis. The transgene (KETc1.6His, KETc12.6His and KETc7) and its expression was confirmed in 19 ETgpC by PCR and RT-PCR, respectively, 15 corresponding to KETc1.6His, two to KETc12.6His and two to KETc7 as shown in Fig. 2 (lane e, f). Fig. 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 neither present in the pUI 235 5.1 vector (lane b) nor in the EmpCL (lanes c). The transcripts of the transgenes were evaluated by RT-PCR (Fig. 2B). The empty vector and EmpCL (lane b and c) were used as negative controls. Nineteen clones produced the transcript of expected sizes, some illustrated in Fig. 2B (lanes e, f).

### 3.2. Transcript estimation level

Real time RT-PCR was employed to estimate the transcript peptide level of the different ETgpC. As shown in Fig. 2C, the highest level of expression was obtained in pKETc7<sub>23</sub>, pKETc12<sub>6</sub>, pKETc1<sub>11</sub> and pKETc1<sub>3</sub> clones. No signal was obtained from EmpCL.

### 3.3. Antibody induction by immunization with ETgpC

Antibodies induced by immunization with ETgpC were detected by immunohistochemistry. This method was employed because of its high sensitivity to detect the presence and abundance of the respective proteins in their native conformation. Specific Abs induced by immunization with ETgpC show that all peptides were detected in *T. crassiceps*

ceps slides (Fig. 3). KETc12 was clearly identified in the parenchyma (Fig. 3D, J) while KETc1 was only detected in the tegument (Fig. 3F, L). KETc7 was revealed in the tegument and lightly in the parenchyma (Fig. 3E, K). Sera from saline (Fig. 3A, G) or EmpCL immunized mice (Fig. 3C, I) showed no or a slight reaction on cysticercus slides, respectively. No specific antibodies were detected using ELISA or Western blot. Only the p<sub>1</sub>KETc1<sub>9</sub> clone was significantly recognized by the antibody Anti-His (C-Term) HRP (Invitrogen, Carlsbad CA), which recognizes the six His-tail.

### 3.4. High protective capacity of some ETgpC against murine cysticercosis

The effect of the s.c. immunization of mice with soluble extract of two ETgpC, that express KETc7, at two different doses is shown in Table 1. As can be seen, pKETc7<sub>23</sub> significantly reduced the expected parasite load and the percentage of totally protected mice, more efficiently at the lower protein dose (200  $\mu$ g of soluble extract proteins per mouse). No significant effects were detected in pKETc7<sub>21</sub> immunized mice. The lower protein dose was used to evaluate the remaining ETgpC. Table 2 shows that 6 out of 15 different ETgpC that expressed KETc1.6 His protected against murine cysticercosis reducing significantly the number of parasites and inducing total protection in 70 to 90% of immunized mice, four ETgpC significantly reduced the parasite load and five did not induce significant protection. The pKETc12<sub>6</sub> and pKETc12<sub>7</sub> ETgpC, expressing the KETc12.6His peptide, induced almost complete protection. The ETgpC that induced the highest level of protection exhibited also the highest levels of the respective transcript according to the real-time RT-PCR (Fig. 2C). Interestingly,

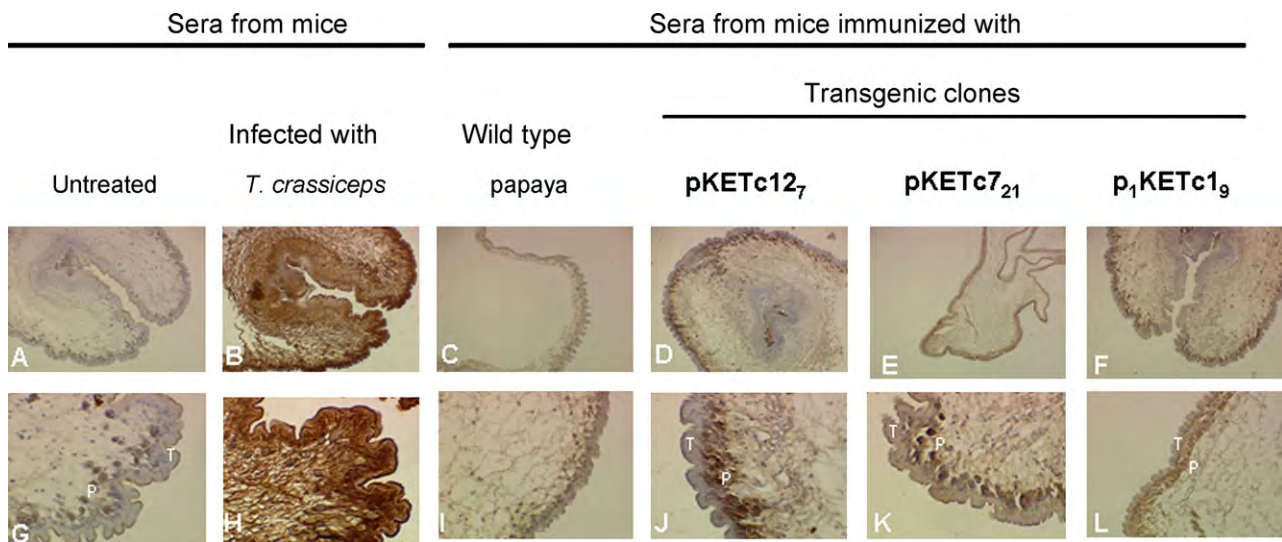


Fig. 3. Immunohistochemistry to detect specific antibodies. Sections of 6  $\mu$ m of *T. crassiceps* tissues were processed and incubated with sera from untreated mice (A, G), from *T. crassiceps*-infected mice (B, H) and from mice immunized with ETgpC (B–F and H–L). KETc7 was detected in tegument (T) and parenchyma (P), while KETc1.6His was only detected in tegument and KETc12.6His in parenchyma. Magnification:  $\times 10$  (A–F) and  $\times 40$  (G–L).

Table 1  
Effective protection induced by subcutaneous immunization with ETgpC that express KETc7

|                      | Individual number of cysticerici                 | Median [95% confidence limits] | Percentage of TpM |
|----------------------|--|--------------------------------|-------------------|
| Unimmunized          | 1, 56, 135, 153, 203, 224, 245 <sup>a</sup>      | 153 [62.5–228.4]               | 0 <sup>a</sup>    |
| Immunized with:      |  |                                |                   |
| 200 µg/mouse         |  |                                |                   |
| EmpCL                | 0, 1, 3, 10, 13, 25, 46, 54, 114 <sup>b</sup>    | 13 [0.96–58.2]                 | 11 <sup>a</sup>   |
| pKETc7 <sub>21</sub> | 0, 0, 0, 0, 0, 1, 1, 63, 86, 209 <sup>b</sup>    | 0 [–17.7–107]                  | 40 <sup>a</sup>   |
| pKETc7 <sub>23</sub> | 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 1, 3, 12, 66 <sup>c</sup>   | 0 [–9.2–24.5]                  | 63 <sup>b</sup>   |
| 1000 µg/mouse        |  |                                |                   |
| EmpCL                | 0, 0, 3, 16, 60, 88, 95, 151, 417 <sup>a,b</sup> | 60 [–9.7–194.2]                | 22 <sup>a</sup>   |
| pKETc7 <sub>21</sub> | 0, 0, 0, 1, 2, 3, 4, 4, 49 <sup>b</sup>          | 2 [–5.2–19.2]                  | 3 <sup>a</sup>    |
| pKETc7 <sub>23</sub> | 0, 0, 0, 0, 0, 2, 8, 73, 241, 249 <sup>b,c</sup> | 1 [–15.3–129.9]                | 50 <sup>b</sup>   |

Cysticerici were recovered 40 days after challenge. TpM (totally protected mice): number of mice bearing zero cysticerici divided by the number of mice tested in the group × 100. Data labeled with the same letter are not significantly different from each other, whereas those with different superscript letters are significantly different ( $P < 0.05$ ). Comparisons were done between columns. The data are representative of two independent experiments.

immunization with EmpCL significantly reduced the parasite load albeit to a lesser extent than the protective ETgpC. However, no significant effect on the percentage of totally protected mice was detected. No adverse effect on mouse appearance or behavior was observed in mice immunized with the EmpCL or with each of the ETgpC tested.

#### 4. Discussion

In this study, ETgpC expressing the protective peptides of the S3Pvac vaccine against cysticercosis were produced,

improving their immunogenic properties. Papaya proved to be a useful system for this purpose. ETgpC clones were considered stable since the respective inserts were maintained according to the specific PCR and RT-PCR amplification routinely obtained and considering the consistent higher levels of protection induced against murine cysticercosis compared with embryonic papaya cell line.

S.c. immunization against the murine cysticercosis model was used as a screening strategy to identify the most promising ETgpC. Interestingly, a remarkable protective capacity was induced by most of the ETgpC: 10 out of 15 that express the peptide KETc1.6His, the two of KETc12.6His

Table 2  
Effective protection induced by subcutaneous immunization with ETgpC that express KETc1.6His and KETc12.6His peptides

|                                   | Individual number of cysticerici                 | Median [95% confidence limits] | Percentage of TpM |
|-----------------------------------|--|--------------------------------|-------------------|
| Unimmunized                       | 26, 19, 31, 34, 39, 128, 139, 7, 93 <sup>a</sup> | 34 [19.4–95.3]                 | 0 <sup>a</sup>    |
| Immunized with:                   |  |                                |                   |
| EmpCL                             | 24, 10, 5, 30, 13, 0, 36, 22, 41, 1 <sup>b</sup> | 17.5 [7.8–28.5]                | 10 <sup>a</sup>   |
| ETgpC                             |  |                                |                   |
| pKETc1 <sub>1</sub>               | 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 1, 29, 127 <sup>c</sup>     | 0 [–13–44.4]                   | 70 <sup>b</sup>   |
| pKETc1 <sub>2</sub>               | 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 2, 4, 83 <sup>c</sup>       | 0 [–8.6–24.8]                  | 70 <sup>b</sup>   |
| pKETc1 <sub>3</sub>               | 0, 0, 0, 0, 0, 0, 1, 1, 1, 5 <sup>c</sup>        | 0 [–0.3–1.9]                   | 60 <sup>b</sup>   |
| pKETc1 <sub>5</sub>               | 0, 0, 0, 0, 0, 0, 1, 1, 3, 3 <sup>c</sup>        | 0 [–0.1–1.5]                   | 60 <sup>a</sup>   |
| p <sub>1</sub> KETc1 <sub>9</sub> | 0, 0, 0, 0, 0, 1, 2, 4, 1, 1 <sup>c</sup>        | 1 [–0.02–2.0]                  | 50 <sup>a</sup>   |
| p <sub>2</sub> KETc1 <sub>9</sub> | 0, 0, 0, 0, 0, 1, 1, 1, 2, 3 <sup>c</sup>        | 1 [0.8–1.7]                    | 50 <sup>a</sup>   |
| pKETc1 <sub>11</sub>              | 0, 0, 0, 0, 0, 0, 2, 2, 3, 23 <sup>c</sup>       | 0 [–2.1–8.1]                   | 60 <sup>a</sup>   |
| pKETc1 <sub>12</sub>              | 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 1, 2, 43 <sup>c</sup>       | 0 [–5.1–14.3]                  | 70 <sup>b</sup>   |
| pKETc1 <sub>13</sub>              | 0, 1, 0, 0, 267, 226, 0, 17, 241, 0 <sup>b</sup> | 0.5 [–8.8–159.2]               | 50 <sup>a</sup>   |
| pKETc1 <sub>16</sub>              | 2, 0, 0, 0, 284, 0, 0, 0, 1, 190 <sup>b</sup>    | 0 [–25.4–120.8]                | 60 <sup>a</sup>   |
| pKETc1 <sub>20</sub>              | 2, 3, 0, 0, 298, 102, 9, 16, 0, 0 <sup>b</sup>   | 2.5 [–26.2–110.2]              | 40 <sup>a</sup>   |
| pKETc1 <sub>21</sub>              | 0, 0, 3, 1, 0, 100, 46, 0, 0, 0 <sup>b</sup>     | 0 [–8.7–38.7]                  | 60 <sup>a</sup>   |
| pKETc1 <sub>25</sub>              | 0, 0, 0, 18, 0, 0, 0, 0, 0, 0 <sup>c</sup>       | 0 [–2.3–5.9]                   | 90 <sup>b</sup>   |
| pKETc1 <sub>40</sub>              | 0, 3, 3, 0, 0, 116, 0, 162, 0 <sup>b</sup>       | 0 [–16.1–79.2]                 | 55 <sup>a</sup>   |
| pKETc1 <sub>41</sub>              | 2, 0, 0, 2, 0, 0, 0, 0, 0, 5 <sup>c</sup>        | 0 [–0.3–2.1]                   | 70 <sup>b</sup>   |
| pKETc1 <sub>26</sub>              | 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 1, 2 <sup>c</sup>        | 0 [–0.1–0.7]                   | 80 <sup>b</sup>   |
| pKETc1 <sub>27</sub>              | 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 1, 1, 1 <sup>c</sup>        | 0 [–0.04–0.58]                 | 70 <sup>b</sup>   |

Cysticerici were recovered 40 days after challenge. Percent of TpM (totally protected mice): number of mice bearing zero cysticerici divided by the number of mice tested in the group × 100. Data labeled with the same letter are not significantly different from each other, whereas those with different superscript letters are significantly different ( $P < 0.05$ ). Comparisons were done between columns. The data are representative of two independent experiments.

(pKETc12<sub>6</sub> and pKETc12<sub>7</sub>) and one of KETc7 (pKETc7<sub>23</sub>). Remarkable is also that 200 µg of ETgpC soluble extract, without the presence of adjuvant and with only one booster elicited high level of protection against murine cysticercosis (Table 1), which indicates the high immunogenicity of the recombinant peptides. Some of them induced almost complete resistance to the parasitosis. Differences in vaccine efficiency between the ETgpC tested for the same peptide could be related to the content and/or conformation exhibited by the peptide. As expected, the highest level of protection was induced by the ETgpC which also exhibited the highest level of expression as determined by real time RT-PCR (Table 2, Fig. 2C). Moreover, the level of protection generated with the recombinant peptides KETc1.6His, KETc12.6His and KETc7 delivered by ETgpC is significantly higher than that obtained with the corresponding synthetic peptides [9,10,25]. Immunized mice elicited specific Abs that recognized the respective peptide in the native proteins in the larval parasite stage [9,10] confirming that the recombinant peptides expressed in ETgpC maintained their immunogenic properties. However, KETc1.6His and KETc12.6His could not be detected in ETgpC by ELISA using antibody anti-His (C-Term), probably due to the low expression of the recombinant peptides.

The high level of protection induced against *T. crassiceps* cysticercosis, a murine model that allows the successful identification of effective vaccine antigens, is greatly encouraging. Plants have been reported as appropriate delivery systems for oral immunization [26]. Thus, the anti-cysticercosis papaya vaccine could be orally administered offering a more friendly and low-cost alternative form of immunization which would also avoid the practical difficulties of needle-point vaccination.

High levels of protection against viral and bacterial infections have been induced recombinant antigens successfully expressed in a number of transgenic plants [27]. However, to the best of our knowledge, this is the first report of a protective vaccine expressed in transgenic plants against a parasitic infection. In addition, results reported herein indicate that papaya system is a new potent antigen delivery system that could be of useful to produce new subunit vaccines to prevent other diseases.

One concern about plant-based vaccines is the need for additional purification to avoid non-desirable effects by plant components which could certainly increase the costs of the biological products [27]. In this context, it is interesting to note that EmpCL itself significantly reduce the parasite load in infected mice with respect to naïve mice with no apparent side effects. It could be that antigens shared between cysticerci and papaya or the natural adjuvant activity extensively reported for many plants including papaya could underlie this protection [28].

In summary, the present study is a contribution to the development a new vaccine expression and delivery system. In addition, this plant derived vaccine version represents a

new tool of potential for oral prevention human and porcine cysticercosis.

## Acknowledgements

We acknowledge Valentin Mendoza, Alicia Chagoya, Elva Teresa Aréchiga Carvajal, Sergio Casas, Gerardo Arrellín, Beatriz Hernández, Verónica Rodríguez Mata, Salvador Guzmán, Martha Lara, Mercedes Baca and Georgina Diaz for their technical support; Carlos Larralde for his useful comments; Isabel Pérez Montfort for English correction of this manuscript, and the PhD Degree Program in Biological Sciences at the Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, Mexico City, where Marisela Hernandez studies her PhD degree. This research was partially supported by the CONACyT (46953-m; 2004-01-040), DGAPA (IN 221905) and The Howard Hughes Medical Institute (55004134).

## References

- [1] Sciutto E, Fragoso G, Fleury A, Lacleste JP, Sotelo P, Aluja A, et al. Limitations of current diagnostic procedures for the diagnosis of *Taenia solium* cysticercosis in rural pigs. *Microbes Infect* 2000;15:1875–90.
- [2] Carabin H, Krecsek RC, Cowan LD, Michael L, Silbat-Foyaca H, Nash T, et al. Estimation of the cost of *Taenia solium* cysticercosis in Eastern Cape Province, South Africa. *Trop Med Int Health* 2006;11:906–16.
- [3] Molinari JL, Rodríguez D, Tato P, Soto R, Arechavaleta F, Solano S. Field trial for reducing porcine *Taenia solium* cysticercosis in Mexico by systematic vaccination of pigs. *Vet Parasitol* 1997;69:55–63.
- [4] Nascimento E, Costa JO, Guimaraes MP, Tavares CA. Effective immune protection of pigs against cysticercosis. *Vet Immunol Immunopathol* 1995;45:127–37.
- [5] Cai X, Chai Z, Jing Z, Wang P, Luo X, Chen J, et al. Studies on the development of DNA vaccine against *Cysticercus cellulosae* infection and its efficacy. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2001;32:105–10.
- [6] Manoutcharian K, Diaz-Orea A, Gevorkian G, Fragoso G, Acero G, Gonzalez E, et al. Recombinant bacteriophage-based multi-epitope vaccine against *Taenia solium* pig cysticercosis. *Vet Immunol Immunopathol* 2004;99:11–24.
- [7] Flisser A, Gauci GC, Zoli A, Martinez-Ocana J, Garza-Rodriguez A, Dominguez-Alpizar JL, et al. Induction of protection against porcine cysticercosis by vaccination with recombinant oncosphere antigens. *Infect Immun* 2004;72:5292–7.
- [8] Gonzalez AE, Gauci GC, Barber D, Gilman RH, Tsang VC, Garcia HH, et al. Vaccination of pigs to control human neurocysticercosis. *Am J Trop Med Hyg* 2005;72:837–9.
- [9] Toledo A, Larralde C, Fragoso G, Gevorkian G, Manoutcharian K, Hernandez M, et al. Towards a *Taenia solium* cysticercosis vaccine: an epitope shared by *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* protects mice against experimental cysticercosis. *Infect Immun* 1999;67:2522–30.
- [10] Toledo A, Fragoso G, Rosas G, Hernandez M, Gevorkian G, Lopez-Casillas F, 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;69:1766–73.
- [11] Huerta M, de Aluja AS, Fragoso G, Toledo A, Villalobos N, Hernandez M, et al. Synthetic peptides vaccine against *Taenia solium* pig cysticercosis: successful vaccination in a controlled field trial in rural Mexico. *Vaccine* 2001;20:262–6.
- [12] Sciutto E, Morales J, Martínez JJ, Toledo A, Villalobos N, Cruz-Revilla C, et al. Further evaluation of the synthetic peptide vaccine S3Pvac

- against *Taenia solium* cysticercosis in pigs in an endemic town of Mexico. *Parasitol* 2006;4:1–5.
- [13] Aluja AS, Villalobos NM, Nava G, Toledo A, Martínez JJ, Plancarte A, et al. Therapeutic capacity of the synthetic peptide-based vaccine against *Taenia solium* cysticercosis in pigs. *Vaccine* 2005;23:4062–9.
- [14] Shen X, Lagergard T, Yang Y, Lindblad M, Fredriksson M, Holmgren J. Systemic and mucosal immune response in mice after mucosal immunization with group B streptococcus type III capsular polysaccharide-cholera toxin B subunit conjugate vaccine. *Infect Immun* 2000;68:5749–55.
- [15] Rydell N, Sjöholm I. Oral vaccination against diphtheria using polyacryl starch microparticles as adjuvant. *Vaccine* 2004;22:1265–74.
- [16] Mojica-Henshaw MP, Francisco AD, de Guzman F, Tigno TX. Possible immunomodulatory actions of *Carica papaya* seed extract. *Clin Hemorheol Microcirc* 2003;29:219–29.
- [17] Cabrera-Ponce JL, Vegas JA, Herrera-Estrella L. Herbicide resistant transgenic papaya plants produced by an efficient particle bombardment transformation method. *Plant Cell Reports* 1995;15:1–7.
- [18] Rosas G, Cruz-Revilla C, Fragoso G, Lopez-Casillas FA, Perez M, Bonilla R, et al. *Taenia crassiceps* cysticercosis: humoral immune response and protection elicited by DNA immunization. *J Parasitol* 1998;84:516–23.
- [19] López-Bucio J, Martínez De La Vega O, Guevara-García A, Herrera-Estrella L. Enhanced phosphorus uptake in transgenic tobacco plants that overproduce citrate. *Nat Biotechnol* 2000;18:450–3.
- [20] Cabrera-Ponce JL, López L, Assad-García C, Medina-Arevalo N, Bailey A, Herrera-Estrella L. An efficient particle bombardment system for the genetic transformation of asparagus (*Asparagus officinalis* L.). *Plant Cell Reports* 1997;16:255–60.
- [21] Christou P, Ford TL, Kofron M. The development of a variety independent gene-transfer methods for rice. *Trends Biotechnol* 1992;10:239–46.
- [22] Shure M, Wessler S, Fedoroff N. Molecular identification and isolation of the Waxy locus in maize. *Cell* 1983;35:225–33.
- [23] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265–75.
- [24] Fragoso G, Lamoyi E, Mellor A, Lomeli C, Hernandez M, Scitutto E. Increased resistance to *Taenia crassiceps* murine cysticercosis in Qa2 transgenic mice. *Infect Immun* 1998;66:760–4.
- [25] Manoutcharian K, Rosas G, Hernandez M, Fragoso G, Aluja A, Villalobos N, et al. Cysticercosis: identification and cloning of the protective recombinant antigens. *J Parasitol* 1996;82:250–4.
- [26] Wen SX, Teel LD, Judge NA, O'Brien AD. A plant-based oral vaccine to protect against systemic intoxication by Shiga toxin type 2. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:7082–7.
- [27] Daniell H, Streatfield SJ, Wycoff K. Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants. *Trends Plant Sci* 2001;6:219–26.
- [28] Chapagain BP, Wiesman Z. Phyto-saponins as a natural adjuvant for delivery of agromaterials through plant cuticle membranes. *J Agric Food Chem* 2006;54:6277–85.