



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

Taenia pisiformis: Modelo para la evaluación de la eficiencia de diferentes
candidatos vacunales

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A :

MIGUEL ANGEL BETANCOURT ALONSO

TUTORES

Dra. Aline Schunemann de Aluja, FMVZ-UNAM

Dr. Fernando Iván Flores Pérez, UAEMor.

Dra. Edda Sciutto Conde, IIB-UNAM

México, D.F.

AGOSTO

2013.



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

Agradezco a los miembros del jurado y de mi comité tutorial por su apoyo y paciencia para la revisión y acertados comentarios al presente documento, con todo respeto y admiración.

Dra. Aline Schuneman de Aluja

Dr. Iván Flores Pérez

Dra. Edda Sciutto Conde

Al jurado, Dr. José Juan Martínez Maya, Dr. Froylán Ibarra, Dr. Raúl Bobes Ruíz, Dra. Patricia Tato Zaldivar.

Al Dr. Iván Flores Pérez por su ejemplo de sabiduría, empeño, constancia y sobre todo por el apoyo para realizar este proyecto; como parte fundamental en mi formación desde la tesis de licenciatura, maestría y ahora con este proyecto de doctorado, gracias.

A investigadores y alumnos del Instituto de Investigaciones Biomédicas y de la Facultad de Medicina, principalmente al Dr. Raúl Bobes y a la M. en C. Patricia de la Torre por su capacitación en las técnicas de laboratorio empleadas para la elaboración de este trabajo.

Al Dr. Mario Pérez Martínez de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM por sus sabias palabras y consejos recibidos desde hace 10 años.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo otorgado como becario de posgrado en el programa de Doctorado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM.

DEDICATORIA

A mis padres y hermano por estar conmigo en todos los eventos profesionales y personales que sucedieron durante la realización de este trabajo.

CONTENIDO

Página

I.	RESUMEN	
II.	ABSTRACT	
1.	Introducción	1
2.	Hipótesis	27
3.	Objetivo general	28
4.	Objetivo específico	28
5.	Material y métodos	29
6.	Resultados	37
7.	Discusión	41
8.	Literatura citada	46

Anexos

- a) Lista de cuadros
- b) Lista de figuras

I. Resumen

La vacuna multivalente S3Pvac ha demostrado su efectividad en campo contra la cisticercosis porcina ocasionada por *Taenia. solium*, tanto la versión sintética como la expresado en fago filamentoso. El presente estudio fue diseñado para comparar la efectividad de estas dos versiones de S3Pvac junto con la versión expresada en callo embriogénico de papaya (S3Pvac-papaya), la cual se administra por vía oral. Los experimentos se realizaron con una infección experimental por vía oral con huevos de *Taenia pisiformis* en conejas de la raza Nueva Zelanda.

Grupos de 24 conejas fueron inmunizadas por vía subcutánea 2 veces con S3Pvac-sintética o S3Pvac-fago, o por vía oral con S3Pvac papaya. Un grupo de 24 conejas solo recibió solución salina como control. Dos semanas después de la última inmunización las conejas fueron infectadas por vía oral con 3,000 huevos de *T. pisiformis*. Doce conejas de cada grupo fueron sacrificadas a los 7 días post infección y el resto a los 21 días post infección.

La inmunización con las diferentes presentaciones de la vacuna y las diferentes vías de administración, redujeron de manera significativa el número de cisticercos peritoneales así como el número de lesiones hepáticas ($P < 0.05$). La versión de S3Pvac sintética aplicada por vía subcutánea muestra una eficacia similar a la versión S3Pvac-papaya que se administra por vía oral. La vacuna S3Pvac fago muestra un menor nivel de protección respecto a las otras dos sin que existan diferencias significativas ($P > 0.05$).

El incremento en el número de linfocitos y de macrófagos en las lesiones hepáticas por el efecto de la vacuna nos indica una respuesta inflamatoria a nivel local ($P < 0.05$). La presencia de los epitopes vacunales en las oncosferas de *T. pisiformis* mediante el estudio por inmunohistoquímica nos sugiere la existencia de una protección cruzada.

Este estudio es el primer reporte del efecto de la vacuna oral S3Pvac-papaya contra una infección experimental de cisticercosis por vía oral, lo cual indica su alto potencial para ser usada con la cisticercosis ocasionada por *T. pisiformis* o *T. solium*.

Palabras clave: *Taenia pisiformis*, vacuna, S3Pvac, granuloma, cisticercosis, conejo.

II. Abstract

The injectable multivalent vaccine S3Pvac proved to be effective in the field against *Taenia solium* porcine cysticercosis both, synthetically and recombinantly expressed in filamentous phages. This study was designed to compare the effectiveness of these two versions of S3Pvac with the new developed version of the vaccine expressed in transgenic papaya callus (S3Pvac-papaya) orally administered in a rabbit experimental cysticercosis induced by oral ingestion of *Taenia pisiformis* eggs.

Groups of 24 rabbits were subcutaneously vaccinated twice with S3Pvac-synthetic or S3Pvac-phage, or orally with S3Pvac-papaya. A group of 24 rabbits received only saline as controls. Two weeks after the last immunization rabbits were challenged orally with 3000 eggs of *T. pisiformis*. Twelve rabbits of each group were sacrificed 7 days after the infection and the others at day 21 of infection.

Vaccination with the different vaccine presentations and route of administration used significantly reduced the expected number of peritoneal cysticerci and the number of hepatic lesions as well ($P < 0.05$). S3Pvac-synthetic subcutaneously applied exhibited a similar high efficacy than the oral S3Pvac-papaya vaccine. A lower but high level of protection was induced by S3Pvac-phage subcutaneously administered, albeit its efficacy did not statistically differ when compared with S3Pvac synthetic or expressed in papaya ($P > 0.05$). An increased number of lymphocytes and macrophages in the hepatic lesions point to the relevance of the enhanced immunity induced by vaccination in controlling the infection ($P < 0.05$).

The presence of the S3Pvac vaccine epitopes in the *T. pisiformis* oncospheres evidences the cross-immunity that underlies the protection observed.

This study reports for the first time a novel effective oral S3Pvac-papaya vaccine against cysticercosis orally acquired of high potential to be used against *T. pisiformis* and *Taenia solium* cysticercosis.

Keywords: *Taenia pisiformis*, vaccine, S3Pvac, granuloma, cysticercosis, rabbit, cestoda

1. Introducción

El conejo doméstico (*Oryctolagus cuniculus L.*) es uno de los animales más prolíficos y presenta diversas ventajas productivas. Su carne es un alimento de consumo humano que se caracteriza por sus bajos niveles de grasa y colesterol, además de su fácil digestibilidad. Otras características importantes son la capacidad que tiene la hembra de producir 80 kilos de conejo vivo cada año (FAO, 2001). Su piel y pelo representan subproductos altamente apreciados por las industrias peletera y textil, respectivamente (Martínez, 2004).

En la actualidad la producción mundial de carne de conejo asciende a más de un millón de toneladas. China es uno de los principales países productores con 315 000 ton (FAO, 2000), Italia con 221 000 ton, España 135 000 ton, Francia 85,000 ton (FAO, 2001), América del Sur con 16,317 ton y América Central con 4,364 ton. El conejo también se emplea actualmente como animal de compañía y experimentación (Fox, 1984; Harkness, 1995).

Las enfermedades parasitarias son relevantes desde el punto de vista económico, debido a que disminuyen el potencial productivo de los animales domésticos y algunas son zoonóticas como el caso de la teniasis-cisticercosis producida por *Taenia solium* (Quiroz, 2003). En el caso de la investigación de enfermedades parasitarias, como es la cisticercosis causada por el parásito *T. pisiformis*, se ha utilizado como modelo experimental de cisticercosis (López-Moreno, 2002). Las evidencias de reactividad cruzada entre céstodos de *Taenia solium* y *Taenia*

pisiformis observada por Western blot sustentan el uso del modelo de cisticercosis ocasionada por *T. pisiformis* como modelo de estudio para la parasitosis ocasionada por *Taenia solium* (García y col, 1996).

La teniasis cisticercosis ocasionada por *Taenia solium* representa un problema de salud pública en gran parte del mundo, se ha estimado que alrededor de 50 millones de personas la padecen (WHO, 2005). Específicamente, para Latinoamérica se ha estimado que hay 400,000 pacientes infectados sintomáticos, y que en México y Brasil se invierten 90 millones de dólares para el tratamiento de neurocisticercosis (Kosla y col, 2002). Asimismo, en Estados Unidos de Norteamérica se invierten alrededor de 9 millones de dólares por año, para la curación principalmente de inmigrantes que la padecen (Kosla y col, 2002).

Es importante considerar que esta parasitosis es zoonótica, y en México se ha reportado en los Estados de Morelos, Puebla, Yucatán, Chiapas, Tabasco, Guerrero, Oaxaca, Sinaloa, Hidalgo, Quintana Roo, Colima, Michoacán, Jalisco, Aguascalientes, Zacatecas, Durango, Tlaxcala, Veracruz, Guanajuato y en el Estado de México (Huerta y col, 2001, Morales y col, 2002, Sciutto y col, 2006 Sciutto y col, 2011). Además, al ser una enfermedad zoonótica, afecta también al humano y representa un problema de salud pública que también impacta en la producción porcina por el decomiso de canales infectadas cuando estos animales llegan a rastro (Acevedo y col, 1982, Sciutto y col, 2000, de Aluja y col, 2010).

Este problema prevalece tanto en áreas urbanas como rurales donde se asocia a las prácticas tradicionales de crianzas de cerdos, malas condiciones sanitarias, e higiénicas, ignorancia, pobreza y corrupción (Morales, 2008). Con el propósito de contribuir al control de la Teniosis–cisticercosis y su erradicación, se han propuesto diferentes opciones, que consideran desde medidas de higiene básicas y mejoramiento de las técnicas diagnósticas, hasta el empleo de vacunas en cerdos con el propósito de interrumpir el ciclo parasitario de *T. solium* (Sarti y col, 1997, Molinari y col, 1997, Sciutto y col, 2000).

Varias especies de céstodos (*T. taeniaformis*, *T. crassiceps*, *T. ovis*, *T. saginata*, *T. solium*) han sido usadas para el desarrollo de vacunas basadas en antígenos derivados de oncosferas de estos parásitos contra *T. solium* (Jabbar y col., 2010, Sciutto y col., 2011, Jayashi y col., 2012, Gauci y col., 2012).

Así mismo, existen reportes que establecen que una gran cantidad de antígenos son compartidos entre diferentes céstodos (Richard and Coman, 1977; Larralde y col., 1989; Ishida y col., 2003, Lightowlers, 2003).

Esta inmunoreactividad cruzada entre cestodos, se utilizó para el diseño de la vacuna S3Pvac, la cual está constituida por tres péptidos denominados como GK1 (18 aa), KETc1 (13 aa), y KETc12 (8 aa), originalmente identificados en *T. crassiceps*. Los tres péptidos resultaron ser compartidos por *T. solium*, se expresan en los tres diferentes estadios del parásito e inducen altos niveles de protección contra la cisticercosis murina por *T. crassiceps* así como la causada por *T. solium* (Toledo, 1999; Toledo, 2001; Huerta y col., 2001).

La capacidad protectora de la vacuna S3Pvac expresada en forma sintética y la recombinante expresada en fagos filamentosos, han sido evaluadas en condiciones naturales de infección en los Estados de Puebla y Morelos, obteniendo niveles similares de reducción del número de cerdos infectados que oscila entre el 50 y 70% y también disminuyó la cantidad de parásitos instalados (entre el 97% en el Estado de Puebla y el 89% en el Estado de Morelos (Huerta y col., 2001; Morales y col., 2010). Además parece inducir daño a los cisticercos instalados (Huerta y col., 2001; Morales y col., 2010, Aluja y col., 2005; 2011).

Los epitopes vacunales GK1, KETc1, y KETc12 no solo se han expresado en la superficie de proteínas de fagos filamentosos (Manoutcharian y col., 2004) sino también más recientemente en callos transgénicos de la papaya (Hernández y col., 2007). Los péptidos vacunales expresados en callos transgénicos de papaya administrados por vía inyectable protegieron en contra de la cisticercosis murina. (Hernández, 2007) Ambas presentaciones recombinantes de la vacuna resultan de interés, la expresada en fagos, en particular por su bajo costo de producción y la expresada en papaya por ser una versión óptima para estimular la inmunidad local del tracto gastrointestinal administrada por vía oral.

Para evaluar la protección que induce la vacuna por vía oral, es adecuado contar con un modelo de cisticercosis adquirida por ingestión de huevos, que permita estimar la relevancia de una posible inmunidad de mucosas en el control de la infección. En este sentido, resulta de interés para evaluar la utilidad de una vacuna

oral contra la cisticercosis el modelo de cisticercosis cunícula (*T. pisiformis*). Los reportes de que esta parasitosis es prevenible por vacunación con antígenos oncosferales así como por antígenos de secreción de cisticercos, apoyan la factibilidad de predicción de este modelo (Craig and Zumbuehl, 1988). Aunque poco se ha explorado sobre la cisticercosis cunícula, algunos reportes señalan la relevancia de la respuesta de anticuerpos para mediar la protección observada (Outteridge, 1974; Kyngdon y col., 2006). Se han encontrado anticuerpos asociados a antígenos de superficie del estado larvario del parásito que señalan su posible relevancia en la biología del parásito (Craig *et al.*, 1988).

El disponer del ciclo de vida completo de *T. pisiformis* nos permite considerar a este parásito como un candidato adecuado para evaluar diferentes antígenos vacunales y diferentes vías de administración para la prevención de la fase intestinal y larvaria del parásito. Además del interés como modelo experimental, es necesario considerar que *T. pisiformis* constituye un problema sanitario para cunicultores poco tecnificados y es causante de pérdidas económicas por decomiso de hígados en rastro (Essain, 1997), en México se desconoce su frecuencia.

El modelo de estudio del metacéstodo de *T. pisiformis* tiene las ventajas de no representar un riesgo potencial para el hombre; siendo el conejo y la liebre los únicos huéspedes intermediarios. En términos experimentales, el conejo es un animal de más accesible manutención y fácil manipulación que el cerdo, y de mucho menor costo (López-Moreno, 2002).

1.1 Modelos animales empleados para la elaboración de vacunas.

Los modelos animales se pueden utilizar en una amplia variedad de formas para estudiar la patogénesis de enfermedades, las interacciones huésped-patógeno y mecanismos de protección después de la vacunación o el tratamiento de la enfermedad (Gertz y col., 2007). Modelos de enfermedades naturales en los cuales se emplea un patógeno específico y su huésped natural, tienen la ventaja de predecir la interacción entre el huésped y el patógeno en un contexto biológico adecuado. Esto es importante ya que permite el análisis de factores de virulencia y su papel en la invasión, la penetración y la toxicidad, así como la respuesta inmunológica del huésped al patógeno (Ly y col., 2000; Baron y Coombes, 2007).

Además de comprender la inmunopatogénesis, esto también permite la identificación de moléculas específicas que requiere a menudo el patógeno para la inducción de la enfermedad y que a menudo representan objetivos para la respuesta de defensa del huésped. El uso de estas moléculas como antígenos de la vacuna ha demostrado ser una estrategia muy exitosa para el desarrollo de vacunas eficaces contra enfermedades humanas y animales. Los principales ejemplos son glicoproteínas de superficie virales o sistemas de secreciones de tipo III bacterianas, que se pueden combinar varias proteínas altamente inmunogénicas (Potter y col., 2004; Rouse and Kaitsha, 2006)

También es importante mencionar la existencia de modelos sustitutos, y esto se refieren al uso de especies que sólo puede ser infectadas con el patógeno de

interés en condiciones experimentales, en los cuales se utilizan las dosis más altas de infección o rutas de infección que no corresponden a la vía de entrada natural del patógeno (Osterrieder, 2006).

Los modelos animales también pueden servir para analizar los aspectos específicos de la respuesta inmunológica, tales como el desarrollo de los órganos que participan en la inmunidad, el tráfico de las células inmunológicas después de la infección o la vacunación, , diferentes vías de administración (como la oral o intramuscular). Además, los modelos animales permiten el análisis de la inmunidad de grupo después de la vacunación, la transmisión entre animales infectados y no infectados, así como el estudio de la transferencia de inmunidad pasiva a través de la placenta y el calostro (Schmidt, 2007; Vyas, 2007).

La calidad de un modelo animal y su adecuación para el desarrollo de vacunas pueden ser definidas por su capacidad de reproducir la fisiología de la población objetivo de la vacuna. Por lo tanto, buenos modelos comparten las mismas características fisiológicas, o al menos reflejan tan de cerca como sea posible. Por ejemplo, la fisiología de la piel es muy similar entre seres humanos y cerdos, lo que hace el cerdo un buen modelo para el estudio de la entrega intradérmica o tópica de la vacuna (Gertz, 2007).

El desarrollo del sistema inmunológico, en particular, la maduración de los tejidos linfoides asociados a mucosas, es similar en seres humanos, ovejas, vacas y

cerdos, lo que hace de nuevo estas especies buenos modelos para el estudio de liberación por la mucosa de las vacunas (Gerdtz, 2006)

Muchas enfermedades son las infecciones zoonóticas emergentes y, de hecho, este vínculo entre las enfermedades animales y el desarrollo de vacunas humanas pueden llegar a ser cada vez más importante en muchas enfermedades humanas emergentes en desarrollo, como consecuencia directa de la interfaz humano-animal más importante en muchas partes del mundo. Una reducción de este riesgo se puede lograr ya sea a través de la vacunación de los animales o el depósito a través del rápido desarrollo de nuevas vacunas para los seres humanos. (Hall, 2004)

1.2 *Taenia solium*: Ciclo biológico y consideraciones para su prevención

T. solium es un parásito que en su ciclo de vida incluye al ser humano como único hospedero definitivo y a los cerdos como principales hospederos intermediarios. Causa enfermedades como teniosis y en el humano cisticercosis y el cerdo, ambas constituyen un importante problema de salud pública en Iberoamérica, África y Asia (Flisser y col., 2006).

Por las características biológicas que presentan *T. crassiceps* (en ratón) y *T. pisiformis* (en conejo), han sido empleadas como modelos de estudio en la teniosis-cisticercosis por *T. solium* que afecta al ser humano (López-Moreno, 2002).

En el cestodo *T. crassiceps* se lograron identificar tres péptidos (KETc1, KETc12 y GK1) que también fueron identificados en *T. solium* y resultaron protectores en contra de la cisticercosis murina experimentalmente. Para estas evaluaciones se utilizaron ratones hembras de la cepa BALB/cAnN, que presentan la mayor susceptibilidad a la infección. En efecto, en la infección experimental con el metacéstodo de *T. crassiceps*, se ha sugerido que en ratones hembras, el parásito presenta un crecimiento mayor en etapas iniciales de la infección, por lo que se postula que las hembras son más susceptibles y que en hembras ovariectomizadas la susceptibilidad disminuye (Huerta y col., 1992).

Estos epítopes han sido químicamente sintetizados y denominados como KETc1, GK1 y KETc12 (Toledo, 1999; Toledo, 2001). KETc1 está conformado por 12 aminoácidos: Ala Pro Met Ser Thr Pro Ser Ala Thr Ser Val Arg Gly. GK1 conformado por 18 aminoácidos: Gly Tyr Tyr Tyr Pro Ser Asp Pro Asn Thr Phe Thr Ala Pro Pro Tyr Ser Ala; y KETc12 por 8 aminoácidos: Gly Asn Leu Leu Leu Ser Cys Leu Gly. La vacuna que los conjunta se denomina S3Pvac (Huerta y col., 2002).

En el caso del uso de la vacuna contra *T. solium*, se logró reducir la prevalencia en un 52.6% y la intensidad de la infección con cisticercos viables en un 97.9%, esto fue observado en un estudio de campo en 2 comunidades rurales del Estado de Puebla en cerdos que se infectaron de manera natural con *T. solium* (Huertay col., 2002).

Al evaluar la respuesta inmunológica que induce la vacuna S3Pvac en el modelo del ratón contra *T. crassiceps* se encontró una respuesta de tipo Th1. En el cerdo, las células mononucleares de animales infectados con *T. solium* expresaron citocinas IL-2 e INF- γ , también se observó la secuencia de los mismos péptidos insertada en un fago filamentoso, esta mostró tener la capacidad de incluir una respuesta tanto Th1 como Th2 (Díaz y col., 2003; Manoutchariany col., 2004).

Th1 y Th2 son subpoblaciones de células T cooperadoras. Los linfocitos Th1 secretan interferón γ (INF- γ), interleucina 2 (IL-2) y factor de necrosis tumoral beta (TNF- β); estas citocinas participan en la activación de macrófagos y en la hipersensibilidad retardada, las células Th1 actúan en primer término como células auxiliares para las respuestas inmunitarias mediadas por células. Por su parte, los linfocitos Th2 producen IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, e IL-13, cooperando con la respuesta inmune humoral a través de la proliferación de linfocitos B y del cambio de inmunoglobulinas E (IgE) e IgG (en ratón) o IgG4 (en humanos);(López-Moreno, 2002).

Se ha sugerido que la respuesta Th1 ejerce control en la infección por el cisticerco de *T. crassiceps* (Villa y Kuhn, 1996; Terrazas y col., 1998). También se ha encontrado que la respuesta protectora inducida con la inmunización con DNA está mediada por linfocitos T productores de IL-2 e IFN- γ (Cruz-Revilla y col., 2000).

Recientemente, se han expresado los epitopes vacunales GK1, KETc1, y KETc12 en la superficie de proteínas de fagos filamentosos (Manoutcharian y col., 2004) y en planta transgénica de la papaya (Hernández y col., 2007), obteniendo resultados que indican que en las diferentes presentaciones, los péptidos mantienen su capacidad protectora. Estas nuevas formas de presentación de la vacuna son de gran interés por tener un bajo costo de producción (S3Pvac fago) y además ser el vehículo ideal para la administración oral de la vacuna la versión expresada en plantas.

Varias especies de céstodos (*T. taeniaformis*, *T. crassiceps*, *T. ovis*, *T. saginata*, *T. solium* y *T. solium*) han sido usadas para el desarrollo de vacunas basadas en antígenos derivados de oncosferas (Richard y Williams, 1982, Lightowlers, 2003).

T. ovis fue el primer parásito de esta especie en el cual se desarrolló una vacuna de antígenos recombinantes (Richard y Williams, 1982).

En 1930, mediante un estudio de *T. taeniaformis*, parásito céstodo también conocido como cisticercos *fasciolaris*, se estableció que es posible tener un alto

nivel de protección contra la infección en el hospedero intermediario por vacunación utilizando una variedad de antígenos (Miller, 1931; Kan, 1934; Campbell, 1936).

Los primeros ensayos de vacunación contra *T. solium* se realizaron empleando extractos crudos de cisticercos de *T. solium*. Un estudio de campo evaluó en dos comunidades del Estado de Guerrero, administrando dosis de 150 µg, vía intramuscular a cada cerdo, los resultados mostraron 12 meses después de la inmunización la frecuencia de infecciones porcinas disminuyó de 4.8% y 5.4% a 0%, lo cual indica que la vacuna induce inmunidad protectora (Molinari y col., 1983; Molinari y col., 1997).

Entre los candidatos vacunales contra *T. solium* originalmente se utilizaron antígenos de *T. ovis* y *T. saginata*, estos fueron evaluados en condiciones experimentales en contra de la cisticercosis porcina con resultados alentadores (Larralde y col., , 1989; Nascimento y col., 1995); otro antígeno de interés es el HP6 , el cual fue identificado en *T. saginata* y fue capaz de inducir altos niveles de protección en contra de la cisticercosis en vacas, este antígeno fue identificado también en *T. solium* (Harrison y col., 2002) e induce protección en ratones contra la cisticercosis murina (Rosas y col., 2002).

Los grupos de investigadores europeos y australianos se interesaron en identificar proteínas individuales provenientes de oncósferas, estadio que se considera más

vulnerable a la inmunidad. En principio el interés era desarrollar una vacuna contra la cisticercosis causada por *T. ovis*, que aunque no es una zoonosis si causaba importantes pérdidas económicas en Australia y Nueva Zelandia. Se identificó inicialmente la proteína *T. ovis*45 que constituyó la primera vacuna recombinante y efectiva contra cisticercosis en particular contra la cisticercosis ovina (Johnson y col., 1989, Lightowlers, 2006). Posteriormente, se identificó en una biblioteca genómica de *T. saginata* utilizando el anticuerpo monoclonal HP6 y se le asignó el mismo nombre (Gonzalez y col., 2011). Científicos australianos identificaron su homólogo en *T. solium* y le asignó el nombre de Tso18. *Tsol18* fue clonado a partir de RNA mensajero, expresados en *Escherichia coli*, purificado y evaluado en ensayos de vacunación contra la infección en *T. ovis*, *T. saginata* y *T. solium* con resultados muy alentadores (Harrison y col., 1993; Harrison y col., 1996, Caiy col., 2008, Assanay col., 2010). Otro reporte realizado por Flisser y col. (2004) evaluaron TSOL18 y TSOL45, antígenos de oncosferas de *T. solium* generando 99.5% y 97.1% de protección, respectivamente, contra la cisticercosis porcina (Flisser y col., 2004, Assana y col., 2010).

Otro candidato para el desarrollo de una vacuna contra la cisticercosis porcina es la paramiosina de *T. solium*, esta proteína constituye uno de los antígenos de *T. solium* reconocidos con mayor frecuencia por los anticuerpos de pacientes con neurocisticercosis. Se trata de una proteína de 863 aminoácidos con alto contenido en residuos polares y una estructura secundaria de alfa hélice en más de 95% de la secuencia de aminoácidos y forma parte de la musculatura lisa de

invertebrados (Solís y col., 2004). Lacleite y col., (1992) demostraron que esta proteína se une al colágeno e inhibe la cascada del complemento, bloqueando así la función de su primer componente, el C1. Solís y col (2004) demostraron que la paramiosina secretada por el cisticerco de *T. solium* impide la activación de la cascada del complemento e inhibe la producción de otros mediadores de inflamación en la vecindad del parásito; desempeña, pues, un papel inmunomodulador al disminuir el reclutamiento de células hacia la interfase para evitar la confrontación con su huésped humano o porcino. A pesar de los primeros resultados alentadores, esta proteína no resultó inducir los niveles de protección adecuados para prevenir eficientemente la cisticercosis.

1.3 *Taenia pisiformis*

1.3.1 Características morfológicas

El parásito *T. pisiformis* en su fase adulta, presenta un cuerpo aplanado y una longitud de dos metros aproximadamente, carece de un tubo digestivo y presenta escólex, cuello y estróbilo también llamado cuerpo.

El escólex posee un diámetro de 1.3 mm, una doble corona de ganchos y cuatro ventosas. El estróbilo está formado por proglótidos inmaduros, maduros y grávidos que se encuentran en la región germinal situada en la parte inferior del escólex. Los segmentos que se localizan cercanos al cuello son inmaduros, no tienen

órganos sexuales desarrollados; cuando se desarrollan y se diferencian se alejan del escólex (Flisser y col., 2006; Quiroz, 2003).

La *Tenia* es un parásito hermafrodita. Los proglótidos más alejados del escólex muestran un útero grávido ramificado, y se encuentran llenos de huevos en su interior. Los proglótidos grávidos son eliminados junto con las heces y conforme se van expulsando proglótidos grávidos se van gestando otros nuevos en el cuello (Flisser, y col ., 2006; Quiróz, 2003).

Los huevos de *T. pisiformis* son esféricos y presentan una apariencia radial, en su interior contienen una oncosfera. La oncosfera posee envolturas que la protegen; una de ellas es llamada embrióforo. Una vez ingerida por el conejo, la oncosfera se convierte en la forma larvaria, metacéstodo o también llamado cisticerco.

El cisticerco se encuentra en la cavidad abdominal de conejos y liebres es una vesícula ovoide de 6 a 12 mm de largo por 4 a 6 mm de ancho, con una pared delgada y translúcida (Quiróz, 2003). En el cuadro 1 se observa la clasificación taxonómica de *T. pisiformis*.

1.3.2 Ciclo biológico de *T. pisiformis*

T. pisiformis que infecta al conejo doméstico y a las liebres silvestres (Quiroz, 1999), necesita para su ciclo de vida de huéspedes definitivos como son el perro (*Canis familiaris*) o zorro (*Vulpes sp*), que desarrollan al céstodo adulto o gusano aplanado. Este céstodo es capaz de producir en cada proglótido grávido cientos a miles de huevos, (Dunn,1983), de color ámbar y que miden de 30 a 40 μm de diámetro semiesférico y poseen varias envolturas que le permiten al embrión

sobrevivir en el medio ambiente (Quiroz, 1999). El céstodo adulto se encuentra localizado en el intestino delgado del huésped definitivo y es eliminado con las heces, contaminando el ambiente (Soulsby, 1987).

Cuando la liebre o el conejo consumen dichos huevos y estos eclosionan, migran a distintos tejidos como es el hígado, mesenterio y cavidad peritoneal (Flatt y Moses, 1975; Quiroz, 1999; Percy, 2001); en estos dos últimos sitios anatómicos es donde se desarrolla la fase de metacéstodo, la cual presenta estructuras tales como un escólex invaginado y un saco materno que lo envuelve presentando una apariencia que semeja a una vesícula (Cordero, 1999).

El ciclo se completa cuando los carnívoros se alimentan de los metacéstodos de *T. pisiformis* contenidos en la cavidad peritoneal (Flatt y Moses, 1975; Quiroz, 1999; Percy 2001).

En la infección con huevos de *T. pisiformis* se ha observado que existen lesiones a nivel hepático desde el día 2 pos infección y que la fase de metacéstodo se desarrolla de 15 a 30 días post infección (Flatt y Moses, 1975)

Por las características de su ciclo biológico, tanto la *T. pisiformis* como la *Taenia crassiceps* (*T. crassiceps*) se han empleado como modelos de estudio de la teniosis cisticercosis por *Taenia solium* (*T. solium*), por lo que son de gran utilidad en la investigación biomédica (Craig, 1988; Terrazas, 2005; Jiménez y col., 2006)

1.3.3 Epidemiología de la cisticercosis cunícula

Datos epidemiológicos en conejos salvajes de las islas de Canarias, muestran una prevalencia de infecciones por *T. pisiformis* del 8.8 al 30.4%, los cisticercos se encontraron en mesenterio y también en lesiones de hígado (Foronday col., 2003).

Flat y Cambell, en 1974 refieren la frecuencia en Estados Unidos de infecciones por *T. pisiformis* en 17,354 conejos, que fue del 6.9% (1,201 conejos), también describen las lesiones hepáticas en conejos por la infección con *T. pisiformis* que es caracterizada por inflamación granulomatosa.

En México se desconoce la frecuencia de esta infección sin embargo, se ha referido que los conejos son alimentados con forrajes, desperdicio de verduras y agua (López y col., 1999) que pudieran estar contaminadas, otro aspecto de interés es que la cunicultura se desarrolla en condiciones de traspatio incluso en zonas urbanas, donde existe la presencia de perros portadores de *T. pisiformis* (Eugia-Aguilar y col., 2005).

1.3.4 *T. pisiformis* como modelo de estudio para la evaluación de antígenos vacunales

Existen pocos estudios sobre la cestodiasis provocada por *T. pisiformis*. Al respecto de la prevención se ha reportado que es factible prevenirla por

vacunación con antígenos oncosferales, así como con antígenos de secreción de los cisticercos, han demostrado inducir altos niveles de protección contra la fase larvaria (Craig and Zumbuehl, 1988). Respecto la inmunidad que se genera en contra del parásito en su fase larvaria, hay que destacar que existen pocos reportes, en donde se señala la posible relevancia de los anticuerpos en la infección (Rickard and Outteridge, 1974; Kyngdon y col., 2006), también se han encontrado anticuerpos asociados a antígenos de superficie del estado larvario del parásito (Craig y col., 1988).

El disponer del ciclo completo de *T. pisiformis* permite considerarlo como un candidato adecuado para evaluar diferentes antígenos vacunales y formas de administración para la prevención de la fase intestinal y larvaria del parásito. Además del interés como modelo experimental, es necesario considerar la *T. pisiformis* constituye un problema sanitario para cunicultores poco tecnificados y es causante de pérdidas económicas por decomiso de hígados en rastro (Essain, 1997). Además hay que considerar que el metacéstodo de *T. pisiformis* presenta ventajas de no infectar al humano y parasitar a conejos únicamente, que son de más fácil manejo que otros animales como el cerdo. (López-Moreno, 2002).

Al evaluar las vacunas desarrolladas en el Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM (S3Pvac, fago filamentoso y planta transgénica), se podrá conocer el efecto que estas tengan sobre la cisticercosis en conejos causada por *T. pisiformis* y así consolidar el uso de vacunas recombinantes contra diversas cestodiasis como la cisticercosis por *T. solium* y *T. saginata* entre otras.

2. HIPÓTESIS

La vacunación con los diferentes candidatos vacunales (S3Pvac, S3Pvac Fago y S3Pvac Papaya) es capaz de reducir la carga parasitaria en conejas domésticas infectadas con huevos de *T. pisiformis*.

3. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la capacidad protectora de los diferentes candidatos vacunales (S3Pvac, S3Pvac Fago y S3Pvac Papaya) en contra de la cisticercosis ocasionada por *Taenia pisiformis* en conejas domésticas.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Identificar al cestodo adulto de *T. pisiformis* a través del estudio de secuencias en el ADN mitocondrial.
2. Localizar la presencia de los péptidos vacunales GK-1, KETc1 y KETc12 en los estadios de huevo, larva y adulto de *Taenia pisiformis*.
3. Evaluar los efectos sobre la carga parasitaria de los tres candidatos vacunales (S3Pvac, fago filamentoso y planta transgénica) en conejas domésticas infectadas con huevos de *T. pisiformis*
4. Evaluar histológicamente la respuesta inflamatoria causada por el parásito en los hígados, en animales vacunados y no vacunadas.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Animales

Se emplearon 96 hembras de la raza Nueva Zelanda (*Oryctolagus cuniculus*) con un peso inicial promedio de 3.2 ± 0.2 kg. Las conejas fueron mantenidas en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM) y los experimentos se llevaron a cabo siguiendo las leyes para el cuidado y uso de animales de laboratorio (Institute of Laboratory Animals Resources, National Council, Washington, DC. 1996). Este experimento fue aprobado por el comité de ética de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM. Se formaron 4 grupos de forma aleatoria conformado por 24 conejas cada uno, un grupo fue solamente inoculado con solución salina fisiológica (SSF), un grupo con la vacuna Sintética-S3Pvac, otro grupo con la vacuna S3Pvac-fago y un último grupo con la vacuna S3Pvac-Papaya.

5.2 Parásitos

El céstodo adulto de *T. pisiformis* se obtuvo a partir de tres intestinos de un total de 150 perros adultos que fueron sacrificados de manera humanitaria en el Centro de control canino de la delegación de Tláhuac, D.F. Después de practicar un corte longitudinal, cada intestino fue inspeccionado para buscar a la tenia en el lumen intestinal (Betancourt y col., 2011). Los céstodos adultos de *T. pisiformis* se identificaron tomando en cuenta características morfológicas como la apariencia macroscópica de los proglótidos, la posición del poro genital y el escólex (Edwards and Herbert 1981). Los parásitos que presentaron estas características

morfológicas fueron utilizados para realizar la identificación de la especie a través del análisis de su ADN (Gassery col., 1999; Edwards and Herbert, 1981). Algunos proglótidos grávidos fueron conservados en etanol a 4°C y en solución de Zamboni para llevar a cabo la purificación de DNA y la inmunolocalización de los antígenos de la vacuna respectivamente.

5.3 Identificación de *T. pisiformis*

5.3.1 Extracción del ADN

Para obtener ADN genómico de los tejidos se empleó el kit genomic prep kit (Wizard® Genomic DNA Purification Kit) siguiendo el protocolo recomendado por Rassi et al. 2010.

5.3.2 Identificación molecular del cestodo adulto de *T. pisiformis*.

Para amplificar el gene ND1 (NADH deshidrogenasa subunidad I) de *T. pisiformis*, mediante la Reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se utilizaron los primers JB11(5'-AGATTCGTAAGGGGCCTAATA-3') y JB12 (5'-ACCACTAACTAATTCACTTTC-3') (Gasser *et al* 1999). La reacción de PCR (25µl) se llevó a cabo en 3.5 mM de MgCl₂, 250µM de cada dNTP, 25pmol de cada primer y 1U de *Taq* polimerasa (Go *Taq*, promega), se utilizaron 20 nanogramos de DNA genómico para cada reacción. Se utilizó un termociclador de la marca Eppendorf (Hamburgo, Alemania) y las condiciones de amplificación fueron las siguientes; la desnaturalización inicial se realizó a 94° C por 5 min.

Posteriormente se dieron 30 ciclos a 94°C por 30s (desnaturalización), el alineamiento fue a 55 ° C por 30s, la extensión a 72° C por 30s, por 35 ciclos, seguida de una extensión final a 72° C por 5 min.

En cada reacción de PCR se incluyó un control negativo y los productos amplificados fueron corridos en un gel de agarosa al 2% a 85 volts durante 40 min. El gel se tiñó con bromuro de etidio y se visualizó y fotografió en un transiluminador de luz UV.

Los productos de PCR que presentaron un peso molecular de 476 pb (peso esperado) (Gasser et al. 1999), fueron cortados y purificadas utilizando QIAEX II kit (Qiagen), y la secuencia se obtuvo por medio del secuenciador ABI PRISM 310 Genetic Analyzer PE® Modelo 3730 en el Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

La secuencia de aminoácidos se alineó utilizando el programa ClustalW/X2.0 (Notredame *et al* ,2000), así como el programa BLAST (Altschul *et al* , 1990).

5.4 Inmunolocalización de los péptidos de la vacuna S3Pvac

Se utilizaron anticuerpos anti-Ketc1, anti-Ketc12 y antiGK1, los cestodos de *T. pisiformis* fueron fijados en solución de Zamboni y posteriormente se incluyeron en parafina siguiendo el procedimiento realizado por Rosas et al 2002). Los cortes se

incubaron con el respectivo anticuerpo (anti-Ketc1, anti-Ketc12 y antiGK1) en una dilución 1:4000 en PBS-BSA 1% durante una hora a 37°C. Se utilizaron sueros de conejos no estimulados inmunológicamente para el control negativo, los controles positivos fueron sueros de ratones infectados con *T. crassiceps*. Posteriormente los cortes se incubaron con un anticuerpo biotinilado de cabra anti-conejo (MP Biomedicals, USA) por 30 min. a 37°C, esto fue seguido por una incubación con estreptovidina-peroxidasa (MP Biomedicals, USA) durante una hora a temperatura ambiente.

La actividad de la peroxidasa fue visualizada mediante la incubación de las muestras con 3´3- diaminobenzidina (DAB-Plus Kit, Zymed, South San Francisco, CA), los tejidos fueron contrateñidos con hematoxilina, posterior a su montaje se procedió a visualizar al microscopio óptico (Nikon) usando el programa analizador de imágenes Metamorph 4.5.

5.5 Ensayo de viabilidad de huevos de *T. pisiformis*

La viabilidad de los huevos obtenidos de los tres ejemplares de *T. pisiformis* confirmadas por el análisis molecular, se evaluó con azul de tripano siguiendo la técnica descrita por Wang et al. 1997.

Los huevos se cuantificaron en una cámara de Neubauer, la dosis infectante fue de 3000 huevos viables por coneja (Worley 1974). La infección por vía oral se realizó a través de una sonda estéril flexible. Previamente se tranquilizaron los

animales con una dosis de 30-40 mg/Kg de ketamina, administrada por vía intramuscular.

5.6 Vacunas

La vacuna sintética-S3Pvac incluye a los péptidos GK1 (69 a 85 péptidos obtenidos de Ketc7) (Toledo *et al*, 1999) y los péptidos Ketc1 y Ketc12 (Toledo *et al*, 2001). Los 3 péptidos fueron sintetizados por AnaSpec Inc.

La vacuna S3Pvac-fago se elaboró utilizando un fago filamentoso recombinante en el cual se expresaron los péptidos Ketc7, GK1, Ketc1 y Ketc12, el fago fue inactivado con formaldehído (Manoutcharian y col., 2004; Morales y col., 2008).

La vacuna S3Pvac-papaya fue preparada combinando tres clonas de embrión de papaya conocidas como pKetc126, pketc1, y pKetc723, las cuales expresaron los péptidos Ketc12.6His, Ketc1.6His y Ketc7 respectivamente, las clonas fueron liofilizadas y almacenadas a 4°C hasta su uso (Hernández y col., 2007).

Se formaron 4 grupos de forma aleatoria, conformado por 24 conejas cada uno, un grupo fue solamente inoculado con solución salina fisiológica (SSF), y el resto fue inmunizado dos veces con siete días de diferencia. Un grupo fue inmunizado con la vacuna Sintética-S3Pvac, otro grupo con la vacuna S3Pvac-fago y un último grupo con la vacuna S3Pvac-Papaya. Posteriormente, 15 días después de la

última inmunización, los cuatro grupos fueron infectados con huevos de *T. pisiformis*. Doce conejas de cada grupo fueron sacrificadas siete días después de la infección y el resto se sacrificó 2 semanas después.

5.7 Inmunizaciones

Las inmunizaciones se realizaron por dos vías, dependiendo del tipo de vacuna a utilizar, la sintética-S3Pvac y la S3Pvac-fago fueron administradas por vía subcutánea. Un total de 45µg (15µg de cada péptido) en el caso de la vacuna sintética y la concentración de 6×10^{11} para la vacuna S3Pvac fago por coneja. Estas concentraciones se manejaron en un volumen de 200µl para cada inmunización (Morales y col., 2008).

Para la inmunización oral con la vacuna S3Pvac papaya se utilizó una suspensión de 60 mg cada clona de papaya que expresó la vacuna (Ketc1, Ketc12 y Ketc7), dicha suspensión se introdujo en capsulas y de esta manera fue administrada a los conejas.

Las conejas del grupo control se les administró únicamente 200µl de Solución salina fisiológica (SSF) por cada coneja.

No se utilizaron adyuvantes en ninguna de las inmunizaciones.

5.8 Infección de los grupos experimentales

Con una sonda estéril flexible se procedió a infectar por vía oral a los animales que formaron los grupos de estudio para evaluación de la vacuna, al resto de conejas se les aplicó el mismo procedimiento pero únicamente se les administró SSF. Los animales, previo a la infección, se tranquilizaron utilizando ketamina (30-40mg/Kg.) por vía IM. En todos los casos se tuvo especial cuidado de verificar mediante la palpación que la sonda se encontraba en el estómago (Betancourt, 2011). La dosis infectante por conejo fue de 3,000 huevos con un porcentaje del 90% de viabilidad (Betancourt, 2011).

5.9 Necropsias y estudio histológico

Las necropsias se llevaron a cabo a los 7 y 21 días postinfección. Las conejas se tranquilizaron con ketamina con una dosis de 30-40 mg/kg por vía intramuscular y se sacrificaron con una sobredosis de pentobarbital sódico (100mg/Kg) por vía intracardiaca. Se llevaron a cabo registros de la presencia de cisticercos vesiculares y de lesiones hepáticas. Se tomaron muestras de tejido hepático y se fijaron en formalina amortiguada al 10%, se procesaron conforme a la técnica de inclusión en parafina y se llevaron a cabo cortes seriados con un micrótopo de parafina de 6-8 μm de grosor. Para la descripción de la respuesta inflamatoria hepática, los cortes fueron teñidos con hematoxilina/eosina de acuerdo a Aluja y Vargas (1998). Para determinar la cantidad de linfocitos y macrófagos en los

granulomas encontrados se utilizó la técnica de cuantificación de linfocitos y macrófagos reportada por Rosas y col., 2007.

5.10 Análisis estadístico

El análisis estadístico se llevó a cabo usando el programa Graphpad versión 4.0. El análisis del número de metacestodos y de lesiones entre grupos se llevó a cabo utilizando una prueba no paramétrica de Mann-Whitney, valores menores a 0.05 fueron considerados estadísticamente significativos. Las diferencias entre el número total de conejos protegidos y el porcentaje de macrófagos y linfocitos encontrados en las lesiones hepáticas fueron analizadas utilizando la prueba de Fisher (valores significativos $P < 0.05$).

6. Resultados

6.1 Identificación de *T. pisiformis*

La confirmación de la especie de los tres cestodos adultos identificados macroscópicamente como *T. pisiformis* fue obtenida mediante un análisis molecular. El número de pares de base (pb) reportado por Gasser *et al.* para *T. pisiformis* es de 476 pb para el gen NADH subunidad 1; los tres cestodos coincidieron con el número de pares de base reportados (Fig. 1A). Se realizó un análisis de homología a través de la herramienta bioinformática Blast mostrando una homología del 87% con la reportada en Genbank para el gen antes mencionado (Fig. 1B).

6.2 Inmunolocalización

Se realizó la inmunolocalización de los antígenos vacunales en el gusano adulto y en las oncosferas. Para GK1, se encontró que se expresaba en el microtix, en el citoplasma perinuclear y en los músculos longitudinales del gusano adulto. En el caso de la oncosfera no se encontró expresión de este antígeno.

Se encontró que Ketc1 también tiene una distribución en el gusano adulto, expresándose en el microtix, citoplasma distal, citoplasma perinuclear, músculos longitudinales y ovarios. Al igual que GK1, Ketc1 no se expresa en las oncosferas de *T. pisiformis*.

Ketc12 solo fue localizado en inclusiones lipídicas y en ovarios en el gusano adulto, en el caso de las oncósferas este fue el único péptido que se expresa en esta fase (Fig. 2).

6.3 Lesiones hepáticas

En el cuadro 2 se observa el número de lesiones hepáticas encontradas en los grupos control (sin inmunizar) y en los grupos inmunizados. Las tres diferentes versiones de la vacuna redujeron significativamente el número de lesiones hepáticas; se observó una tendencia similar tanto a los siete días como a los 21 días postinfección. La vacuna S3Pvac fago fue la que mostró un nivel más bajo de protección comparado con las otras dos versiones, pero las diferencias entre vacunas no mostraron diferencia significativa (Cuadro 2).

La figura 3 muestra las lesiones hepáticas encontradas en el grupo control y los tres grupos de vacuna a los 21 días postinfección, se observan las lesiones características producidas por migraciones parasitarias conocidas como granulomas o manchas de leche.

6.4 Número de metacéstodos

El cuadro 3 muestra el número de metacéstodos encontrados en cavidad abdominal en los grupos control e inmunizados a los 7 y 21 días postinfección. Las tres versiones de la vacuna disminuyeron significativamente el número de metacestodos establecidos en conejas infectadas. Se encontró un incremento en el porcentaje de conejas sin metacéstodos en la cavidad abdominal (69 a 98%) en las conejas inmunizadas, no se observaron cambios en esta tendencia en los diferentes tiempos de duración de los experimentos.

La vacuna S3Pvac fago mostró la menor protección aunque no existió diferencia significativa entre los otros grupos de vacuna (Cuadro 3).

En la figura 4 se observa la carga parasitaria entre el grupo control y los animales inmunizados tanto a los 7 días como a los 21 días; en el caso de los grupos de vacuna la presencia del parásito fue menor o en algunos casos este no se encontró.

6.5 Respuesta inflamatoria local

La figura 5 muestra la proliferación del tejido fibroso con infiltrados de linfocitos en los tres grupos de vacuna a los 21 días postinfección (40x). A los 7 días postinfección, el número de linfocitos y macrófagos fue tres veces mayor que en los del grupo control (**P<0.001). Esta tendencia continúa hasta los 21 días postinfección. Las diferentes versiones de la vacuna incrementaron

significativamente el número de linfocitos y macrófagos a los 7 y 21 días postinfección (Fig 6, ***P<0.001).

También se encontraron granulomas típicos parasitarios en conejas del grupo control y en algunas conejas de los grupos inmunizados; se contó el número de linfocitos y macrófagos que se encontraban en la periferia del granuloma; algunos granulomas mostraron restos del parásito en el centro. Las lesiones presentaron áreas necróticas que contenían hepatocitos y macrófagos, así como fragmentos parasitarios (10x). El área necrótica presentó en su periferia células epiteloides con células gigantes multinucleadas.

7. Discusión

En este trabajo de tesis documentamos la capacidad protectora de la vacuna S3Pvac en sus tres diferentes versiones (sintética, fago, planta transgénica) en contra de una infección experimental por *T. pisiformis* en conejas domésticas.

En este proyecto la identificación de *T. pisiformis* se realizó mediante un análisis molecular amplificando el gen NADH subunidad 1 (ND1); la identificación morfológica de estos parásitos ha sido el método tradicional utilizado para su clasificación; estos criterios presentan limitantes, pueden ser variables y poco fidedignos (Gasser y col 199). La visualización en gel de agarosa del gen ND1 de *T. pisiformis* mostró un tamaño de 474pb, este tamaño coincide con el número de pb reportado por Gasser (1999) para el mismo parásito. La secuencia reportada en Genbank para este parásito coincide en un 87%, dicha variabilidad encontrada respecto al trabajo publicado por Gasser *et al* 1999 puede asociarse a que las tenias en el trabajo de Gasser fueron obtenidas de Australia, mientras que la tenia de este trabajo es de México; existen reportes de esta variabilidad entre individuos de la misma especie de este parásito (Haag K, 2008).

Para validar el uso de las tres versiones de la vacuna S3Pvac en contra de *T. pisiformis*, se procedió a identificar la presencia de los péptidos vacunales en el estadio de oncósfera y de cestodo adulto de *T. pisiformis*. Trabajos previos han reportado la presencia de estos péptidos en diferentes cestodos (Toledo, 2001;

Rassi, 2010). En este trabajo se evidenció la presencia de estos péptidos vacunales en la oncósfera y en el cestodo adulto, por lo que valida el uso de la vacuna que originalmente fue desarrollada en el modelo de *T. crassiceps* y evaluada en campo en contra de *T. solium* para su aplicación en otro cestodo como *T. pisiformis*.

La ventaja de utilizar este modelo es que las infecciones se pueden realizar por la vía de entrada natural del parásito; esto permite la consolidación y mejoramiento de vacunas contra *T. solium* de una manera económica y utilizando animales de fácil manejo que no requieren espacios amplios para su alojamiento.

En el caso de *T. pisiformis*, este es el primer estudio que se realiza para conocer la capacidad protectora de las tres versiones de la vacuna S3Pvac. Se tiene conocimiento de la similitud antigénica en algunos cestodos (Toledo y col., 1999; Toledo y col., 2001) Esta inmunidad cruzada encontrada en los resultados de este trabajo es congruente con lo reportado en trabajos previos (Sciutto 2011). Donde se han utilizado vacunas originadas en un cestodo y que estas pueden generar protección en contra de otros.

La descripción de las lesiones hepáticas coincide con las reportadas por Aluja y Vargas (1988) donde se observan infiltraciones por linfocitos, macrófagos, células gigantes, zonas de necrosis. Las lesiones hepáticas encontradas se asocian a granulomas parasitarios (Flatt y Campbell, 1974). Los resultados obtenidos en la disminución de las lesiones hepáticas demuestran que las diferentes versiones de

la vacuna probadas en este trabajo tuvieron la capacidad de reducir la formación de estos granulomas parasitarios. Así mismo, en el caso del número de metacestodos, estos se redujeron significativamente respecto al grupo control.

En los tejidos de los animales vacunados, se observó un aumento en el grado de inflamación, lo que probablemente se deba a un efecto promotor de la vacuna S3Pvac en sus diferentes versiones sobre la respuesta inmune, como se ha descrito anteriormente por Huerta y col. (2000), lo que favorece el incremento de la reacción inflamatoria y la destrucción del parásito. Se sabe que en este tipo de respuesta inflamatoria las citosinas tienen una participación importante, por ejemplo la proliferación de linfocitos T, la diferenciación de linfocitos B en células plasmáticas, productoras de IgE, la proliferación de eosinófilos es promovida por IL-4, IL-6 e IL-5 (Chavarria y col. , 2003), también se sabe que la asociación entre el número de células que expresan IFN- γ y la inflamación en animales vacunados , es posible que esta citosina contribuya en la activación de los macrófagos, favoreciendo la destrucción rápida del metacestodo.

La síntesis de esta citocina nos permite proponer que la respuesta inmunológica es de tipo Th2, concordando con lo que ya se ha reportado, que la respuesta inmune frente a infecciones por helmintos es de este tipo. (Rumbley y col., 1999; Abbas and Lichtman, 2004).

Los resultados de protección obtenidos en este estudio demuestran que las vacunas contra la cisticercosis S3Pvac (en sus tres versiones), inducen respuesta protectora contra el parásito *T. pisiformis* en conejos. Dicha protección se observó en conejas sacrificadas a los 7 días postinfección y a los 21 días postinfección. Se observó que las tres versiones de la vacuna (sintética-S3Pvac, S3Pvac-fago y S3Pvac-papaya) tuvieron la capacidad de reducir el número de lesiones hepáticas y el número de metacéstodos.

Es importante destacar que las propiedades protectoras de la vacuna no solo dependen de las propiedades inmunoinflamatorias de los sistemas de expresión empleados (Fago filamentoso y callo de papaya transgénica), ya que también se observó un nivel alto de protección en conejas inmunizadas con la vacuna sintética-S3Pvac que carece de adyuvantes.

En el caso de la vacuna S3Pvac-papaya este trabajo es el primero en demostrar su elevado nivel de protección utilizando una vacuna oral contra un huésped natural de una parasitosis provocada por una tenia. Esta vía de administración oral de la vacuna S3Pvac-papaya nos confiere una ventaja ya que elimina el uso de jeringas y agujas para inmunizar a los animales, también disminuye costos y sobre todo facilita el manejo de los animales para campañas de vacunación masivas contra *T. solium*, *T. saginata* o *T. pisiformis* (Sciutto y col., 2007)

La vacuna S3Pvac-fago fue la que generó una menor protección respecto a las vacunas S3Pvac-sintética y S3Pvac-papaya; hay que destacar no existieron

diferencias significativas entre grupos de vacunas ($P>0.05$), por lo que es viable utilizar la vacuna S3Pvac-fago en campo ya que su costo es menor (0.5 U.S.D. por dosis) respecto a la vacuna S3Pvac-sintética (Sciutto y col. 2007).

Las ventajas de utilizar plantas transgénicas dentro de un sistema de elaboración de vacunas nos permite almacenarlas a temperatura ambiente sin necesidad de refrigerarlas para su transporte (no requiere de la cadena fría), el consumo directo de la planta no requiere la purificación del antígeno, se evita el uso de agujas y jeringas y por consecuencia disminuye el estrés en los animales sujetos a vacunación, los antígenos vacunales que se encuentran en la planta son resistentes a la degradación enzimática durante su paso por el tracto gastrointestinal y esto favorece la inducción de una respuesta inmunológica a nivel de mucosas, por último se pueden incrementar los programas de vacunación masiva en los animales ya que la administración por vía oral de estas vacunas facilita el manejo de los animales para su administración (Dus Santos & Wigdorovitz 2005, Daniell 2006, Floss y col., 2007).

Durante las últimas dos décadas se han realizado diversos estudios sobre el desarrollo de vacunas expresadas en plantas transgénicas en el área de la Medicina Veterinaria, se han evaluado de manera experimental vacunas para enfermedades virales, bacterianas y parasitarias que afectan al bovino, perro, cerdo, aves de postura y conejo, las cuales producen protección al individuo inmunizado (Floss, 2007).

Respecto al uso de *T. pisiformis* como modelo adecuado para evaluar diferentes antígenos vacunales y formas de administración de los mismos, este trabajo constituye una evidencia experimental de la efectividad de la vacuna S3Pvac en sus tres diferentes versiones, ya que hubo protección en las conejas inmunizadas, así mismo se propone estudiar los mecanismos de protección que induce esta vacuna para proteger contra esta parasitosis.

Conclusiones

1. Los péptidos vacunales Ketc1, Gk-1 y Kect12 se identifican en el cestodo adulto y en las oncósferas de *T. pisiformis*.
2. Las tres versiones de la vacuna S3Pvac inducen protección contra el parásito *T. pisiformis*.
3. La vacuna S3Pvac fago genero una menor protección respecto a las otras dos versiones de la vacuna, la diferencia no fue significativa.
4. Los linfocitos y macrófagos tienen una participación relevante en la respuesta inflamatoria local al incrementarse su población por efecto de la vacuna en sus tres diferentes versiones.
5. La identificación molecular es una herramienta útil para clasificar las diferentes especies de tenias que infectan al perro.

8. Referencias

Abul, A. Inmunología Celular y Molecular. Ed. Elsevier Science. 2004. 359-366. 5.

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. J Mol Biol 1990; 215: 403-410.

Assana E, Amadou F, Thys E, Lightowlers MW, Zoli AP, Dorny P et al. Pig-farming systems and porcine cysticercosis in the north of Cameroon. J Helminthol 2010;25: 1-6.

Baron C, Coombes B: Targeting bacterial secretion systems: Benefits of disarmament in the microcosm. Infect. Disord. Drug Targets 2007; 7, 19–27.

Betancourt-Alonso MA, Orihuela, A , Aguirre V , Vázquez R, Flores-Pérez FI. Changes in behavioural and physiological parameters associated with *Taenia pisiformis* infection in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) that may improve early detection of sick rabbits. World Rabbit Science 2011 19:21-30.

Boa M, Mukaratirwa S, Willingham AL, Johansen MV. Regional action plan for combating *Taenia solium* cysticercosis/taeniosis in Eastern and Southern Africa. Acta Trop 2003;87: 183-186.

Cai, X; Chai, Z; Jing, Z; Wang, P; Luo, X; Chen, J; Duo, Y; Feng, S; Jin, C. Studies on the development of DNA vaccine against *Cysticercus cellulosae* infection and its efficacy. Southeast Asian J Trop. Med. Publ. Health. 2001.32. S: 105-110.

Campbell D.H. Active immunizations of albino rats with protein fractions from *Taenia taeniaformis* and larval form *cysticercus fasciolaris*. Am. J Hyg. 1936.23:104-113.

Chavarría A, Roger B, Fragoso G, Tapia G, Fleury A, Dumas M, Dessein A, Larralde C, Sciutto E. TH2 profile in asymptomatic *Taenia solium* human neurocysticercosis. Microbes Infect. 2003 Oct;5(12):1109-15.

Craig PS, Zumbuehl O. Immunization against experimental rabbit cysticercosis using liposome-associated antigen preparations. J Helminthol 1988;62:58-62.

Craig PS. Surface-associated proteins and host IgG on early and late metacestode stages of *Taenia pisiformis*. Parasite Immunol. 1988;10:243-254.

Cruz-Revilla, C; Rosas, G; Fragoso, G; López-Casillas, F; Toledo, A; Larralde, C; Sciutto, E. *Taenia crassiceps* cysticercosis protective affect and immune response elicited by DNA immunization. J parasitol.2000. 86(1):67-74.

Daniell H. Production of biopharmaceuticals and vaccines in plants via the chloroplast genome. Biotechnol J. 2006 Oct;1(10):1071-9.

de Aluja A and Vargas G. The histopathology of porcine cisticercosis. Vet. Parasitol. 1998;28(1-2):65-77.

Diaz, M.A; Villalobos, N; Aluja, A; Rosas, G; Gomez-Conde, E; Hernandez, P; Larralde, C; Sciutto, E; Fragoso, G. Th1 and Th2 indices of the inmune response in pigs vaccinated against *Taenia solium* cysticercosis suggest various host immune strategies against the parasite. Vet Immunol Immunophatol.2003:9381-89.

Dus Santos MJ, Wigdorovitz A. Transgenic plants for the production of veterinary vaccines Immunol Cell Biol. 2005 Jun;83(3):229-38.

Eddi C, Nari A, Amanfu W. *Taenia solium* cisticercosis/teniosis: potential linkage with FAO activities; FAO support possibilities. Acta Trop 2003; 87: 145-148.

Edwards GT, Herbert IV .Some quantitative characters used in the identification of *Taenia hydatigena*, *T. ovis*, *T. pisiformis* and *T. multiceps* adult worms, and *T. multiceps* metacestodes. J Helminthol 1981; 55: 1-7.

Esch, G.W; Self, T. A critical study of the taxonomy of *Taenia pisiformis* Bloch, 1780; *Multiceps* (Leske, 1780); and *Hidatigera Taeniaeformis* Batsch 1780. J Parasitol.1965.51 (6):932-937.

Espíndola, M; De Gaspari, E.N; Nakamura, P.M; Vaz, A.J. Cross-reactivity of anti-*Taenia crassiceps* cysticercosis immune antibodies with *Taenia solium* antigens. Vet parasitol. 2000.89.321-326.

Eugia-Aguilar, P; Cruz-Reyes, A; Martinez-Maya, J; Ecological analysis and description of the intestinal helminths present in dogs in Mexico City. Vet parasitol. 2005.20:127(2).139-46.

Euzeby Jacques. Los parásitos de las carnes: epidemiología, fisiopatología, incidencias zoonóticas. Zaragoza, España, Ed acribia, 2000.

Flatt R and Moses R. Lesions of experimental cisticercosis in domestic rabbits. *Lab Anim Sci*.1975;25:162-167.

Flatt RE, Campbell WW. Cysticercosis in rabbits: incidence and lesions of the naturally occurring disease in young domestic rabbits. *Lab Anim Sci* 1974;24:914-918.

Flatt RE, Moses RW. Lesions of experimental cysticercosis in domestic rabbits. *Lab Anim Sci* 1975; 25: 162-167.

Flisser, A; Gauci, G; Zoli, A; Martinez, J; Garza, A; Dominguez, J.L; Maravilla, P; Rodriguez, R; Avila, G; Aguilar, L; Kyngdon, C; Geerts, S; Lightowers, M.W. Induction of protection against porcine cysticercosis by vaccination with recombinant oncosphere antigens. *Infect and Immun*. 2004. 72(9): 5292-5297.

Flisser, A; Lightowers, M,W. Vaccination against *Taenia solium* Cysticercosis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*. 2001.96: 353-356.

Flisser, A; Vargas-Parada, L; Laclette, J.P. *Taenia solium*: un parásito cosmopolita. *Investigación y Ciencia*. 2006:24-33.

Flores-Pérez FI., Rosas- Velasco C., Lavielle Rosa E., Pérez-Martínez Mario. Daños histológicos en hígados de conejos infectados experimentalmente con el metacestodo de *Taenia pisiformis*: resultados preliminares. III Congreso Internacional de Epidemiología. Oaxaca. 2003 .pag.656-662.

Floss DM, Falkenburg D, Conrad U. Production of vaccines and therapeutic antibodies for veterinary applications in transgenic plants: an overview. *Transgenic Res*. 2007 Jun;16(3):315-32

Foronda, P; Valladares, B; Morales-Lorenzo, J; Ribas, A; Feliu, C; Casanova,C.J. Helminths of the wild rabbit (*Oryctolagus cuniculus*, L) in Macaronesia. *J Parasitol*. 2003. 89(5):952-957.

Fox James G. *Laboratory Animal Medicine*. Academic Press, INC, 1984.

Garcia-Allan C, Martínez N, Flisser A, Aluja A, Allan JC, et al. Immunocharacterization of *Taenia solium* oncosphere and metacestode antigens. *J Helminthol* 1996;70:271-280.

Gasser RB, Zhu X, McManus DP. NADH dehydrogenase subunit 1 and cytochrome c oxidase subunit I sequences compared for members of the genus *Taenia* (Cestoda). *Int J Parasitol* 1999;29: 1965-1970.

Gauci, C; Flisser, A; Lightowers, M.A. *Taenia solium* oncosphere protein homologous to host protective *Taenia ovis* and *Taenia saginata* 18 Kda antigens. 1998. Int. J Parasitol.28:757-760.

Gemmel, MA. Immunological responses of the mammalian host against tapeworm infections. II species specificity of hexacanth embryos in protecting rabbits against *Taenia pisiformis*. Immunology. 1965 8:270-284.
Gerdt V, Mutwiri GK, Tikoo SK, Babiuk LA: Mucosal delivery of vaccines in domestic animals. Vet. Res. 2006;37, 487–510 .

Haag KL, Gottstein B, Ayala FJ. Taeniid history, natural selection and antigenic diversity: evolutionary theory meets helminthology. Trends Parasitol. 2008 Feb;24(2):96-102.

Harkness John E. The biology and medicine of rabbits and rodents. Williams and Wilkins, 1995.

Harrison, G.B; Heath, D.D; Dempster, R.P; Lawrence, S.B; Lightowers, M.W; Rickard, D; Identification of host-protective antigens of *Taenia ovis* oncospheres. Int. J. Parasitol. 1993. 26:195-204.

Harrison, G.B; Heath, D.D; Dempster, R.P; Robinson, C.M; Lawrence, S.B; Lightowers, M.W; Rickard, D. Identification and cDNA cloning of two novel low molecular weight host-protective antigens from *Taenia ovis* oncospheres. Int. J. Parasitol. 1996. 26:195-204.

Heath, D.D; Lawrence, S.B; Antigenic polypeptides of *Echinococcus granulosus* oncospheres and definition of protective molecules. P Immunol. 1996. 18:347-357.

Hernández M, Cabrera-Ponce JL, Fragoso G, López-Casillas F, Guevara-García A et al. A new highly effective antycysticercosis vaccine expressed in transgenic papaya. Vaccine 2007;25: 4252-4260.

http://www.fao.org/documents/show_cdr.asp?url_file=/docrep/x5082e/x5082e00.htm

<http://www.powhatananimalhospital.com>

Huerta M, de Aluja AS, Fragoso G, Toledo A, Villalobos N, Hernández M et al. Synthetic peptide vaccine against *Taenia solium* pig cysticercosis: successful vaccination in a controlled field trial in rural Mexico. Vaccine 2001,20: 262-266.

Huerta, L; Terrazas, L.I; Sciutto, E; Larralde, C. Immunological mediation of gonadal effects on experimental murine cysticercosis caused by *Taenia crassiceps* metacestodes. J Parasitol. 1992. 78 (3): 471-6.

Huerta, M; Aluja, A.S; Fragoso, G; Toledo, A; Villalobos, N; Hernández, M; Gevorkian, G; Acero, G; Díaz, A; Álvarez, I; Ávila, R; Beltrán, C; García, G; Martínez J.J; Larralde, C; Sciutto, E. Synthetic peptide vaccine against *Taenia solium* pig cysticercosis: successful vaccination in a controlled field trial in rural México. *Vaccin.* 2002. 20:262-266.

Ishida, M.I; Rubinsky-Elefant, G; Ferreira, S; Hoshina-Shimizu, S; Vaz, A.J. Helminth antigens (*Taenia solium*, *Taenia crassiceps*, *Toxocara canis*, *Schistosoma mansoni* and *Echinococcus granulosus*) and cross-reactivities in human infections and immunized animals. *Acta Trop.* 2003. 89: 73-74.

Kan, K. Immunological studies of *cysticercus fasciolaris*. *K Igaka.*1934. 14:662-687.

Laclette, J.P; Shoemaker, C.B; Richter, D; Arcos, L; Pante, N; Cohen, C; Bing, D; Nicholson-Weller, A. Paramyosin inhibits complement C1J. *Immunol.*1992.148:124-128.

Larralde, C; Montoya, R.M; Sciutto, E; Diaz, M.L; Govesensky, T; Coltorti, E. Deciphering Western blots of tapeworm antigens (*Taenia solium*, *Equinococcus granulosus*, and *Taenia crassiceps*) reacting with sera from neurocysticercosis and hydatid disease patients. *Am J Trop Med Hyg.* 1989.40 (3):283-90.

Larralde, C; Sciutto, E; Huerta, L; Terrazas, I; Fragoso, G; Trueba, L; Lemus, D; Lomeli, C; Tapia, G; Montoya, R.M. Experimental Cysticercosis by *Taenia crassiceps* in mice: factors involved in susceptibility. *Acta Leiden.*1989.57(2):131-4.

Li Y, Frey E, Mackenzie AM, Finlay BB: Human response to Escherichia coli O157: H7 infection: antibodies to secreted virulence factors. *Infect. Immun.*2000; 68, 5090–5095.

Lightowlers MW, Waterkeyn JG, Rothel JS, Gauci CG, Harrison GB . Host-protective fragments and antibody binding epitopes of the *Taenia ovis* 45W recombinant antigen. *Parasite Immunol* 1996a;18, 507-513.

Lightowlers, M.W; Lawrence, S.B; Gaucchi, C.G; Young, J; Ralston, M.J; Maas, D; Heath, D.D. Vaccinations against Hydatidosis using a defined recombinant antigen. *Parasitol Immunol.* 1996^c.18: 457-462.

Lightowlers, M.W; Mitchell, G.F; Bowtell, D.D; Anders, F.F; Rickard, M.D. Immunization against *Taenia taeniaformis* in mice: studies on the characterization of antigens from oncospheres. *Int. J Parasitol.* 1984. 14:321-333.

Lightowlers, M.W; Rickard, M.D; Mitchell, G.F. Immunization against *Taenia taeniaeformis* in mice: Identification of oncospherical antigen in polyacrilamide gels by Western blotting and enzyme immunoassay. Int. J. Parasitol. 1986.16:297-306.

Lightowlers, M.W; Rolfe, R; Gaucci, C.G. *Taenia saginata*: vaccinations against cysticercosis in cattle with recombinant oncosphere antigens. Exp. Parasitol. 1996^b. 84: 330-338.

Lightowlers, M.W; Rolfe, R; Gaucci, C.G; Harrison, G.B. Host-protective fragments and antibody bindings epitopes of the *Taenia ovis* 45W recombinant antigen. Parasite Immunol. 1996^a.18:507-513.

López, M; Losada, H; Sandoval, S; Bennett, R; Arias, L; Rangel, J; Soriano, R; Cortez, J. The influence of urban tourism on household agriculture: the rabbit a new guest in the southeast of the metropolitan area of Mexico city. Livest Res Rur Develop.1999. (11):3.

López-Moreno, HS. Cestodiasis tisulares: participación de los linfocitos Th cooperadores 1 y 2. Salud Pública de México. 2002. 44:145-152.

Manoutcharian K, Diaz-Orea A, Gevorkian G, Fragoso G, Acero G, González E et al Recombinant bacteriophage-based multiepitope vaccine against *Taenia solium* pig cysticercosis. Vet Immunol Immunopathol 2004; 99: 11-24.

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

Mason HS, Warzecha H, Mor T, Arntzen CJ. Edible plant vaccines: applications for prophylactic and therapeutic molecular medicine. Trends Mol Med 2002;8:324-329.

Miller, H.M. The production of artificial immunity in the albino rats to a metazoan parasite. J. Prev. Med. 1931.5: 429-452.

Molinari J, Rodriguez D, Tato P, Soto R, Arechavaleta, Solano S . Field trial for reducing porcine *Taenia solium* cysticercosis in Mexico by systematic vaccination of pigs. Vet Parasitol 1997,69: 55-63.

Molinari, J.L; Meza, R; Suarez, B; Palacios, S; Tato, P; Retana, A. *Taenia solium*: immunity in the hogs to the cysticercus. Exp Parasitol. 1983. 55:340-357.

Molinari, J.I; 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 (1-2):55-63.

Morales J, de Aluja AS, Martínez JJ, Hernández M, Rosas G, Villalobos N et al. Recombinant S3Pvac-phage anticysticercosis vaccine: simultaneous protection against cysticercosis and hydatid disease in rural pigs. *Vet Parasitol* 2011;176: 53-58.

Morales J, Martínez JJ, Manoutcharian K, Hernández M, Fleury A, Gevorkian G et al. Inexpensive anti-cysticercosis vaccine: S3Pvac expressed in heat inactivated M13 filamentous phage proves effective against naturally acquired *Taenia solium* porcine cysticercosis. *Vaccine* 2008;26: 2899-2905.

Morales, J; Velasco, T; Tovar, V, Fragoso, G; Fleurry, A; Beltrán, C; Villalobos, N; Aluja, A, Rodarte, L.F; Sciutto, E; Larralde, C. Castration and pregnancy of rural pigs significantly increase the prevalence of naturally acquired *Taenia solium* cysticercosis. *Vet parasitol.* 2002.108:41-48.

Notredame C, Higgins DG, Heringa J T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *J Mol Biol.*2000;302: 205-217.

Olguín S. "Programa de control de la teniasis-cisticercosis. *Gaceta Biomédicas* 2010;15: 8-9.

Onyango-Abuje JA, Waiyaki PG, Gathuma JM. Specific and shared antigenic of *Taenia saginata* oncospheres. *Res Vet Sci* 1989;47:236-240.

Osborn, P.J; Heath, D.D; Roberts, M.G; Vaccination of sheep against *Taenia ovis*: The response to various dose rates of antigens obtained by incubation of oncospheres *in vitro*. *Res. Vet. Sci.*1982. 32: 351-353.

Palmas, C; Ecca, A.R; Gabriele, F. Specific cross-immunity between *Hymenolepis nana* and *H. diminuta*: effects of transfer of immunity with homologous and heterologous immune mesenteric lymph node cells in BALB/c mice. *J Parasitol.*1993.79 (3):384-9.

Parslow, T.G; Stites D.P; Imboden J.B. *Inmunología Básica y clínica. Manual Moderno.*10° Edición. 2002:89-91.

Pawlowski Z, Allan J, Sarti E. Control of *Taenia solium* taeniasis/cysticercosis: from research towards implementation. *Int J Parasitol* 2005;35: 1221-1232.

Pérez-Torres Armando, Ustarroz Martha, Constantino Fernando, Villalobos Nelly y de Aluja Aline. *Taenia solium* cisticercosis: lymphocytes in the inflammatory reaction in naturally infected pigs. Parasitol Res 2002;88:150-152.

Potter AA, Klashinsky S, Li Y et al.: Decreased shedding of Escherichia coli O157: H7 by cattle following vaccination with type III secreted proteins. Vaccine 2004;22, 362–369 .

Osterrieder N, Kamil JP, Schumacher D, Tischer BK, Trapp S: Marek's disease virus: from miasma to model. Nat. Rev. Microbiol. 2006; 4, 283–294.

Quiroz, R.H. Parasitología y enfermedades parasitarias de animales domésticos. Duodécima reimpresión. Limusa. 2003.

R.P; Lawrence, S.B; Vinton, J.G; Heath, D.D; Rickard, M.D. Vaccination against ovine cysticercosis using a defined recombinant antigen. Nature. 1989. 338: 585-587.

Rajasekariah, G.R; Mitchell, G.F; Rickard, M.D. *Taenia taeniaeformis* in mice: protective immunization with oncospheres and their products. Int. J. Parasitol. 1980.10:155-160.

Rassy D, Bobes RJ, Rosas G, Anaya VH, Brehm K, Hernández B, Cervantes J, Pedraza S, Morales J, Villalobos N, de Aluja AS, Lacleste JP, Nunes CM, Biondi GF, Fragoso G, Hernández M, Sciutto E. Characterization of S3Pvac anti-cysticercosis vaccine components: implications for the development of an anti-cestodiasis vaccine. PLoS One. 2010 Jun 23;5(6):

Richard, M.D; Coman, B.J. Studies of the fate of *Taenia Hidatigena* and *Taenia ovis* larvae in rabbits, and cross immunity with *Taenia pisiformis* larvae. Int J Parasitol.1977.7 (4): 257-67.

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

Robinson, P; Atmar, R.L; Lewis, D.E; A.C.Jr.White. Granuloma cytokines in murine cysticercosis. Infect Immun.1997.65:2925-2931.

Rojas, M.W., Inmunología. Corporación para investigaciones biológicas.1995.221-230.

Roman G, Sotelo J, Del Brutto O, Flisser A, Dumas M, Wadia N et.al. A proposal to declare neurocysticercosis an international reportable disease. Bulletin of the World Health Organization 2000; 78: 399-406.

Rosas C, Pérez M, Castillo H, Flores FI. Histological changes induced by medroxyprogesterone acetate on the uterus of ovariectomized rabbits. *Vet Mex* 2007;38:207-215

Rosas G, Fragoso G, Garate T, Hernández B, Ferrero P, Foster-Cuevas M et al. Protective immunity against *Taenia crassiceps* murine cysticercosis induced by DNA vaccination with a *Taenia saginata* tegument antigen. *Microbes Infect* 2002; 4:1417-1426

Rouse BT, Kaistha SD: A tale of 2 alpha-herpesviruses: lessons for vaccinologists. *Clin. Infect. Dis.* 2006;42, 810–817.

Rumbley CA, Sugaya H, Zekavat SA, El Refaei M, Perrin PJ, Phillips SM. Activated eosinophils are the major source of Th2-associated cytokines in the schistosome granuloma. *J Immunol.* 1999 Jan 15;162(2):1003-9.

Sarti E, Flisser A, Schantz PM, Gleizer M, Loya M, Plancarte A et al. Development and evaluation of a health education intervention against *Taenia solium* in a rural community in Mexico. *Am J Trop Med Hyg* 1997; 56: 127-132.

Sarti, E. La teniosis y cisticercosis por *Taenia solium*. *Salud Pública México.* 1997. 39:3.

Schmidt CS, Morrow WJ, Sheikh NA: Smart adjuvants. *Expert Rev. Vaccines* 2007; 6, 391–400.

Sciutto E, Hernández M, Díaz-Orea² A, Cervantes J, Rosas-Salgado G, Morales J, Villalobos N, Aluja A, Blancas A, Aquino R, Fuentes O, Jiménez H, Trejo-Moreno C, Méndez-Martínez M, Manoutcharian K, Gevorkian G, Herrera-Estrella LCabrera Ponce JL, Larralde C, Fragoso G, Huerta M. Towards A Practical and Affordable Oral Papaya-Based Vaccine: A Crucial Tool for Taeniasis Cysticercosis Control Programs. In: Min-Tze Liong, editor. *Bioprocess Sciences and Technology*, New York: Nova Science Publishers; 2011, p 325-340.

Sciutto, E; Fragoso, G; Fleury, A; Laclette, JP; Sotelo, J; Aluja, A; Vargas, L; Sarralde, C. *Taenia solium* disease in humans and pigs: an ancient parasitosis disease rooted in developing countries and emerging as a major health problem of global dimensions. *Microbes Infect.* 2000.15:1875-1890.

Sciutto, E; Morales, J; Martinez,J.J; Toledo, A; Villalobos, M.N; Cruz-Revilla, C; Meneses, G; Hernández, M; Diaz, A; Rodarte, L.F; Acero, G. Gevorkian, G; Manoutcharian, K; Paniagua, J; Fragoso, G; Fleury, A; Larralde, R; Aluja de A.S; Larralde, C. Further evaluation of the synthetic peptide vaccine

S3Pvac against *Taenia solium* cysticercosis in pigs in an endemic town of Mexico. Parasitol.2006.1-5.

Solís, C. F; Vázquez, T. J; Lacleste, J.P. Hacia el desarrollo de una vacuna en contra de la cisticercosis porcina basada en la paramiosina de *Taenia solium*. Gac Méd Méx .2004. 140:2

Terrazas Valdés Luis Ignacio. Interacciones inmunoendócrinas en la cisticercosis experimental murina: mecanismos de colonización parasitaria. Tesis de Doctorado. Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. 1998.

Terrazas, L.I; Bojalil, R; Govezensky, T; Larralde, C. Shift from an early protective Th1-type immune response to a late permissive Th2 response in murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). J Parasitology.1998.84:74-81.

Toledo A, Larralde C, Fragoso G, Gevorkian G, Manoutcharian K, Hernández M et al. Towards a *Taenia solium* cysticercosis vaccine: an epitope shared by *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* protects mice against experimental cysticercosis. Infect Immun 1999;67:2522-2530.

Toledo, A., Fragoso, G., Rosas, G., Hernandez, M., Gevorkian,G., López-Casillas F 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. Infect. Immun. 69, 1766-1773.

Toledo, A; Fragoso, G; Rosas, G; Hernández, M; Gevorkian, K; Lopez-Casillas, F; Hernández, B; Aceros, G; Huerta, M; Larralde, C; Sciutto, E. Two epitopes shared by *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* confer protection against murine *taenia crassiceps* cysticercosis along with a prominent T1response. Infect Immun. 2001. 69(3):1766-73.

Toledo, A; Larralde, C; Fragoso, G; Gevorkian, G; Manoutcharian, K; Hernández, M; Acero, G; Rosas, G; Lopez-Casillas, F; Garfias C.K; Vazquez, R; Terrazas, I; Sciutto E. Towards a *Taenia solium* Cysticercosis Vaccine: an epitope shared by *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* protects mice against experimental cysticercosis. Infect and Immun. 1999.67:2522-2530.

Villa, O.F; Kuhn, R.E. Mice infected with the larvae of *Taenia crassiceps* exhibit a Th2-like immune response with concomitant anergy and down regulation of Th1-associated phenomena. Parasitol. 1996. 112: 561-570.

Vyas SP, Gupta PN: Implication of nanoparticles/microparticles in mucosal vaccine delivery. Expert Rev. Vaccines 2007;6, 401–418.

Walmsley AM, Arntzen CJ.Plant cell factories and mucosal vaccines. Curr Opin Biotechnol 2003;14: 145-150.

Wang IC, Ma YX, Kuo CH, Fan PC. A comparative study on egg hatching methods and oncosphere viability determination for *Taenia solium* eggs. Int J Parasitol 1997;27: 1311-1314.

Wang, Q; Sun, S; Hu, Z; Wu, D; Wang, Z. Immune response and protection elicited by DNA immunization *Taenia cysticercosis*. Vaccine. 2003. 21:1672-1680.

Wei-min C, Dong-Chuan Q, Hatz C. Studies on ultrasonographic diagnosis of schistosomiasis japonica in china- a review of selected Chinese studies. Acta tropica 1992;51:37-43.

Worley DE .Quantitative studies on the migration and development of *Taenia pisiformis* larvae in laboratory rabbits. Lab Anim Sci 1974;24: 517-522.

Anexos

a) Lista de cuadros

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de *T. pisiformis* (Esch y Self, 1965).

Dominio	Eucarionte
Reino	Animalia
Phylum	Platelmintos
Clase	Cestoda
Orden	Ciclophyllidea
Familia	<i>Taeniidae</i>
Género	<i>Taenia</i>
Especie	<i>pisiformis</i>

Cuadro 2. Número de lesiones hepáticas observadas en Conejos infectados con huevos de *Taenia pisiformis*

Día 7 postinfección	Lesiones hepáticas encontradas por coneja	Eficiencia vacunal	Valor de P
<i>Control</i>	1, 1, 2, 2, 2, 3, 3, 4, 5, 6, 8, 10 3.92 ± 2.84 ^a		
<i>Inmunizados con:</i>			
S3Pvac-sintética	0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 1, 2 0.25 ± 0.62 ^b	94%	(P<0.05)
S3Pvac-papaya	0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 1, 1, 1, 2 0.42 ± 0.67 ^b	89%	(P<0.05)
S3Pvac-fago	0, 0, 0, 0, 0, 0, 1, 1, 1, 2, 2, 3 0.83 ± 1.03 ^b	79%	(P<0.05)

Día 21 postinfección	Lesiones hepáticas encontradas por coneja	Eficiencia vacunal	Valor de P
<i>Control</i>	2, 4, 4, 5, 5, 5, 6, 6, 8, 10, 10, 12 6.42 ± 2.97 ^a		
<i>Inmunizados con:</i>			
S3Pvac-sintética	0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 1, 1, 1, 2, 4 0.75 ± 1.22 ^b	88%	(P<0.05)
S3Pvac-papaya	0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 1, 2, 2, 3 0.66 ± 1.07 ^b	90%	(P<0.05)
S3Pvac-fago	0, 0, 0, 0, 1, 1, 2, 2, 2, 2, 3, 3 1.33 ± 1.16 ^b	79%	(P<0.05)

^{a,b}. Diferentes literales indican diferencia significativa entre el número de lesiones hepáticas encontrados entre el grupo control vs grupos de vacuna. Se utilizó la prueba estadística no paramétrica de Mann-Whitney (P<0.05).

Cuadro 3. Número de metacestodos encontrados en conejas vacunadas e infectadas con huevos de *Taenia pisiformis*.

Día 7 postinfección	Lesiones hepáticas encontradas por coneja	Eficiencia vacunal	Valor de P
<i>Control</i>	1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 5, 5, 6, 12 3.00 ± 3.44 ^a		
<i>Inmunizados con:</i>			
S3Pvac-sintética	0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 1, 3 0.33 ± 0.89 ^b	89%	(P<0.05)
S3Pvac-papaya	0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 1, 1, 2 0.33 ± 0.65 ^b	89%	(P<0.05)
S3Pvac-fago	0, 0, 0, 0, 0, 1, 1, 1, 1, 2, 3, 3 0.92 ± 0.17 ^b	69%	(P<0.05)
Día 21 postinfección	Lesiones hepáticas encontradas por coneja	Eficiencia vacunal	Valor de P
<i>Control</i>	1, 1, 2, 2, 2, 3, 3, 3, 4, 7, 10, 14 4.33 ± 4.01 ^a		
<i>Inmunizados con:</i>			
S3Pvac-sintética	0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 1 0.08 ± 0.29 ^b	98%	(P<0.05)
S3Pvac-papaya	0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 1, 2 0.25 ± 0.62 ^b	94%	(P<0.05)
S3Pvac-fago	0, 0, 0, 0, 0, 1, 1, 1, 1, 2, 3, 3 1.00 ± 1.13 ^{b,c}	77%	(P<0.05)

^{a,b}, Diferentes literales indican diferencia significativa entre el número de metacestodos encontrados entre el grupo control vs grupos de vacuna. Se utilizó la prueba estadística no paramétrica de Mann-Whitney (P<0.05).

b) Lista de Figuras

Figura 1. Identificación de *Taenia pisiformis*.

Figura 1. Identificación de *Taenia pisiformis*. **A.** AMPLICONES; M: Peso Molecular; Carril 2, 4 y 6: Productos obtenidos por PCR usando lo primers JB11/JB12 para el gen ND1 de diferentes especímenes *T. pisiformis*. **B.** Alineación de la secuencia de DNA para el gen ND1 de *T. pisiformis*.

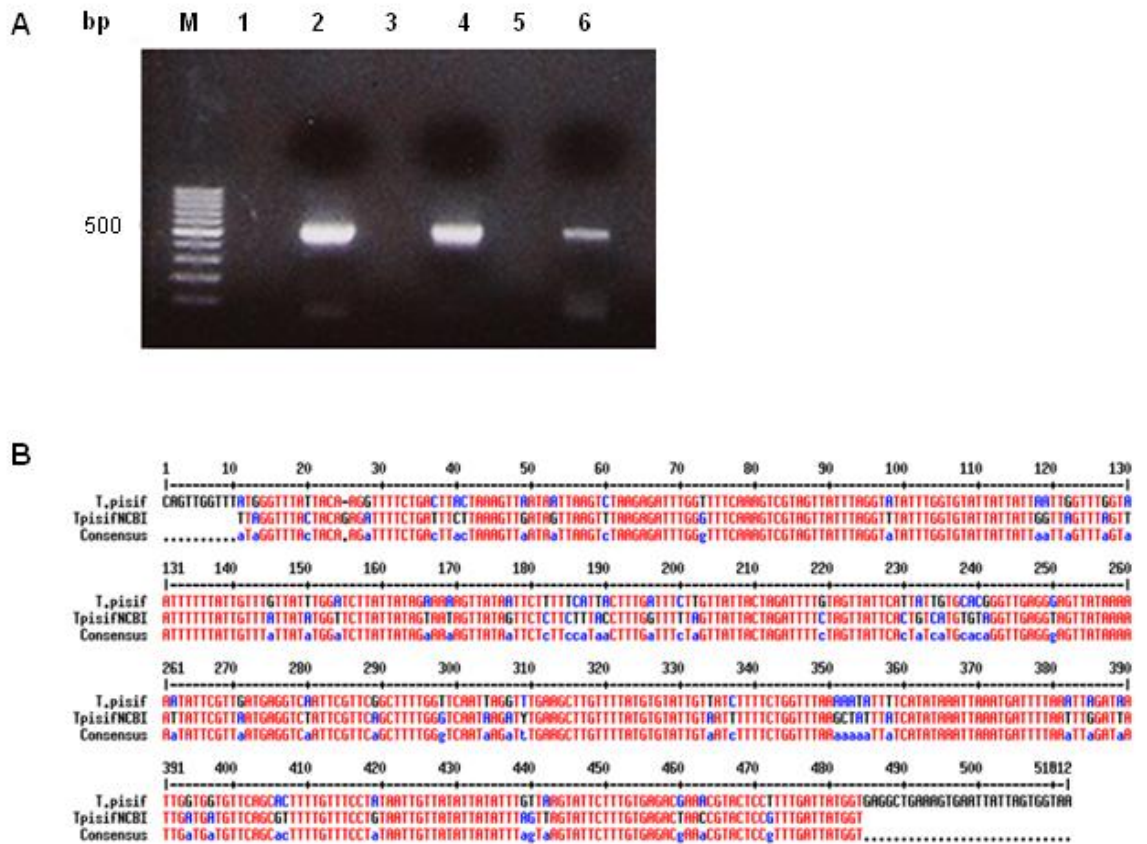


Figura 2. Inmunolocalización de los péptidos de la vacuna S3Pvac en el cestodo adulto de *Taenia pisiformis*. Las flechas indican la zona del parásito donde los péptidos fueron localizados: tegumento (T), citoplasma distal (DC), citoplasma perinuclear (PC), microtrix (MT), músculos longitudinales (LM), ovario (O), oncosferas (Os) e inclusiones lipídicas (LI).

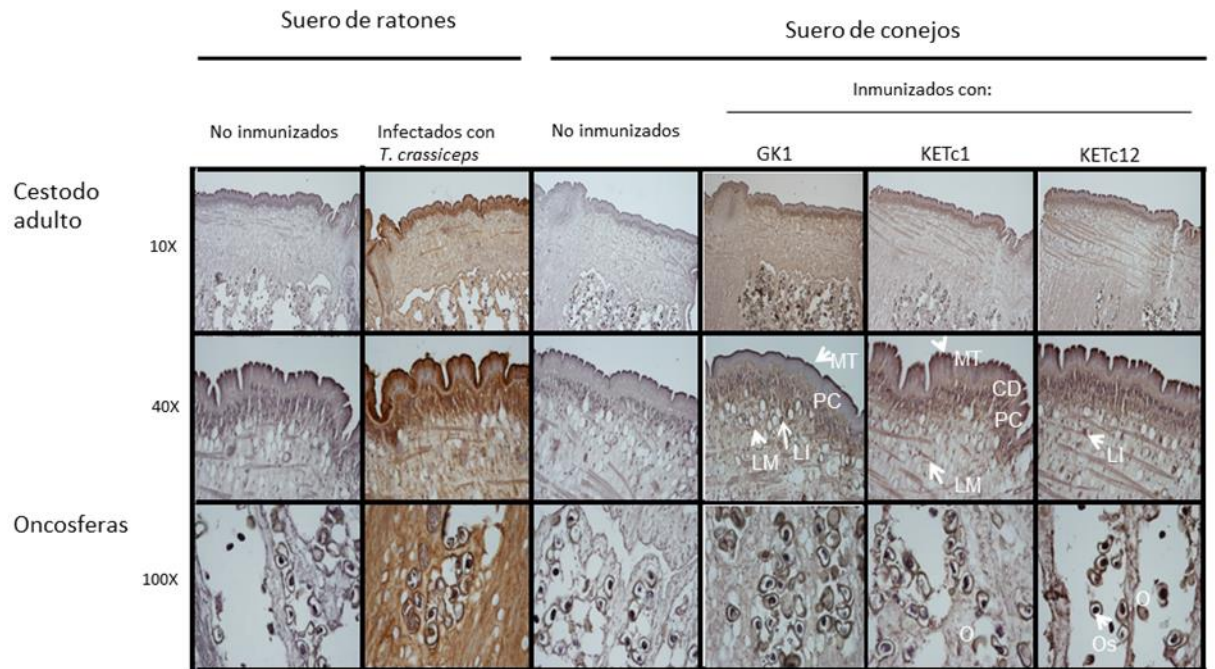


Figura 6. Número de linfocitos y macrófagos encontrados en las lesiones hepáticas a los 7 y 21 días postinfección en el grupo control y en los grupos vacunados. ***P<0.001

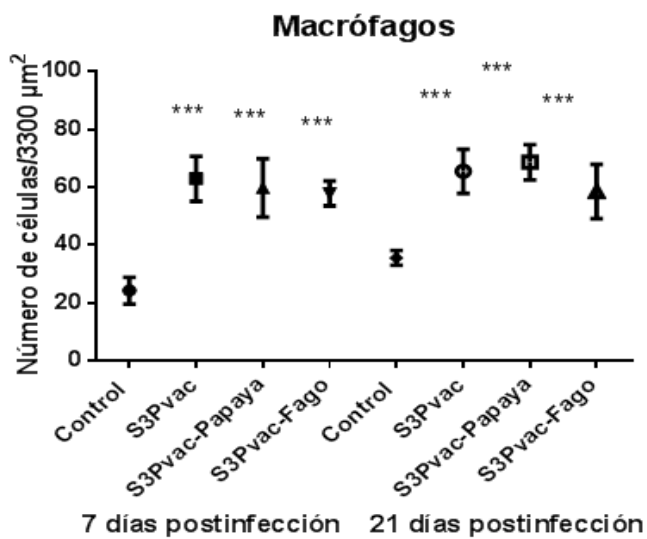
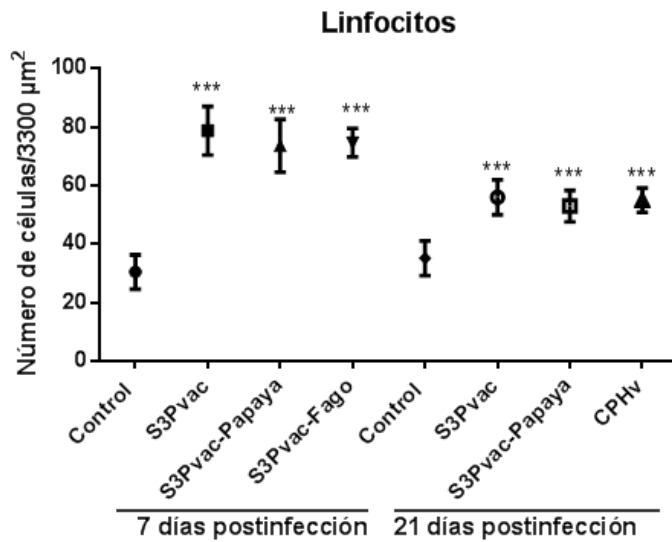


Figura 3. Aspecto macroscópico de las lesiones hepáticas del grupo control y los grupos de vacuna a los 21 días postinfección.

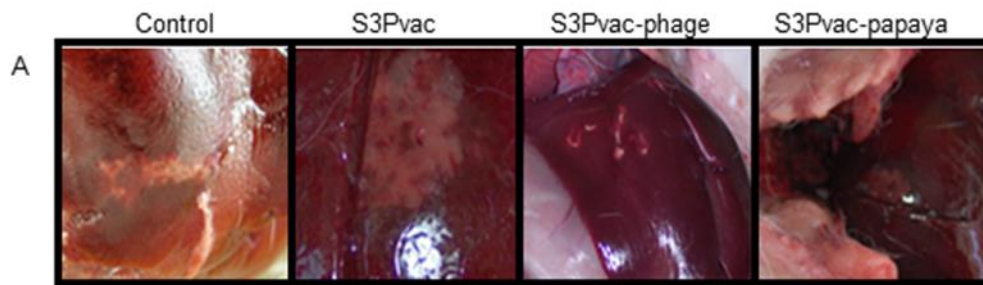


Figura 4. Aspecto macroscópico de la cavidad abdominal. Las flechas indican la presencia de un metacestodo de *Taenia pisiformis*.

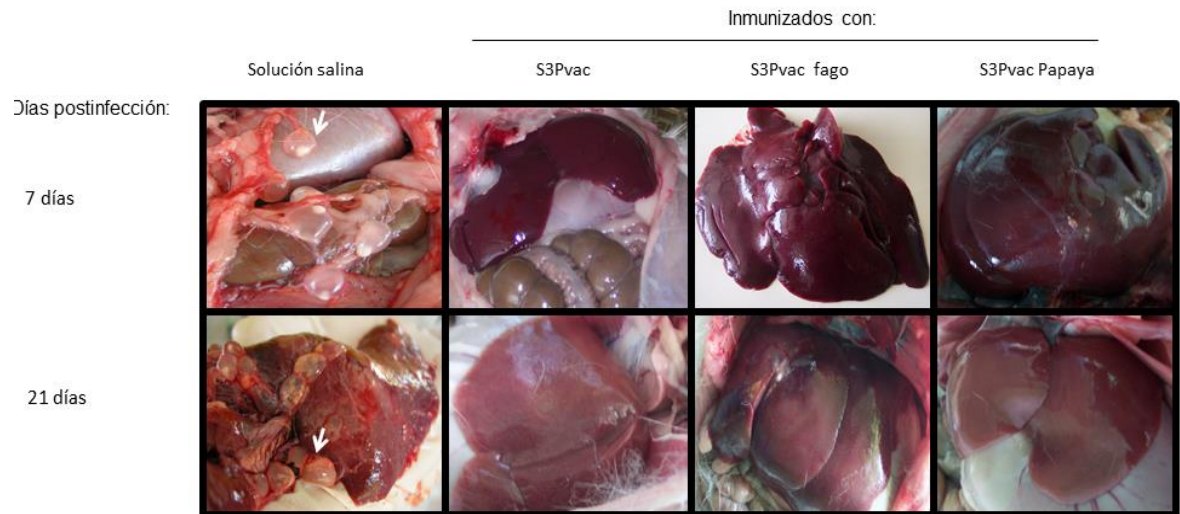


Figura 5. Respuesta inflamatoria local. Se observan granulomas ocasionados por la presencia del parásito en el parénquima hepático.

