

00346

14  
1es



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

IDENTIFICACION DE EPITOPES PROTECTORES EN ANTIGENOS  
RECOMBINANTES DE *Taenia crassiceps*.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS  
(BIOLOGÍA CELULAR)

P R E S E N T A:

Q.F.B. ANDREA ALEJANDRA TOLEDO ROJAS

DIRECTOR DE TESIS: DRA. EDDA LYDIA SCIUTTO CONDE

MEXICO, D.F.

1999

TESIS CON  
FALLA DE CR. EN

274556



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.

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

*Este trabajo lo dedico con especial cariño a mis papás GLORIA Y DANIEL , los cuales siempre me han demostrado su cariño incondicionalmente y que gracias a ellos he llegado hasta esta meta, los amo mucho.*

*A ERNESTO por ser mi amigo y compañero por apoyarme en todas mis locas decisiones y sobre todo porque juntos estamos en esta aventura llamada amor.*

*A SANDRITA, TITIN Y TIA SANDRA por estar siempre en los momentos importantes de mi vida.*

*A Toda mi Familia CHILENA porque aún en la distancia los tengo siempre presentes.*

*A toda mi gran Familia del laboratorio porque gracias a ellos las cosas se facilitan y son agradables día con día... CHICOS ¡MIL GRACIAS! .*

*A EDDA por ser una gran persona y tutora, por apoyarme durante todo este tiempo, muchisisimas gracias.*

*A mis AMIGAS porque a pesar del paso de los años seguimos juntas.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco el apoyo de la M. en C. Marisela Hernández quien nos ha asesorado técnicamente para el desarrollo de este trabajo de tesis, al personal del bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas, especialmente a Gerardo Arrellin y Georgina Díaz, quienes nos han provisto de los animales necesarios. Al departamento de Fotografía y Dibujo por toda la ayuda prestada para la realización de las figuras.

## INDICE

### PAGINAS

1. RESUMEN	6
2. INTRODUCCIÓN	8
3. OBJETIVOS	15
4. MATERIALES Y MÉTODOS, RESULTADOS (ARTÍCULO)	16
La metodología utilizada en este trabajo de tesis así como los principales resultados se incluyen en el artículo anexo.	
Towards a <i>Taenia solium</i> cysticercosis vaccine: An epitope shared by <i>Taenia crassiceps</i> and <i>Taenia solium</i> protects mice against experimental cysticercosis. <b>Andrea Toledo</b> , Carlos Larralde, Gladis Fragoso, Goar Gevorkian, , Karen Manoutcharian, Marisela Hernández, Gonzalo Acero, Gabriela Rosas, Fernando Lopez-Casillas , Carlos Kubli Garfias, Ricardo Vazquez, Ignacio Terrazas and Edda Sciutto. (Infection and Immunity, May 1999, Vol 67, No. 5. p2522-2530.).	
5. DISCUSIÓN	17
6. CONCLUSIONES	25
7. BIBLIOGRAFIA	27
8. APENDICE I. VACUNAS SINTETICAS.	34

9. APENDICE II. Trabajo en colaboración realizado durante el desarrollo del proyecto de maestría. 40

*Taenia crassiceps* cysticercosis: protective effect and immune response elicited by DNA immunization. Carmen Cruz-Revilla, Gabriela Rosas, Gladis Fragoso, Fernando López-Casillas, **Andrea Toledo**, and E. Sciutto. 1999. (Aceptado para su publicación en el Journal of Parasitology).

## 1. RESUMEN.

El antígeno recombinante KETc7 de *Taenia crassiceps*, ha demostrado inducir altos niveles de protección en contra de la cisticercosis experimental murina. Esta forma de cisticercosis ha sido utilizada como modelo experimental para orientar la investigación en la cisticercosis por *Taenia solium* habiendo demostrado gran capacidad predictiva para la identificación de moléculas de interés para el diseño de una vacuna contra la cisticercosis porcina.

Basándonos en la secuencia de este polipéptido rico en prolinas (KETc7), se identificaron y sintetizaron químicamente tres regiones capaces de ser reconocidas por sueros de humanos neurocisticercosos. Los tres péptidos en su forma lineal llamados GK-1, GK-2 y GK-3 de 18, 12 y 16 aminoácidos, respectivamente, se evaluaron en su capacidad de inducir protección en contra de la cisticercosis experimental murina. La inmunización con el péptido GK-1 resultó capaz de reducir la carga parasitaria esperada entre un 40 y 70% en ratones BALB/cAnN machos. En los ratones inmunizados con GK-1 se detectó la presencia de anticuerpos lo que sugiere que incluye al menos un epítipo B. Los anticuerpos anti-GK-1 fueron capaces de reconocer el propio péptido así como antígenos totales de *T. crassiceps*. Estudios de inmunofluorescencia revelaron que los anticuerpos anti-GK-1 son capaces de reaccionar con la proteína nativa localizada en el tegumento del cisticerco de *T. crassiceps*, así como con diferentes estructuras de los distintos estadios de *T. solium* (huevo, oncosfera, cisticerco y parásito adulto). Utilizando células esplénicas de ratones inmunizados, tanto con GK-1 como con los antígenos totales de *T. crassiceps*, se indujo la proliferación *in vitro* de células T CD8<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup> y T CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> lo que señala que este péptido incluye al menos un epítipo T. En el sobrenadante de las células estimuladas *in vitro* con el péptido se detectaron altos niveles de INF- $\gamma$  y bajos niveles de IL-4. Resultados similares se observaron detectando la producción de citocinas intracelulares lo cual es compatible con que GK-1 induce una respuesta inmune principalmente de tipo inflamatorio. La protección inducida por GK-1, sus propiedades fisicoquímicas, así como su presencia en todos los estadios *T. solium*, hacen de este epítipo un candidato de interés para ser



incluido en la construcción de una vacuna sintética multivalente contra la cisticercosis porcina.

## 2. INTRODUCCION.

La cisticercosis causada por *Taenia solium* es una parasitosis frecuente en humanos y en cerdos en especial en países que se encuentran en vías de desarrollo donde prevalecen condiciones que favorecen su transmisión como son la falta de higiene y fecalismo al aire libre, aunado a la crianza rústica de cerdos y consumo de carne sin la inspección sanitaria adecuada (Gemmell *et al.*, 1982). Dentro de las zonas más afectadas se encuentran América Latina, Asia y África (Sotelo *et al.*, 1996) en donde esta parasitosis causa serios problemas tanto de salud como económicos (Larralde *et al.*, 1992). Aún, cuando la cisticercosis ha sido prácticamente erradicada en los países desarrollados, esta enfermedad ha comenzado a reportarse en países como Estados Unidos, debido a la afluencia de inmigrantes que provienen de zonas endémicas (Richards *et al.*, 1991). Más aún, publicaciones recientes indican que algunos países de Europa no se encuentran totalmente libres de esta parasitosis (Tamburrini *et al.*, 1995).

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 (Larralde, 1992). La OMS ha reportado un 1.9 % de defunciones por cisticercosis cerebral y un 3.5 % de cisticercosis en necropsias (OMS, 1979). En la Figura 1 se ilustra la seroprevalencia en los distintos estados del territorio mexicano.

El ciclo biológico de este parásito incluye una fase larvaria (cisticerco) que afecta tanto a humanos (huésped definitivo) como a cerdos (huésped intermediario). La ingestión de huevos, expulsados al medio ambiente en las heces de pacientes teniásicos, produce la cisticercosis en humanos, alojándose el parásito preferentemente en el sistema nervioso central mientras tanto, en el cerdo el parásito se desarrolla tanto en todas las masas musculares como en el sistema nervioso central. Cuando el hombre ingiere carne de cerdo mal cocida que contiene cisticercos vivos, los cisticercos al llegar al intestino delgado,

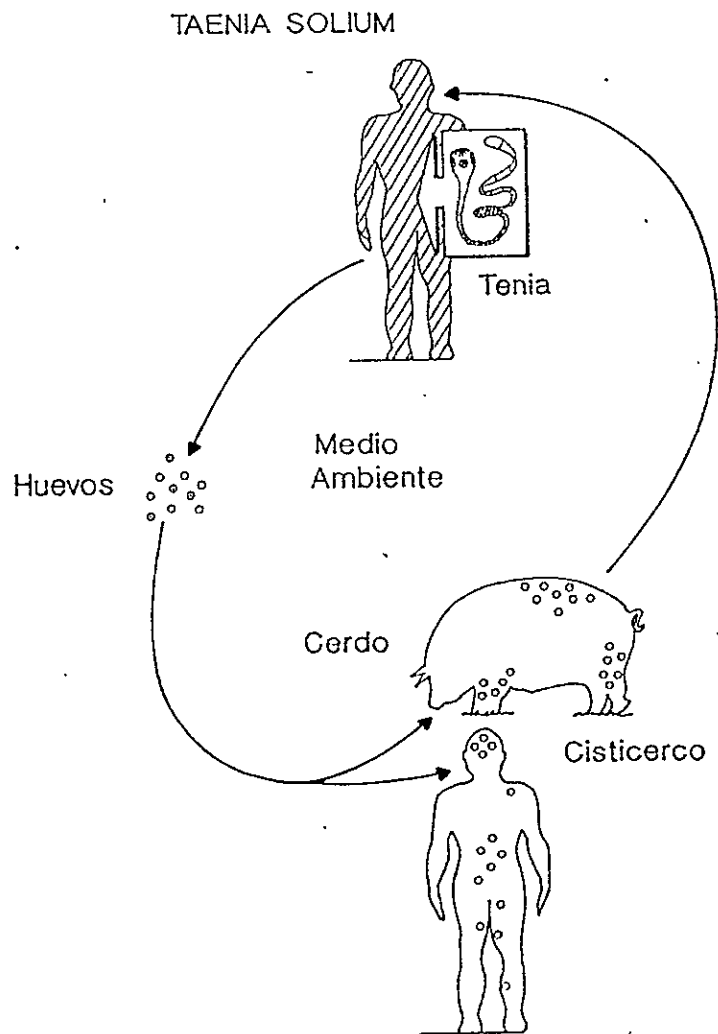


Figura 2. Ciclo de vida de *Taenia solium*

evaginan el escólex y se fijan al intestino por medio de ventosas y ganchos. Aproximadamente, después de dos meses de desarrollo, el parásito alcanza la forma adulta (*Taenia solium*) y comienza a producir millones de huevos completándose así su ciclo de vida (Figura 2). Debido a que los huevos se eliminan en las heces diariamente, la transmisión se favorece como ya se mencionó anteriormente en zonas donde prevalecen bajos estándares de sanidad, higiene personal, control ambiental, fecalismo al ras del suelo y en donde simultáneamente se practica la cría rústica de cerdos.

El estadio larvario de este gusano puede afectar prácticamente todos los órganos y tejidos del cuerpo humano. Curiosamente, las localizaciones más frecuentes dependen fundamentalmente de áreas geográficas. Se reporta la localización en tejidos subcutáneos e intramusculares especialmente en Asia y África, mientras que en el continente Americano la localización más frecuente es en el sistema nervioso central. En el sistema nervioso central se puede desarrollar ocasionando lesiones parenquimatosas y/o subaracnoideas en cápsulas quísticas superficiales así como en ojo (Flisser *et al.*, 1982). Los síntomas que producen varían de acuerdo al número de parásitos y el tejido afectado. Las alteraciones histopatológicas son muy variables en tipo, severidad, y localización topográfica. Entre los síntomas muy frecuentemente asociados a neurocisticercosis figuran la epilepsia, cefaleas intensas, mareos, convulsiones. Así, en zonas endémicas, un adulto que presente epilepsia tiene muy altas probabilidades de ser neurocisticercoso. A pesar de la potencial gravedad de la localización en el sistema nervioso, llama la atención que aproximadamente el 50% de los pacientes neurocisticercosos no presentan síntomas ostensibles y la neurocisticercosis es un hallazgo de autopsia o casual. En el caso de la cisticercosis cutánea, subcutánea u ocular, el parásito es más fácilmente identificable. El tiempo entre la infección inicial y la aparición de los síntomas es también muy variable y puede ser de algunos meses o hasta de años (Aluja, *et al.*, 1986).



El cerdo, hospedero intermediario obligatorio de este parásito, desempeña un papel muy importante en la transmisión de la teniasis-cisticercosis por *T. solium*. La porcicultura rústica constituye un factor de suma importancia en la transmisión ya que la crianza de cerdos con base en heces humanas y desperdicios permite la persistencia del ciclo de éste parásito. Por el contrario, en la porcicultura altamente tecnificada en donde los cerdos se crían en base a alimento comercial no existe la posibilidad de infección. En consecuencia, la inspección sanitaria es muy importante para evitar el consumo de carne de cerdo parasitada con cisticercos de *T. solium* y poder controlar así la transmisión.

Dentro de los principales factores responsables del control ineficiente del consumo de cerdos criados rústicamente, figuran la matanza doméstica y el consumo directo de carne sin previa inspección; la falta de rastros, la corrupción que frecuentemente se presenta en los mismos, la evasión premeditada de rastros y la poca sensibilidad de los procedimientos para la identificación de canales infectadas, (Aluja, *et al*, 1986).

Dada la importancia de la cisticercosis en la salud humana y en la porcicultura en México, ésta ha sido objeto de numerosos estudios relacionados con aspectos clínicos y patológicos, así como con el diagnóstico, tratamiento y prevención.

Debido a que el cerdo es un huésped intermediario indispensable en el ciclo de vida del parásito, se ha considerado la vacunación como una alternativa para interrumpir la transmisión la disminución de la incidencia de la cisticercosis en el cerdo, a través de vacunación. Al respecto, numerosos estudios han sido realizados a fin de proponer la vacunación como una estrategia para poder interrumpir el ciclo de la transmisión de esta parasitosis (Sciutto *et al.*, 1990, Nascimiento *et al.*, 1995, Molinari *et al.*, 1997). Un primer obstáculo para la evaluación de inmunógenos de interés para el desarrollo de una vacuna lo representan las dificultades económicas y experimentales que se presentan en la

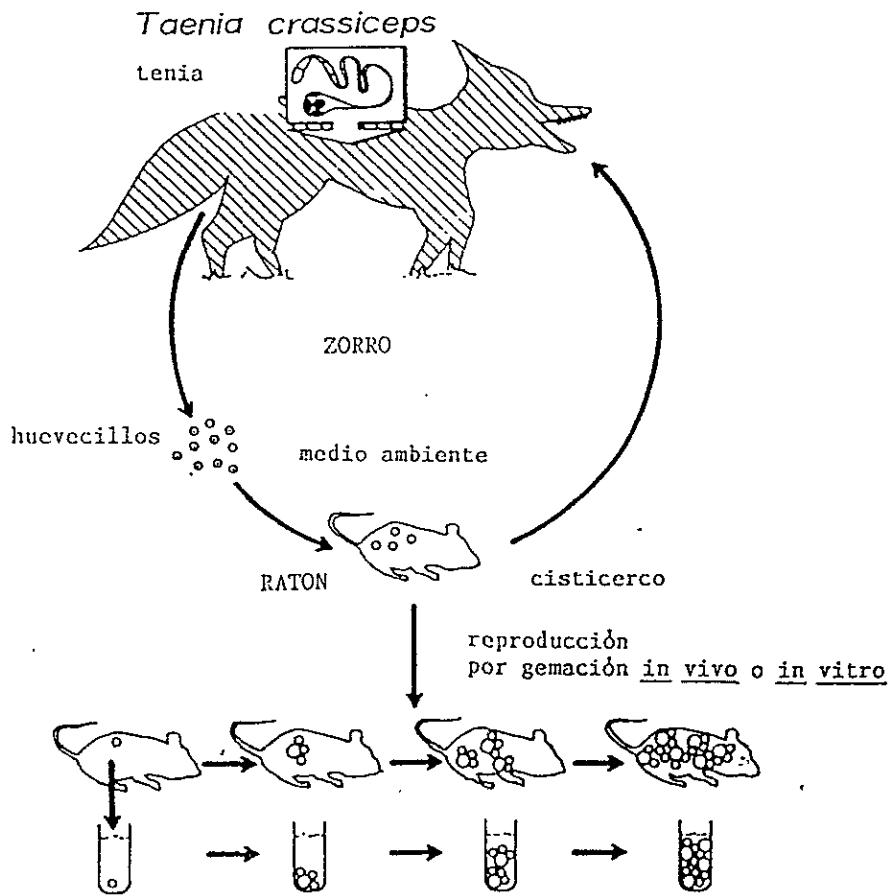


Figura 3. Ciclo de vida de *Taenia crassiceps*

experimentación con cerdos. Con el fin de mejorar este punto nuestro grupo de trabajo comenzó a estudiar la cisticercosis murina causado por otro céstodo, *T. crassiceps* (Freeman, 1962). Este parásito se reproduce por gemación polar múltiple en la cavidad peritoneal de ratones rápidamente, ofreciendo así una importante fuente de antígenos obtenidos en condiciones experimentales controladas (Figura 3) (Dorais *et al.*, 1962, Freeman, 1962, Larralde *et al.*, 1992). El ciclo de vida de ambos céstodos presenta muchas similitudes:

a) Afecta a roedores como hospederos intermediarios (pequeños roedores de Europa y Norteamérica, los cuales adquieren la infección al ingerir los huevos de la tenia presentes en las heces de cánidos infectados) y como hospederos definitivos a cánidos (zorros, lobos y perros).

b) Los cisticercos como las tenias de ambas especies presentan una estructura macroscópica similar, con algunas diferencias: los cisticercos de *T. crassiceps* son más pequeños y además presentan la característica única que es su capacidad de dividirse por gemación. Esta característica nos permite mantenerlos en el laboratorio, infectando ratones con sólo algunos cisticercos podemos recuperar en pocos meses de infección, una gran cantidad que permite obtener hasta gramos de antígeno a partir de cada ratón infectado (Sciutto *et al.*, 1992).

c) La extensa similitud antigénica que existe entre ambos metacéstodos ha permitido utilizar los antígenos de *T. crassiceps* con fines diagnósticos. Así, los antígenos de *T. solium* se pueden reemplazar por los de *T. crassiceps* en el inmunodiagnóstico de la cisticercosis humana (Larralde *et al.*, 1989; Ramos-Kuri *et al.*, 1992) sin detrimento en sensibilidad ni especificidad.

d) Los antígenos de *T. crassiceps* y de *T. solium*, inducen inmunoprotección cruzada. Los antígenos del cisticerco murino son capaces de proteger contra la cisticercosis porcina y viceversa (Tabla 1, Manoutcharian, *et al.*, 1995).

En trabajos previos, se ha demostrado que los antígenos totales de *T. crassiceps* protegen en forma parcial a los cerdos en contra de la cisticercosis



Induction of Protective Immunity against Cysticercosis

Immunized with	Mouse		Pig	
	control	vaccinated	control	vaccinated
<i>T. crassiceps</i> (total extract)	25.8 ± 1.9 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	519 ± 49.2	216.8 ± 53.8 <sup>b</sup>
<i>T. solium</i> (total extract)	25.8 ± 1.9	1 ± 0 <sup>b</sup>		
<i>T. crassiceps</i> (vesicular fluid)	38.1 ± 6.7	14.3 ± 7.20 <sup>b</sup>	5 ± 0.85	2.5 ± 1.19 <sup>b</sup>
<i>T. crassiceps</i> (gel cut-out 56, 66, and 74 kD fractions)	38.1 ± 6.7	9.7 ± 6.60 <sup>b</sup>	5 ± 0.85	0.16 ± 0.17 <sup>b</sup>
KETc1	28.2 ± 18.38	6.6 ± 4.72 <sup>b</sup>		
KETc7	28.2 ± 18.38	7.6 ± 7.57 <sup>b</sup>		
KETc11	28.2 ± 18.38	40.6 ± 22.2		
KETc12	28.2 ± 18.38	4.4 ± 5.30 <sup>b</sup>		

<sup>a</sup>Mean ± standard error of the cysticerci recovered. The number of animals in each group varies from 5 to 15. KETc1, 7, 11, and 12 are *T. crassiceps* recombinant antigens. Mice were challenged with 10 *T. crassiceps* cysticerci each, and pigs were challenged with *T. solium* eggs.

<sup>b</sup>Significant protective differences with control.

Tabla 1. Tomado de Manoutcharian *et al.*, 1995.

porcina. Sin embargo, los efectos de la vacunación con extractos totales no resulta la alternativa más adecuada. En este sentido se ha observado que la capacidad de inducir protección utilizando antígenos totales depende críticamente de la dosis utilizada (Sciutto *et al.*, 1995) y puede a altas dosis inducir incluso facilitación de la parasitosis. En las mejores condiciones, los antígenos de *T. crassiceps* son capaces de reducir a la mitad la carga parasitaria (Sciutto, *et al.*, 1995). Estos resultados indican que la cisticercosis murina resulta un modelo adecuado para identificar, evaluar y seleccionar antígenos de interés en vacunación (Manoutcharian *et al.*, 1995, 1996, Sciutto *et al.*, 1990, Valdez *et al.*, 1994). Considerando estos hallazgos se identificaron los antígenos protectores presentes en un extracto antigénico total de cisticercos de *T. crassiceps* (Manoutcharian *et al.*, 1996). Con este propósito se obtuvieron fracciones antigénicas a partir de antígenos totales de cisticercos de *T. crassiceps*. Estas fueron separadas electroforéticamente obteniéndose 12 fracciones antigénicas (8kDa-220kDa) las cuales fueron utilizadas para evaluar su capacidad protectora en ratones. De estas 12 fracciones antigénicas sólo ocho tuvieron un efecto significativo en la reducción de la carga parasitaria de los animales inmunizados con respecto a los controles (Valdez *et al.*, 1994). De ellas se seleccionaron las tres fracciones antigénicas (56, 66 y 74 kDa) que indujeron los mayores niveles de protección a bajas y altas dosis y fueron reevaluadas en su capacidad protectora (Manoutcharian, *et al.*, 1995). Los resultados mostraron que la inmunización con estas tres fracciones antigénicas redujeron de manera importante la carga parasitaria (Tabla 2, Valdez *et al.*, 1994). Al mismo tiempo dichos antígenos fueron capaces de ser reconocidos por sueros de cerdos infectados con cisticercos de *T. solium* (Valdez *et al.*, 1994). Estas fracciones también fueron utilizadas como inmunógenos en el cerdo, obteniéndose altos niveles de protección en los animales vacunados, y confirmando así la capacidad protectora de estas fracciones (Tabla 1, Manoutcharian, *et al.*, 1995).

Con el propósito de disponer de cantidades adecuadas de estas fracciones para vacunaciones de tipo masivo, este tipo de obtención de antígenos no era el

TABLE III. Combined use of electrophoretically separated antigens in subcutaneous immunization against murine cysticercosis. All immunizations were carried out in Freund's complete adjuvant.

Groups	Dose ( $\mu\text{g}$ )	*Number of cysticerci (n)	†Pro-tection efficiency, PE (%)	Number of tested mice
Total antigens‡	100	14.3 $\pm$ 7.2‡	62.0	16
Separated antigens (kDa)				
56	5	27.5 $\pm$ 11.2‡	27.8	14
66	5	17.9 $\pm$ 6.9‡	53.0	13
74	5	16.6 $\pm$ 10.7‡	56.4	13
56 + 66	10	12.6 $\pm$ 7.0‡	66.9	15
56 + 74	10	14.2 $\pm$ 6.7‡	62.7	15
66 + 74	10	12.6 $\pm$ 7.7‡	66.9	14
56 + 66 + 74	15	9.7 $\pm$ 6.6‡	74.5	11
Controls	—	38.1 $\pm$ 20.3‡	—	9

\* Mean and standard deviation of individual parasite load recovered after 30 days of infection from nonimmunized (control) and immunized mice.

† PE = (n in control mice) - (n in immunized mice) / (n in control mice).

‡ Total antigens include antigens of high and low molecular weight in 7% gels.

§ Significant protective differences with control value at 99% confidence level.

Data labeled with the same symbol are not significantly different at 99% confidence level.

Tabla 2. Tomada de Valdez, et al., 1994

adecuado. Por lo tanto, se decidió producirlos por medio de técnicas de DNA recombinante. Para ello, se construyó una biblioteca de cDNA en el vector Uni-ZapXR utilizando RNAm de cisticercos de *T. crassiceps*. Se obtuvieron un total de 180,000 clonas individuales. A partir de esta biblioteca se seleccionaron trece clonas recombinantes las cuales fueron identificadas por medio de inmunodetección utilizando anticuerpos policlonales específicos producidos en conejo 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*, ya que de esta manera se podría asegurar que las clonas codificaban para antígenos de *T. crassiceps* homólogos a los de *T. solium*. Las clonas seleccionadas se denominaron KETc 1, KETc4, KETc7, KETc11 y KETc12. (Manoutcharian, *et al*, 1995; 1996).

Por medio de técnicas de inmunoelectrotransferencia se observó que los anticuerpos contra los antígenos codificados por cada una de estas clonas, fueron capaces de reconocer antígenos específicos presentes en el fluido vesicular de cisticercos de *T. crassiceps*. Estos anticuerpos purificados utilizando los propios antígenos transferidos, reconocieron específicamente a los antígenos nativos de 56 y 74 kDa. Esto nos confirmó que los 5 antígenos recombinantes representan al menos parte de los antígenos incluidos en las fracciones antigénicas protectoras.

Posteriormente, se evaluó la eficacia de las proteínas recombinantes en la prevención de la cisticercosis procediendo a la vacunación de ratones de cepa susceptible BALB/cAnN (Manoutcharian *et al.*, 1995; 1996). En los ratones vacunados con lisados de las clonas KETc1, KETc4, KETc7 y KETc12 se observaron diferentes niveles de protección contra la cisticercosis murina causada por *T. crassiceps* (Tabla 3, Manoutcharian *et al.*, 1996).

Con el propósito de identificar las regiones antigénicas protectoras en estos antígenos recombinantes; se comenzó a analizar la secuencia del antígeno

TABLE II. Effect of immunization against *T. crassiceps* cysticercosis in BALB/cAnN mice.\*

Group	Mean number of the parasite load. ± standard deviation (% protection)	
	Female	Male
Control	61.3 ± 29.7	28.2 ± 18.4
Immunized with soluble antigens from crude lysates of:		
KETc1	28.5 ± 17.5† (53.5%)	6.6 ± 4.7† (76%)
KETc4	22.0 ± 15.9† (64.1%)	N.D.
KETc7	42.5 ± 6.4 (30.5%)	7.6 ± 7.6† (73%)
KETc11	46.0 ± 17.4 (24.9%)	40.6 ± 22.2† (-44%)
KETc12	26.3 ± 7.2† (57.1%)	4.4 ± 5.3† (84.4%)

\* Fifty days after immunization with the recombinant antigen in FCA, mice were challenged with 10 cysticerci each and killed 30 days later. Control mice were immunized with crude lysate from  $\lambda$  phage without insert emulsified in FCA. Groups of 5 males and 8 females were used. N.D.—not determined.  
 † Significantly different from control mice at  $P < 0.05$ .

Tabla 3. Tomada de Manoutcharian, *et al.*, 1996.

KETc7. En base a su secuencia que consta de 100 aminoácidos se realizó una predicción teórica de las regiones de mayor antigenicidad de este polipéptido (Gevokian *et al.*,1996). Por medio de esta predicción se seleccionaron tres regiones que se denominaron GK-1, GK-2, y GK-3 y fueron sintetizados químicamente. Se confirmó su antigenicidad utilizando un panel de sueros de individuos infectados (humanos, cerdos) con *T. solium* y con sueros de ratones parasitados con *T. crassiceps* (Gevokian *et al.*,1996). Los tres péptidos fueron reconocidos por individuos cisticercosos y no así por no infectados (Figura 4, Gevorkian *et al.*, 1996).

Teniendo como evidencia de que estos tres péptidos fueron ampliamente reconocidos por individuos infectados (Gevokian *et al.*,1996), en el presente trabajo nos propusimos evaluar la capacidad protectora de los péptidos, así como la respuesta inmune asociada a protección, utilizando para esto el modelo de cisticercosis murina.

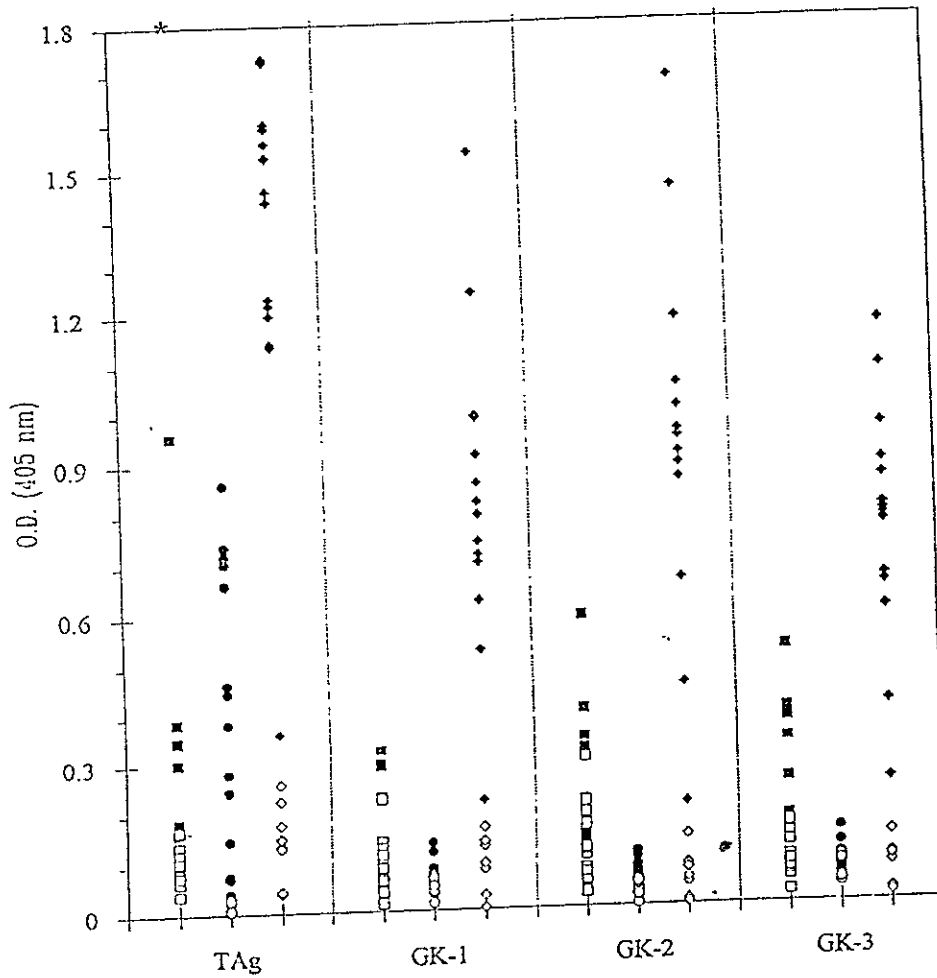


Fig. 2. ELISA absorbance values for individual mice (cestode-free (◇) and *Taenia crassiceps*-infected (◆)), pigs (normal control (□) and *T. solium*-infected (■)) and humans (healthy (○) and with confirmed neurocysticercosis (●)), using synthetic peptides GK-1, GK-2 and GK-3, as well as vesicular fluid from the cysticerci of *T. crassiceps* (TAg).

Figura 4. Tomado de Gevorkian et al., 1996.

### 3. OBJETIVOS.

#### *Generales.*

- Identificar epítopes protectores incluidos en el antígeno recombinante KETc7 y evaluar la capacidad protectora utilizando el modelo murino de cisticercosis.
- Evaluar la respuesta inmune asociada a los péptidos que resulten protectores.

#### *Particulares.*

- Identificar en el modelo murino de cisticercosis la capacidad protectora de la inmunización con los péptidos GK-1, GK-2, GK-3, utilizando para ello diferentes protocolos de inmunización:

Dosis: 1, 10, 50  $\mu$ g de péptido por ratón.

El uso de diferentes acarreadores como son BSA y un sistema multiantigenico de péptidos (MAP) acoplados a los péptidos.

Número de inmunizaciones, así como el tiempo entre cada una de ellas.

- Inmunolocalización de los diferentes epítopes en las distintas fases del desarrollo de la *T. solium* (huevo, cisticerco y adulto), así como en cisticercos de *T. crassiceps*.
- Evaluar las características fisicoquímicas del péptido GK-1, a fin de poder predecir sus posibles interacciones con moléculas de tipo inmunológico como son anticuerpos, receptores celulares o con moléculas del Complejo Principal de Histocompatibilidad.





#### 4. MATERIALES Y METODOS; RESULTADOS

A continuación se presenta el artículo enviado y aceptado para su publicación que incluye los principales materiales-metodos y resultados, obtenidos durante el desarrollo de esta tesis.

I. Towards a *Taenia solium* cysticercosis vaccine: An epitope shared by *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* protects mice against experimental cysticercosis.

**Andrea Toledo**, Carlos Larralde, Gladis Fragoso, Goar Gevorkian, Karen Manoutcharian, Marisela Hernández, Gonzalo Acero, Gabriela Rosas, Fernando Lopez-Casillas , Carlos Kubli Garfias, Ricardo Vazquez, Ignacio Terrazas and Edda Sciutto. (*Infection and Immunity*, en prensa).

## Towards a *Taenia solium* Cysticercosis Vaccine: an Epitope Shared by *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* Protects Mice against Experimental Cysticercosis

ANDREA TOLEDO,<sup>1</sup> CARLOS LARRALDE,<sup>1</sup> GLADIS FRAGOSO,<sup>1</sup> GOAR GEVORKIAN,<sup>1</sup>  
KAREN MANOUTCHARIAN,<sup>1</sup> MARISELA HERNÁNDEZ,<sup>1</sup> GONZALO ACERO,<sup>1</sup>  
GABRIELA ROSAS,<sup>1</sup> FERNANDO LÓPEZ-CASILLAS,<sup>2</sup> CARLOS KUBLI GARFIAS,<sup>1</sup>  
RICARDO VÁZQUEZ,<sup>1</sup> IGNACIO TERRAZAS,<sup>1</sup> AND EDDA SCIUTTO<sup>1\*</sup>

Department of Immunology, Instituto de Investigaciones Biomédicas,<sup>1</sup> and  
Instituto de Fisiología Celular,<sup>2</sup> UNAM, México D.F. 04510, México

Received 14 August 1998/Returned for modification 7 October 1998/Accepted 14 January 1998

The *Taenia crassiceps* recombinant antigen KETc7 has been shown to be effective as a vaccine against experimental murine cysticercosis, a laboratory model used to test potentially promising molecules against porcine *Taenia solium* cysticercosis. Based on the deduced amino acid sequence of this proline-rich polypeptide, three fragments, GK-1, GK-2, and GK-3, were chemically synthesized in linear form. Of the three peptides, only GK-1 induced sterile protection against *T. crassiceps* cysticercosis in 40 to 70% of BALB/cAnN male mice. GK-1 is an 18-amino-acid peptide which contains at least one B-cell epitope, as demonstrated by its ability to induce an antibody response to the peptide and *T. crassiceps* antigen without need of a carrier protein. Immunofluorescence studies revealed that anti-GK1 antibodies strongly react with the native protein in the tegument of *T. crassiceps* and also with anatomical structures of *T. solium* eggs, oncospheres, cysticercus, and tapeworm. GK-1 also contains at least one T-cell epitope, capable of stimulating the proliferation of CD8<sup>+</sup> and to a lower extent CD4<sup>+</sup> T cells primed either with the free peptide or *T. crassiceps* total antigen. The supernatant of the stimulated cells contained high levels of gamma interferon and low levels of interleukin-4. Similar results were obtained with T cells tested for intracellular cytokine production, an indication of the peptide's capacity to induce an inflammatory response. The remarkable protection induced by GK-1 immunization, its physicochemical properties, and its presence in all developmental stages of *T. solium* point to this synthetic peptide as a strong candidate in the construction of a synthetic vaccine against *T. solium* pig cysticercosis.

*Taenia solium* cysticercosis is highly prevalent in humans and pigs in Latin America, Asia, and Africa (24) and has serious health and economic consequences (10). Although cysticercosis has been practically eradicated in developed countries, it is a major concern in the developing world and of consideration as a reemerging disease in the United States because of immigration from areas where the disease is endemic (20). Moreover, a recent publication indicates that European countries may not be totally rid of human neurocysticercosis caused by *T. solium* (26). The life cycle of this parasite includes a larval (cysticercus) phase affecting both pigs and humans after ingestion of eggs present in human feces. The eggs are produced by the adult tapeworm localized in the gut of humans who ingested live cysticerci present in improperly cooked pork meat. The tapeworm produces millions of eggs that are passed to the environment. Transmission is thus clearly related to prevailing low sanitary standards in personal hygiene and environmental control and also with rustic rearing of pigs in impoverished sectors of the rural population. Control of transmission by general improvement of the social, economic, and educational status of developing countries is not within reach in the near future. But since the pig is an indispensable intermediate host, transmission could be reduced by lowering the prevalence of pig cysticercosis through vaccination. Development of an ef-

fective vaccine for use in pigs is being pursued by a number of scientists (14, 16, 23).

Because experimentation leading to a vaccine against porcine cysticercosis is hampered by the high cost and slow data retrieval involved in testing pigs, another cestode, *Taenia crassiceps*, which exhibits extensive antigen similarities with *T. solium* and whose metacystodes easily and rapidly develop in the peritoneal cavity of mice (3, 7, 10), has been used as an experimental model to test and screen promising antigens before testing them in pigs (11, 12, 22, 28). Thus, we have shown that total *T. crassiceps* antigens can partially protect pigs against *T. solium* cysticercosis; however, the effects of vaccination with antigen extracts depended on the dose used, some being protective while others led to facilitation of the infection (23), a finding that oriented our research to the identification of individual protective antigens and their peptidic epitopes (11, 12, 28). We identified and cloned four recombinant *T. crassiceps* antigens (KETc1, -4, -7, and -12) which conferred to mice different levels of resistance to murine cysticercosis (12). The antigenicity profile of the deduced 100-amino-acid sequence of the KETc7 clone was structurally assessed to detect potentially immunologically active epitopes (8). Three of the peptide candidates of KETc7 (GK-1, GK-2, and GK-3) were chemically synthesized, and their antigenicity was tested with sera from *T. solium*- and *T. crassiceps*-infected hosts (humans, pigs, and mice). Since the three peptides were extensively reactive with these sera (8), we assessed their protective capacity and studied the immune response that they elicit in immunized mice. We also searched for the peptide's presence in *T. solium* specimens to obtain indications as to its potential inclusion in a

\* Corresponding author. Mailing address: Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, A.P. 70228, México D.F., 04510 México. Phone: (5) 6223818. Fax: (5) 6223369. E-mail: edda@servidor.unam.mx.

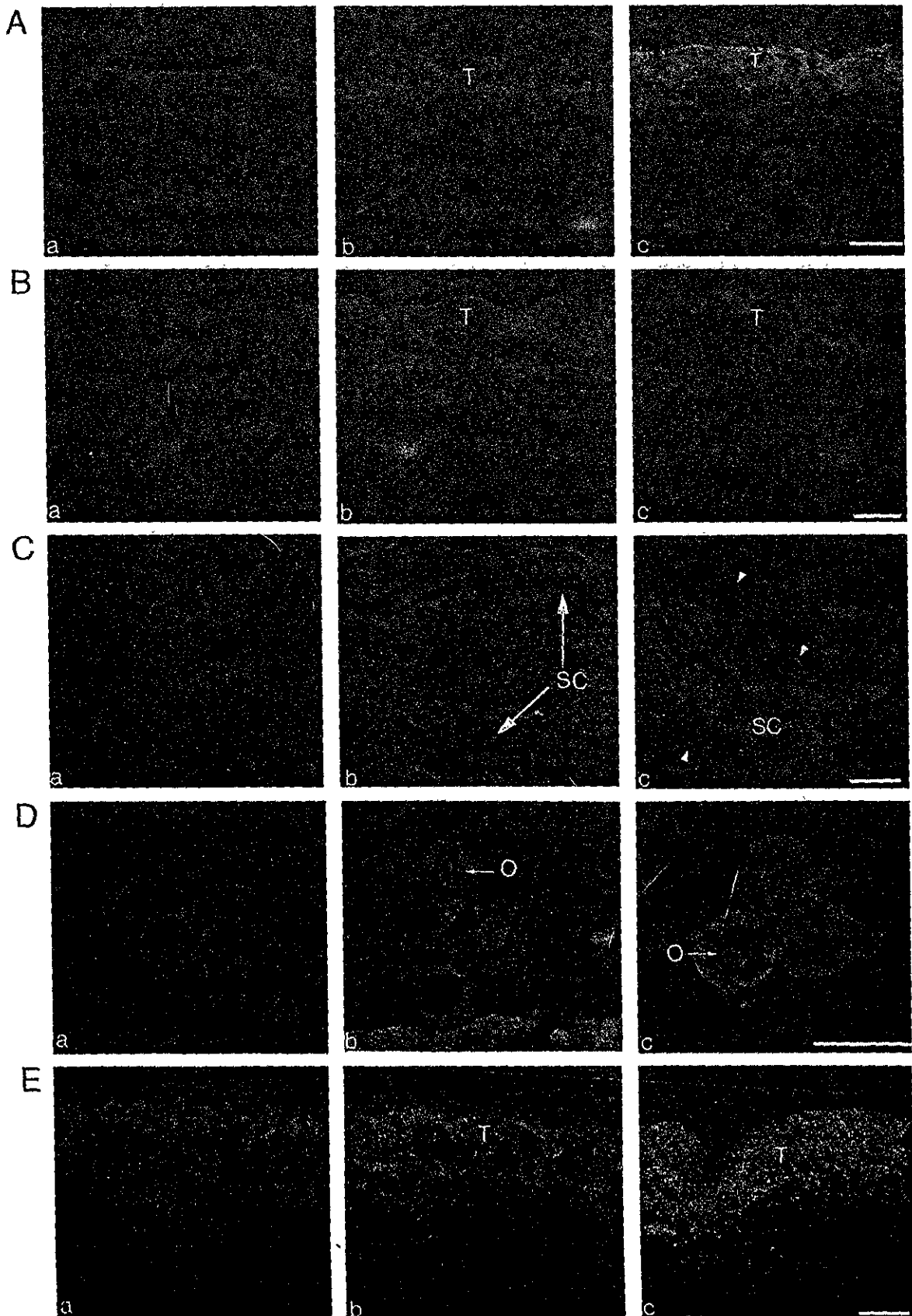


FIG. 1. Immunofluorescence staining of *T. crassiceps* (A) and *T. solium* (B and C) cysticerci and of eggs (D) and adult tegument (E) of *T. solium*, incubated with sera from normal mice (a), 30-day *T. crassiceps*-infected mice (b), and pooled sera obtained 15 days after the booster of GK-1 (c). The labeled epitope is clearly evident in structures accessible to the immune system. It is intensively expressed in the tegument (T) of *T. crassiceps* cysticerci (A, panel c) and weakly in the *T. solium* cysticerci (B, panel c). It is strongly expressed in the cuticular folds of the spiral canal (SC) (C, panel c), in the oncosphere (O) (D, panel c), and in the distal tegument (T) of the tapeworm (E, panel c). The arrowheads (C, panel c) indicate the protonehridia. Bars = 40  $\mu$ m.

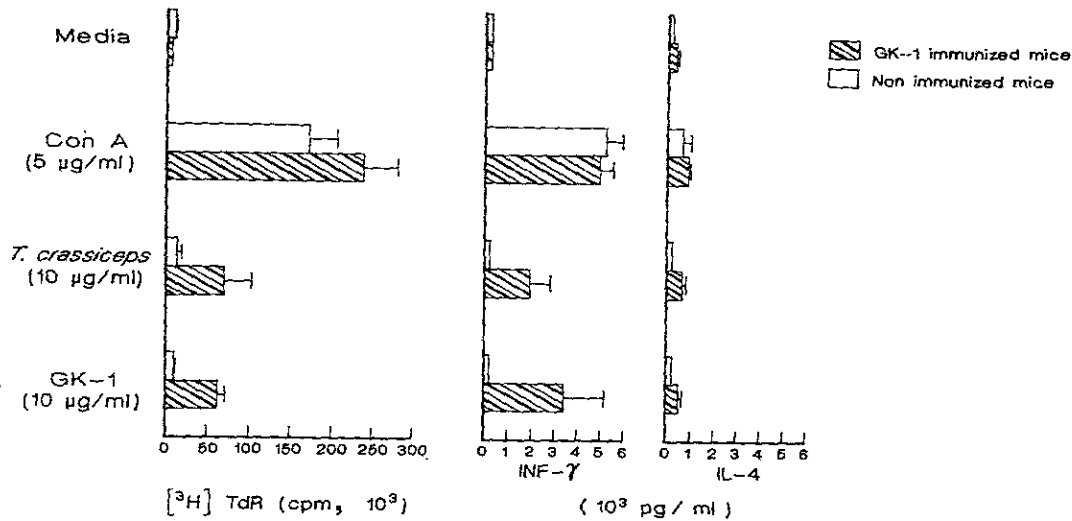


FIG. 2. T-cell proliferative response of spleen cells from nonimmunized (injected with saponin alone) and immunized mice determined by [ $^3\text{H}$ ]thymidine incorporation on day 3 of culture. Data presented are means  $\pm$  standard deviations for four individual mice separately assayed. Cytokine (IFN- $\gamma$  and IL-4) production was determined in collected cultured supernatant obtained 72 h poststimulation. Data are the means for four mice and are representative of two experiments performed in duplicate. Significantly increased proliferative response and IFN- $\gamma$  levels were achieved when cells from immunized mice were stimulated both with *T. crassiceps* antigens and GK-1 peptide.

GK-2 and GK-3 peptides did not confer protection, whereas three of five mice immunized with GK-1 were completely protected at a dose of 50  $\mu\text{g}$  per mice. To further evaluate this protective capacity, free GK-1 as well as BSA-GK-1 and MAP-GK-1 emulsified in saponin were used for immunization in several repeated experiments. Table 2 confirms, in several instances, the high level of protection induced by GK-1 when used as an immunogen either free of carrier or conjugated to BSA. Mice immunized with MAP-GK-1 did not show reduced mean parasite intensity, although some mice were totally protected.

**Determination of B-cell epitope(s) on GK-1.** To test for the presence of a B-cell epitope(s) on the GK-1 peptide, we studied whether GK-1 immunization induced antibodies against the peptide and against whole *T. crassiceps* antigen by ELISA. Mice immunized with the monomeric nonconjugated form of GK-1 produced low but detectable levels of serum antibodies that reacted with GK-1 as well as with *T. crassiceps* in ELISA (Table 3). The examination of anti-GK-1 antiserum reactivity against histological sections of *T. crassiceps* revealed that these antibodies specifically react with *T. crassiceps* cysticerci at the tegument of the parasite. Furthermore, the anti-GK-1 antisera also reacted with all developmental stages of *T. solium* (Fig. 1). A clear reaction was detected in the oncosphere contained inside the eggs and also in the egg wall. In *T. solium* cysticerci

the reacting protein is concentrated in the spiral canal, while in the tapeworm it is located throughout the distal tegument. The specificity of all of these antibody reactions in ELISA and immunofluorescence was demonstrated by specific preabsorption of antisera with free GK-1 and lack of reactivity of normal mouse serum.

**Assessment of T-cell epitopes on the GK-1 peptide.** To identify the presence of a T-cell epitope(s) on the GK-1 peptide, we studied the proliferative response of spleen cells from mice treated with GK-1 or saponin alone. Spleen cells from mice injected in vivo with free peptide or saponin were stimulated in vitro with the same peptide (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), with *T. crassiceps* whole antigen (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), or with ConA (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) as a positive control. Results show that in vitro stimulation with GK-1 as well as with cysticercal antigens induced a strong proliferative response in cells from GK-1 immunized mice (Fig. 2). Cells from mice injected with saponin (nonimmunized mice) showed no proliferative response above background levels. These results confirm the presence in GK-1 of T-cell epitope(s).

As Table 4 shows, the proportion of CD3 $^+$  T cells from GK-1-immunized mice increased from 39.9 to 58.7 or 54.7% and the proportion of CD8 $^+$  cells increased from 12.2 to 19.3 or 20.4% when cells were activated with GK-1 or antigen, respectively. The proportion of CD4 $^+$  cells increased only from

TABLE 4. Flow cytometer analysis of spleen cells from nonimmunized and GK-1-immunized mice<sup>a</sup>

Incubation with:	Mean % positive cells <sup>b</sup>					
	Controls			Immunized mice		
	CD3 $^+$	CD4 $^+$	CD8 $^+$	CD3 $^+$	CD4 $^+$	CD8 $^+$
Medium	38.8 $\pm$ 2.7	26.4 $\pm$ 0.8 (5.7)	10.9 $\pm$ 0.8 (5.1)	39.9 $\pm$ 4.0	28.3 $\pm$ 1.2 (5.8)	12.2 $\pm$ 1.2 (4.5)
GK-1	38.5 $\pm$ 2.2	26.6 $\pm$ 2.08 (4.9)	11.7 $\pm$ 1.0 (4.3)	58.7 $\pm$ 4.9 <sup>b</sup>	32.6 $\pm$ 2.6 <sup>b</sup> (91.1)	19.3 $\pm$ 2.3 <sup>b</sup> (93.9)
Cysticercal antigens	35.2 $\pm$ 2.1	24.3 $\pm$ 0.9 (4.7)	10.5 $\pm$ 0.6 (3.9)	54.7 $\pm$ 6.5 <sup>b</sup>	32.7 $\pm$ 2.9 <sup>b</sup> (86.6)	20.4 $\pm$ 3.7 <sup>b</sup> (89.5)

<sup>a</sup> Flow cytometer analysis was performed on spleen cells of nonimmunized and GK-1-immunized mice after 3 days of culture without or with GK-1 or *T. crassiceps* cysticercal antigens. Each value represents the percentage of positive cells from four individual mice and is representative of two experiments performed in duplicate. The percentage of CD4 $^+$  or CD8 $^+$  cells that also expressed CD25 $^+$  is given in parentheses.

<sup>b</sup> Significant increase in the percentage of CD8 $^+$ , CD4 $^+$ , and CD3 $^+$  cells in specifically stimulated immune mice compared with nonimmunized mice ( $P < 0.05$ ).

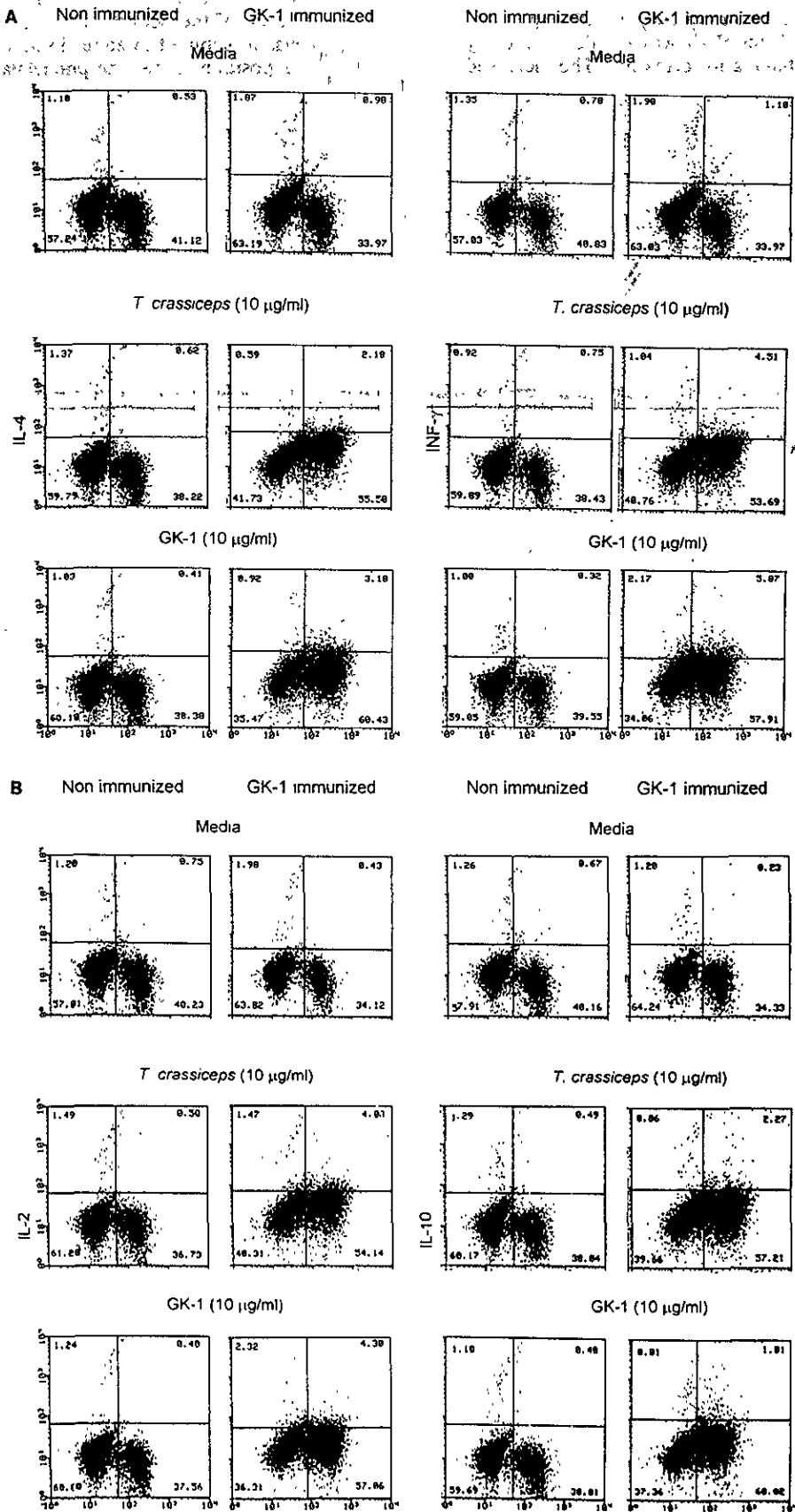


FIG. 3. Spleen lymphocytes from nonimmunized (injected with saponin alone) and GK-1-immunized mice 60 h poststimulation were analyzed for intracellular cytokines (IFN- $\gamma$  and IL-4 [A] and IL-2 and IL-10 [B]) and surface CD3<sup>+</sup> staining by FACS. Cells had been dually stained with FITC (abscissa) and PE (ordinate). The percentage of cells in each quadrant of the dot plot is indicated. The data are representative of three experiments using different mice.



FIG. 4. (a) Amino acid arrangement of GK-1 and its optimized geometry. The red arrow shows the dipole moment pointing the vector's negative end toward tyrosine. (b) Space-filling model of GK-1, showing different degrees of hydrophobicity (red) or hydrophilicity (blue). (c) The encoded electronic density elicited by the molecule and its calibration bar at the right, where oxygen atoms display red while negative zones corresponding to lone pairs of electrons in atoms show as yellow. (d) The bulk of electrostatic potential emerging mostly from the negative zones of the electron density surface.

28.3 to 32.6 or 32.7%. Interestingly, most of the T-stimulated cells ( $CD8^+$  and  $CD4^+$ ) from immunized mice were also  $CD25^+$ .

Next, we determined the level of secreted cytokines in the supernatant of in vitro-stimulated spleen cells. Splenocytes from nonimmunized control mice produced a small amount of IL-4 and IFN- $\gamma$  that increased only after stimulation with ConA. In contrast, a clearly increased amount of IFN- $\gamma$  and a low amount of IL-4 were found after stimulation of the splenocytes of GK-1-immunized mice both with GK-1 and with whole cysticercal antigens (Fig. 2). The frequency of cells capable of producing IL-4, IFN- $\gamma$ , IL-2, and IL-10 was also determined by FACS after intracellular staining for cytokines. The increased

percentage of cells producing IFN- $\gamma$  and IL-4 determined by FACS was found to be consistent with ELISA analysis of the supernatants. Figure 3 shows that frequencies of cells producing IFN- $\gamma$  and IL-2 were significantly higher among *T. crassiceps* antigen- or GK-1-stimulated cells from immunized mice than among cells from nonimmunized mice; levels of IL-4 and IL-10 were also increased, albeit to lesser extents.

**GK-1 physicochemical properties.** The dipole moment was directed toward the tyrosine end of GK-1. The octanol/water partition coefficient of the peptide was 7.92. However, its hydrophobicity was distributed in zones in accordance with the amino acid composition. Thus, the phenylalanine region was

the most hydrophobic, while alanine was the most hydrophilic and the glycine end was more hydrophobic than the tyrosine end. Planar rings from the tyrosine and phenylalanine showed high electron density. However, the higher electron density was observed for the oxygen atoms belonging to the carbonyl and hydroxy functional groups. Interestingly, the electrostatic potentials were displayed emerging mostly from these functional groups. Figure 4 shows the physicochemical properties of GK-1.

## DISCUSSION

High levels of sterile immunity to experimental *T. crassiceps* cysticercosis were conferred to male mice immunized with a synthetic 18-amino-acid peptide (GK-1) from the recombinant protein KETc7 of the parasite (12). The proportion of totally protected mice varied in experiments performed on different occasions from 40 to 70%, while the average decrement in the immunized group's parasite intensity was 85 to 95% of that expected from challenged control male mice. Variation in parasite intensity within experimental groups and between experimental sessions is a common finding in this form of cysticercosis due to factors not fully identified but that we attribute to variation in infectivity of each parasite harvest and inoculum. The statistical validity of the inferences drawn from these experiments is, however, not weakened if each experimental session includes its own internal control. Coupling of GK-1 to BSA or rearranging the peptide in an eight-pointed MAP construct did not result in an increased immunogenicity of the peptide and may in fact have reduced it somewhat.

Sterile immunity is seldom induced in this form of cysticercosis by purified, natural, or recombinant antigens (10, 22, 28); however, GK-1 induced levels of protection higher than those observed with the whole KETc7 recombinant protein published elsewhere (12). Research into the reasons why this peptide is so effective relative to other forms of antigen preparation, including the complete recombinant antigen KETc7 from which the peptide is derived (12), could perhaps reveal general principles of immunogenicity applicable to this and other vaccine preparations. Assuming that the binding properties of GK-1 to antibodies and cellular receptors relate to its immunogenicity, and since these depend on its stereoelectronic properties, the high dipole moment and the asymmetry in the electronic distribution of GK-1 are noteworthy. Moreover, GK-1 showed high hydrophobic areas alternating with hydrophilic ones (Fig. 4b); this dual hydrophilic-hydrophobic property offers interesting possibilities of water and lipid interaction that may facilitate the peptide's reaction with B and T membrane-bound receptors. The external distribution of the hydroxyl groups favors water or hydrogen bonding, judging from the rich and complex electrostatic potential of these hydrophilic groups, while the abundance of aromatic amino acids in GK-1 defines steric regions with high noncovalent electrostatic interactions capable of enhancing binding affinity that could also favor the peptide presentation by antigen-presenting cells (18). The alteration of peptide immunogenicity by the structural changes imposed by chemical coupling to BSA and the MAP construction also points to a strong structure dependence of its biological functions. GK-1's electronic polarity, adequately positioned anchor motifs, and similarities to motifs reactive with class I major histocompatibility complex molecules may explain the peptide's ability to induce a CD8<sup>+</sup> proliferative response (18). The involvement of a B-cell response after immunization is documented by the presence of serum-specific anti-GK-1 antibodies in immunized mice. Immune reactivity against the whole-parasite antigens was greater than that against the GK-1 peptide itself, probably because of loss of

reactivity of GK-1 once bound to the plate. T-cell involvement is shown by the in vitro proliferative assays with spleen cells from GK-1-immunized mice, which strongly responded to both GK-1 and cysticercal antigens probably favored by the increased percentage of T cells producing IL-2. The composition of the resultant lymphocyte population was most significantly enriched in CD8<sup>+</sup> cells. Although the direct participation of a cytotoxic response in the control of the parasite's reproduction remains to be thoroughly elucidated, the immune response elicited by this peptide features a prominent CD8<sup>+</sup> T-cell response. Other factors contributing to parasite damage may be related to IFN- $\gamma$ , a cytokine that plays a central role in cell-mediated effector mechanisms in the protection observed in mice vaccinated against other parasites (5). The large amount of IFN- $\gamma$  detected by ELISA, as well as the increased percentage of CD3<sup>+</sup> cells that produced this cytokine, could induce the inflammatory response and the activation of macrophages at the parasite's vicinity (15). All of these data are also consistent with the low levels of antibodies induced by GK-1 immunization, which can be the consequence of low levels of IL-4 and IL-10. As Table 4 shows, the existence of a specific T-cell response in GK-1-immunized mice and not in those immunized with saponin alone was also demonstrated by the increased expression of a cell surface activation marker (CD25<sup>+</sup>) following antigen- or peptide-specific reactivation in vitro. The immune protection induced by GK-1 immunization and the polarized cytokine phenotype induced are in keeping with recent trends in opinion about immune resistance to metacystode diseases, which place Th1 cells in the forefront of protection (27), and add to well-established views that stress the role of antibody only in the destruction of early larvae developing from egg infection (21). These two mechanisms are, of course, not incompatible, and GK-1's high protective efficiency may well result from the synergic action of its capacity to trigger both B- and T-cell immune responses.

Another feature of GK-1 that deserves mention is that it is represented in an antigen fraction of 56 kDa in *T. crassiceps* cysticerci which induces high levels of protection against *T. solium* pig cysticercosis (28). This GK-1 peptide is also recognized by sera from *T. solium*-infected humans (8). Furthermore, the identification of GK-1 by immunofluorescence at all stages of *T. solium*—infecting egg, hexacanth embryo, metacystode, and tapeworm—make GK-1 a likely effective target for immune attack and an interesting candidate for a vaccine against *T. solium* cysticercosis.

## ACKNOWLEDGMENTS

This investigation was supported by Dirección General de Asuntos de Personal Académico IN208395 and IN212798, Universidad Nacional Autónoma de México, and CONACYT G25955m, México, Fundación Miguel Alemán.

We thank Felipe Massó for performing the peptide sequence analysis, Nelly Villalobos for obtaining the *T. solium* tapeworm, and Carlos Castellanos and Mercedes Baca for technical support. Isabel Pérez Montfort aided in translation of the manuscript.

## REFERENCES

- Burkert, U., and N. L. Allinger. 1982. Molecular mechanics. ACS monograph. American Chemical Society, Washington, D.C.
- Committee on Care and Use of Laboratory Animals. 1996. Guide for the care and use of laboratory animals. Institute of Laboratory Animal Resources, National Research Council, Washington, D.C.
- Dewar, M. J. S., E. G. Zebisch, E. F. Healy, and J. P. Stewart. 1985. AM1: a new general purpose quantum mechanical molecular model. *J. Am. Chem. Soc.* 107:3902-3909.
- Dornis, F. J., and G. W. Esch. 1969. Growth rates of two *Taenia crassiceps* strains. *Exp. Parasitol.* 25:395-398.
- Elsom, L. H., T. B. Nutman, D. D. Metenfe, and C. Prussin. 1995. Flow



- cytometric analysis for cytokine production identifies Th1, Th2 and Th0 cells within the human CD4+ CD27- lymphocyte subpopulation. *J. Immunol.* 154:4294-4301.
5. Ferru, Y., B. Georges, J. Estaquier, M. Delacre, D. A. Harn, A. Tartar, A. Capron, H. Grassmasse, and C. Auriault. 1997. Analysis of the immune response elicited by a multiple antigen peptide (MAP) composed of two distinct protective antigens derived from the parasite *Schistosoma mansoni*. *Parasite Immunol.* 19:1-11.
  6. Fragoso, G., E. Lamoyi, A. Mellor, C. Lomeli, M. Hernández, and E. Sciuotto. 1998. Increased resistance to *Taenia crassiceps* murine cysticercosis in Qa-2 transgenic mice. *Infect. Immun.* 66:760-764.
  7. Freeman, R. S. 1962. Studies on the biology of *Taenia crassiceps* (Zeder, 1800) Rudolphi, 1810 (Cestoda). *Can. J. Zool.* 40:969-990.
  8. Gevorkian, G., K. Manoutcharian, C. Larralde, M. Hernández, J. C. Almagro, M. Viveros, J. Sotelo, E. Garcia, and E. Sciuotto. 1996. Immunodominant synthetic peptides of *Taenia crassiceps* in murine and human cysticercosis. *Immunol. Lett.* 49:185-189.
  9. Larralde, C., R. M. Montoya, E. Sciuotto, M. L. Díaz, T. Govezensky, and E. Coltorti. 1989. Deciphering Western blots of tapeworm antigens (*T. solium*, *E. granulosus* and *T. crassiceps*) reacting with sera from neurocysticercosis and hydatidic disease patients. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 40:282-290.
  10. Larralde, C., A. Padilla, M. Hernández, T. Govezensky, E. Sciuotto, G. Gutiérrez, R. Tapia-Conyer, B. Salvatierra, and J. Sepúlveda. 1992. Seroepidemiología de la cisticercosis en México. *Salud Pública Méx.* 34:197-210.
  11. Manoutcharian, K., C. Larralde, A. Aluja, G. Fragoso, G. Rosas, M. Hernández, N. Villalobos, L. F. Rodarte, T. Govezensky, M. Baca, and E. Sciuotto. 1995. Advances in the development of a recombinant vaccine against *Taenia solium* pig cysticercosis, p. 63-68. In R. M. Chanock, F. Brown, H. S. Ginsberg, and E. Norrby (ed.), *Vaccines 95*. Cold Spring Harbor, Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
  12. Manoutcharian, K., G. Rosas, M. Hernández, G. Fragoso, A. Aluja, N. Villalobos, L. F. Rodarte, and E. Sciuotto. 1996. Cysticercosis: identification and cloning of protective recombinant antigens. *J. Parasitol.* 82:250-254.
  13. McColm, A. A., R. Bomford, and L. Dalton. 1982. A comparison of saponin with other adjuvants for the potentiation of protective immunity by a killed *Plasmodium yoelii* vaccine in the mouse. *Parasite Immunol.* 4:337-347.
  14. Molinari, J. L., D. Rodríguez, P. Tato, R. Soto, F. Arechavaleta, and S. Solano. 1997. Field trial for reducing porcine *Taenia solium* cysticercosis in Mexico by systematic vaccination of pigs. *Vet. Parasitol.* 69:55-63.
  15. Mosmann, T. R., L. Li, and S. Subash. 1997. Functions of CD8 T cells subset secreting different cytokine patterns. *Semin. Immunol.* 9:87-92.
  16. Nascimento, E., J. O. Costa, M. P. Guimarães, and C. A. Tavares. 1995. Effective immune protection of pigs against cysticercosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 48:127-137.
  17. Parkhouse, R. M., and L. J. Harrison. 1989. Antigens of parasitic helminths in diagnosis, protection and pathology. *Parasitology* 99:S5-S19.
  18. Rammensee, H. G., T. Friede, and S. Stevanovic. 1995. MHC ligands and peptide motifs: first listing. *Immunogenetics* 41:178-228.
  19. Ramos-Kuri, M., M. R. Montoya, A. Padilla, T. Govezensky, M. Díaz, E. Sciuotto, J. Sotelo, and C. Larralde. 1992. Immunodiagnosis of neurocysticercosis. *Arch. Neurol.* 49:633-636.
  20. Richards, F., Jr., and P. Schantz. 1991. Laboratory diagnosis of cysticercosis. *Clin. Lab. Med.* 11:1011-1028.
  21. Rickard, M. E., and J. F. Williams. 1982. Hydatidosis/cysticercosis: immune mechanisms and immunization against infection. *Adv. Parasitol.* 21:229-296.
  22. Sciuotto, E., G. Fragoso, L. Trueba, D. Lémus, R. M. Montoya, M. L. Díaz, T. Govezensky, C. Lomeli, G. Tapia, and C. Larralde. 1990. Cysticercosis vaccine: cross-protecting immunity with *T. solium* antigens against experimental murine *T. crassiceps* cysticercosis. *Parasite Immunol.* 12:687-696.
  23. Sciuotto, E., A. Aluja, G. Fragoso, L. F. Rodarte, M. Hernández, M. N. Villalobos, A. Padilla, N. Keilbach, M. Baca, T. Govezensky, S. Díaz, and C. Larralde. 1995. Immunization of pigs against *Taenia solium* cysticercosis: factors related to effective protection. *Vet. Parasitol.* 60:53-67.
  24. Sotelo, J., O. del Bruto, and G. Román. 1996. Cysticercosis. *Curr. Clin. Trop. Infect. Dis.* 16:240-259.
  25. Tam, J. P. 1994. Immunization with peptide carrier complexes: traditional and multiple antigen peptide system, p. 83-115. In G. B. Wisdom (ed.), *Peptide antigens*. Oxford University Press, New York, N.Y.
  26. Tamburrini, A., M. A. Gomez Morales, and E. Pozio. 1995. Development of an immunoenzyme test for the diagnosis of human cysticercosis using a heterologous antigen. *Parasitologia* 37:195-198.
  27. Terrazas L. L., R. Bojalil, T. Govezensky, and C. Larralde. 1998. Shift from an early protective TH1-type immune response to a late permissive TH2-type response in murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). *J. Parasitol.* 84:74-81.
  28. Valdez, F., M. Hernández, T. Govezensky, G. Fragoso, and E. Sciuotto. 1994. Immunization against *Taenia crassiceps* cysticercosis. Identification of the most promising antigens in the induction of protective immunity. *J. Parasitol.* 80:931-936.

Editor: J. M. Mansfield

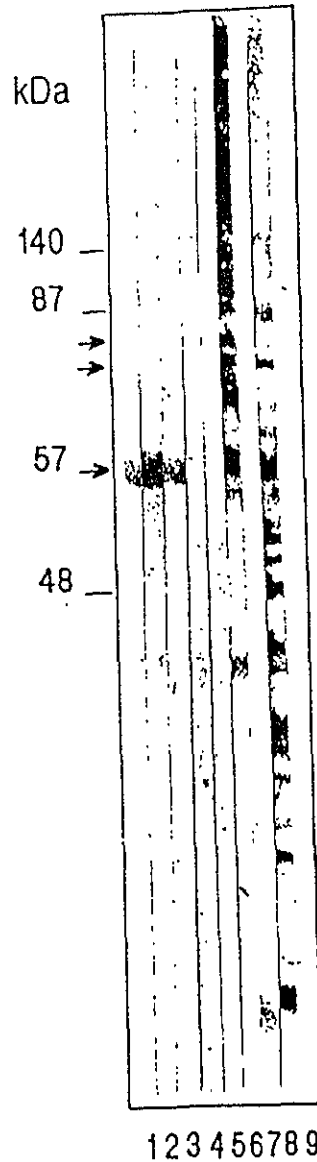


FIGURE 1. Identification of native proteins of *T. crassiceps* cysticerci encoded by the recombinant clones by western blot of vesicular fluid antigens. Lanes probed with: rabbit anti-56-kDa antibodies affinity-purified from clone KETc 1 (1), from clone KETc 4 (2), and from clone KETc 7 (3), and rabbit anti-74-kDa antibodies affinity-purified from clones KETc11 (4) and from clone KETc12 (5). Lanes 6 and 7 were probed with pooled serum from pigs infected or noninfected with *T. solium*, respectively. Lanes 8 and 9 were probed with pooled serum of mice infected or noninfected with *T. crassiceps*, respectively.

Figura 5. Tomado de Manoutcharian, *et al.*, 1996.

## 5. DISCUSIÓN

En el presente trabajo de tesis se reporta la identificación de un epítipo protector GK-1 así como la respuesta inmune asociada a esta protección.

Con base a la secuencia del antígeno recombinante KETc7 y con el propósito de identificar las posibles regiones antigénicas protectoras se procedió a analizar su secuencia completa obteniéndose como resultado un polipéptido de 100 aminoácidos. Conocer esta secuencia permitió desarrollar diferentes estrategias de inmunización (Rosas *et al.*, 1998; Cruz-Revilla *et al.*, 1999). Una de ellas fue identificar tres epítopes antigénicamente relevantes que fueron denominados GK-1, GK-2 y GK-3 los cuales fueron sintetizados químicamente (Figura 4).

La proteína KETc7 de la cual derivan estos tres epítopes se identificó en una biblioteca de cDNA de cisticercos de *T. crassiceps*, y representa el segmento 3' del gen nativo (Manoutcharian *et al.*, 1996), el cual codifica para una proteína de 56kDa (Figura 5). Cabe señalar el hecho de que esta proteína contiene un porcentaje rico en prolina (35%) en su secuencia, en base a información obtenida del programa PC/Gene Intelligent. Al realizar un alineamiento de esta proteína con otro tipo de proteínas ricas en prolina se encontró que había entre un 30 y 45% de similitud con proteínas denominadas extensinas. Las extensinas se han reportado que se localizan preferentemente en la pared celular de plantas y vegetales. También existen reportes de su existencia en tremátodos como *Schistosoma japonicum* (Bobek *et al.*, 1989,1991), si bien el papel fundamental que juegan en los parásitos no ha sido esclarecido, en plantas se ha reportado como su papel principal la resistencia a patógenos (Mc Neil *et al.*, 1984). Pensando analógicamente, su presencia en el parásito podría implicar tanto funciones en la elongación y crecimiento del mismo como en proteger al parásito del entorno agresivo en el que se desarrolla.

En este trabajo nos planteamos diferentes estrategias para aumentar la inmunogenicidad de estos péptidos como fueron: a) dosis, b) número de inmunizaciones c) la utilización de 2 diferentes adyuvantes y d) el uso de un acarreador como Albumina Serica Bovina (BSA) y un sistema multiantigénico de péptido (MAP).

El contar con los péptidos sintéticos y habiendo confirmado la inmunogenicidad de los tres péptidos nos permitió avanzar en el conocimiento de la respuesta inmune asociada a protección utilizando para ello el modelo de cisticercosis murina.

Todos los experimentos fueron realizados en ratones de la cepa BALB/cAnN machos, inmunizados por vía subcutánea. Como puede observarse en la Tabla I (1<sup>er</sup> artículo) de resultados utilizando tres diferentes dosis de cada uno de los péptidos, GK-2 y GK-3 no confirieron protección alguna en los ratones, si bien el promedio de la carga parasitaria disminuyó con respecto a los animales control, no obtuvimos inmunidad esterilizante en ninguno de los animales inmunizados. Con GK-1 a una dosis de 50µg/ratón 3 de 5 animales se protegieron totalmente, mientras que con la dosis de 10µg/ratón sólo 1 de 5 se protegió totalmente. Sin embargo, en experimentos realizados posteriormente (datos no mostrados) no hubo diferencia significativa utilizando ya sea la dosis de 10µg o de 50µg. De los tres péptidos (GK-1, GK-2 y GK-3), GK-1 indujo inmunidad esterilizante en un 60 % de los ratones inmunizados (Tabla I artículo). Estos resultados fueron confirmados en experimentos posteriores obteniendo niveles de protección que variaron desde un 57% a un 70 %, aún cuando los porcentajes de protección no llegaron a un nivel alto, en el resto de los animales vacunados el promedio de carga parasitaria fue muy bajo (0.71-1.31 parásitos/ratón vs. 6.9-25.1 parásitos/ratón en los no vacunados). Si bien en un principio se utilizó como adyuvante el Adyuvante Completo de Freund, considerando las dificultades de utilizar este adyuvante en experimentos en campo se decidió evaluar la posibilidad de utilizar saponina. Este último resultó inducir pocas dificultades

para la inmunización e inmunopotenciar muy adecuadamente el efecto de la vacunación (datos no mostrados).

Una vez confirmada la protección del péptido GK-1, en experimentos independientes se procedió a la fijación del péptido a diversos acarreadores como son BSA y a MAP para este último el péptido fue preparado como péptido múltiple conteniendo 8 copias de GK-1 pegadas a un centro de lisinas oligomérico contenido en una matriz (Tam, 1994). La fijación del péptido a BSA así como a MAP no mejoró considerablemente su capacidad inmunogénica y de hecho la polimerización de este con MAP redujo importantemente la capacidad de protección (Tabla II, 1<sup>er</sup> artículo). Es probable que esto se deba a las interacciones entre sí mismo en vez de con otras moléculas del sistema inmune a través de interacciones hidrofóbicas entre cadenas.

Como se mencionó anteriormente la proporción de los animales totalmente protegidos varió en cada uno de los experimentos desde un 40 % a un 70 % en tanto que el promedio de la disminución en la intensidad de parásitos en los grupos inmunizados fue de un 85 a un 95% con respecto a los grupos de animales control. La variación en la cantidad de parásitos dentro de los grupos experimentales así como entre cada una de las sesiones de experimentos es un hallazgo común dentro de esta forma de infección por cisticercosis, aún cuando las razones no están totalmente identificadas, este fenómeno se puede atribuir a la variación en la infectividad de cada parásito que es inoculado. Sin embargo, la validez estadística, no se ve atenuada si consideramos que cada sesión experimental se realizó con su propio control interno.

Cabe destacar que no es muy común en esta forma de infección experimental de cisticercosis observar una inmunidad total por la utilización de antígenos naturales, purificados o recombinantes. Sin embargo GK-1 fue capaz de inducir altos niveles de protección, éstos niveles demostraron ser aún más altos que los observados con la proteína recombinante completa KETc7

(Manoutcharian *et al.*, 1996) de la cual GK-1 deriva.

Asumiendo que las propiedades de unión de GK-1 están relacionadas con su inmunogenicidad y que ésta depende de sus propiedades estereoelectrónicas, es de interés notar el alto momento dipolar y la asimetría en la distribución de electrones que presenta GK-1. GK-1 muestra zonas altamente hidrofóbicas las cuales se encuentran alternadas con zonas muy hidrofílicas (Figura 4, 1<sup>er</sup> artículo), esta dualidad de propiedades hidrofóbica-hidrofílica puede dar como resultado interacciones agua-lípido que pueden favorecer al péptido en su interacción con receptores B y T unidos a membrana. La distribución tan marcada de los grupos hidroxilo favorecen la unión del agua o del hidrógeno (esto considerando el alto potencial electrostático que presentan los grupos hidrofílicos). Considerando la abundancia de aminoácidos aromáticos definiendo las regiones estéricas con un alto contenido de interacciones electrostáticas no covalentes, se puede especular que éstas interacciones pudiesen aumentar la afinidad de unión del péptido con macrófagos favoreciéndose así la presentación del péptido por estas células presentadoras de antígeno (Rammensee *et al.*, 1995).

Con el propósito de identificar los mecanismos inmunológicos asociados a la protección inducida por la inmunización con el péptido GK-1 evaluamos la respuesta inmune humoral y celular en los ratones inmunizados con el péptido GK-1 o con SSI (controles).

La presencia de una respuesta por parte de las células B después de la inmunización se detectó por medio de la identificación de anticuerpos específicos anti-GK-1 en los animales vacunados. La inmunización con GK-1 indujo muy bajos niveles de anticuerpos capaces de reaccionar tanto con el propio péptido como con los antígenos totales de *T. crassiceps*. Cabe mencionar que los niveles de anticuerpos detectados en contra del propio péptido fueron aún menores que en contra del antígeno total (Tabla III, 1<sup>er</sup> artículo). Esto pudiese deberse a la

pérdida de reactividad de GK-1 una vez que este se une a la placa de ELISA. Sin embargo, aunque los niveles de anticuerpos fueron bajos, estos nos permitieron identificar y localizar a la proteína nativa en el cisticerco de *T. crassiceps*, así como en huevo, cisticerco y adulto de *T. solium* por medio de inmunofluorescencia (Figura 1, 1<sup>er</sup> artículo). Se encontró que GK-1 se presenta en todos los estadios del parásito, sobretodo en regiones que se encuentran muy expuestas al sistema inmune. Cabe mencionar que estos anticuerpos no fueron capaces de reconocer a la proteína nativa de 56 KDa por medio de Western Blot (datos no mostrados). Una posible explicación es que al momento de preparar la muestra del antígeno total de *T. crassiceps* para su corrimiento electroforético se pierda la estructura conformacional nativa impidiendo así el reconocimiento por parte de los anticuerpos anti-GK-1.

La participación de las células T se demostró por medio de ensayos de proliferación celular *in vitro* de las células esplénicas de los animales inmunizados (Figura 2, 1<sup>er</sup> artículo), observamos una fuerte respuesta por parte de dichas células tanto en contra del propio péptido como en contra de los antígenos totales de *T. crassiceps*, probablemente dicha respuesta se vio favorecida por el incremento en el porcentaje de células T capaces de producir IL-2. La composición de la población de linfocitos estimulados resultó estar enriquecida en CD4<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup> y principalmente en células CD8<sup>+</sup> CD4<sup>-</sup>. Sin embargo, la participación directa de una respuesta de tipo citotóxico en el control de la reproducción en esta parasitosis queda aún por explorar.

De acuerdo a lo anterior no es raro pensar que la inmunogenicidad del péptido pudiera verse alterada cuando éste se acopló químicamente a BSA o a MAP, considerando la fuerte dependencia que existe entre la estructura del péptido y sus funciones biológicas. Las características tanto químicas y/o físicas como son la polaridad electrónica de GK-1, la adecuada posición de los motivos de anclaje y las similitudes con los motivos que reaccionan con las moléculas del Complejo Principal de Histocompatibilidad (CPH) de clase I, pudiesen explicar la

habilidad del péptido para inducir una respuesta proliferativa de las células T CD8<sup>+</sup> (Rammensee *et al.*, 1995).

Considerando el perfil de citocinas obtenido (estimulando las células esplénicas tanto con GK-1 como con antígenos totales de cisticercos de *T. crassiceps*) en el cual se detectaron niveles significativamente superiores de INF- $\gamma$  e IL-2, mientras que los niveles de IL-4 e IL-10 fueron de menor magnitud (Figura 2, 1<sup>er</sup> artículo), podríamos especular que la protección inducida por la vacunación con este péptido es una consecuencia de la respuesta inmune inflamatoria producida por la participación de INF- $\gamma$  e IL-2. El INF- $\gamma$  es una de las citocinas que juegan un papel central en los mecanismos efectores mediados en la protección observada en ratones vacunados en contra de otras parasitosis (Ferru *et al.*, 1997, Fouad *et al.*, 1997). La gran cantidad de INF- $\gamma$  detectada por ELISA así como el incremento en el porcentaje de células CD3<sup>+</sup> que producen esta citocina pudiera inducir la respuesta inflamatoria y la activación de macrófagos en la cercanía del parásito (Mosmann *et al.*, 1997), produciendo la aceleración de procesos de destrucción de formas tempranas del parásito o algunos de sus estadios por medio de la síntesis de óxido nítrico (NO). Este tipo de procesos ha sido descrito para otro de tipo de parásitos como son *Oncocerca linealis* y *Brugia malayi* (Taylor *et al.*, 1996). Otro mecanismo de destrucción descrito con anterioridad (Capron *et al.*, 1982, Taylor *et al.*, 1996 Thomas *et al.*, Ahmed *et al.*, 1997 ) es la producción de peróxido de hidrogeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) por parte del macrófago lo que induce el daño y la muerte del parásito.

Adicionalmente, el perfil de citocinas asociadas a la inmunización con GK-1 en donde se observaron niveles bajos de IL-4 e IL-10 (Figura 3 A y B, 1<sup>er</sup> , artículo) correlaciona con los bajos niveles de anticuerpos inducidos por la inmunización con GK-1 (Tabla III, 1<sup>er</sup> , artículo). Resulta de interés señalar el claro aumento de células activadas tanto en CD4<sup>+</sup> como en CD8<sup>+</sup>. Así, en la Tabla IV (artículo) puede observarse que aproximadamente entre un 85% y 90% de las células CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> (estimuladas tanto con GK-1 como con antígenos de



cisticercos de *T. crassiceps*) expresaron el receptor para IL-2 (CD25) en su superficie, esto nos señala que la respuesta inmune de células T hacia el péptido es específica ya que dichos resultados no fueron observados en las células provenientes de los animales control.

La protección inducida por la inmunización con el péptido GK-1 y el patrón de citocinas observado, coincide con los estudios realizados por otros investigadores acerca de la respuesta inmune asociada a la resistencia en céstodos, en donde se propone el papel fundamental que juega el desarrollar una respuesta de tipo Th1 (Terrazas *et al.*, 1998), aunado a esto cabe señalar la marcada participación que podrían tener los anticuerpos en la destrucción del desarrollo de los estadíos tempranos de la larva (Rickard *et al.*, 1982). La alta eficiencia de protección observada al inmunizar con el péptido GK-1 pudiese ser el resultado del sinergismo de montar una respuesta inmune si bien, más marcadamente de tipo celular, también de tipo humoral.

Cabe destacar el hecho de que el péptido GK-1 forma parte de la fracción antigénica de 56 kDa de los cisticercos de *T. crassiceps* la cual induce altos niveles de protección en contra de la cisticercosis porcina (Valdez *et al.*, 1994); de que GK-1 es reconocido por sueros de humanos teniásicos (Gevorkian *et al.*, 1996); y más aún el hecho de identificar la presencia de GK-1 por medio de inmunofluorescencia en todos los estadíos de *T. solium* (huevos, embrión hexacanto, metacéstodo y tenia) hace de este péptido un blanco adecuado para el ataque del sistema inmune.

Finalmente, se debe tomar en cuenta que la producción de una vacuna de tipo sintético está dirigida principalmente a cerdos criados en forma rústica donde la cisticercosis es una enfermedad presente y donde se pretende proteger a una especie de corta expectativa de vida (aproximadamente 1 año), lo cual reduce las demandas de protección inducidas por vacunación y evita programas de revacunación, abatiendo así los costos al productor. Por todo lo anterior, GK-1 lo

consideramos como un buen candidato para ser incluido en una vacuna polivalente en contra de la cisticercosis porcina, la cual incluya en su repertorio un conjunto de péptidos que sean capaces de originar una respuesta capaz de eliminar el establecimiento y el desarrollo del parásito.

## 6. CONCLUSIONES

- 1.- De los tres péptidos GK-1, GK-2 y GK-3, sólo GK-1 en forma lineal en una dosis de 10 µg/ratón indujo inmunidad esterilizante en un 60 % de los ratones inmunizados. Estos resultados fueron confirmados obteniendo niveles de protección que variaron desde un 57% a un 70 %, estos niveles demostraron ser aún más altos que los observados con la proteína recombinante completa KETc7 de la cual GK-1 deriva.
- 2.- El acoplamiento de GK-1 a MAP no confirió protección alguna.
- 3.- El acoplamiento GK-1-BSA indujo niveles de protección similares a los obtenidos utilizando GK-1 en forma lineal.
- 4.- La inmunización con GK-1 lineal indujo muy bajos niveles de anticuerpos capaces de reaccionar tanto con el propio péptido como con los antígenos totales de *T. crassiceps*.
- 5.- Se pudo localizar a la proteína nativa en el cisticerco de *T. crassiceps*, así como en huevo, cisticerco y adulto de *T. solium* por medio de inmunofluorescencia. Se encontró que GK-1 se presenta en todos los estadios del parásito, sobretodo en regiones que se encuentran muy expuestas al sistema inmune.
- 6.- Se observó una alta respuesta proliferativa en las células de ratones inmunizados con GK-1 ya fuese estimulando *in vitro* con GK-1, como con extracto total de cisticercos de *T. crassiceps*
- 7.- La composición de la población de linfocitos estimulados resultó estar enriquecida en células T CD4<sup>+</sup> pero principalmente en células T CD8<sup>+</sup>, de los cuales aproximadamente 85% y 90% de las células CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> (estimuladas

tanto con GK-1 como con antígenos totales de cisticerco de *T. crassiceps*) expresaron el receptor para IL-2 (CD25) en su superficie

8.- Se detectaron niveles significativamente superiores de INF- $\gamma$  e IL-2 asociados a la vacunación, mientras que los niveles de IL-4 e IL-10 fueron de menor magnitud.

## 7.-BIBLIOGRAFIA

- Ahmed, S.F., I.P. Oswald, P. Caspar, S. Hieny, L. Keefer, A. Sher, S.L. James. 1997. Developmental differences determine larval susceptibility to nitric oxide-mediated killing in a murine model of vaccination against *Schistosoma mansoni*. *Infect Immun.* 65 (1): 219-226.
- Aluja A. S., Villalobos, A. N., Plancarte, A., Rodarte, L. F., Hernandez, M. and E. Sciutto. (1986). Experimental *Taenia solium* cysticercosis in pigs: characteristics of the infection and antibody response. *Vet Parasitol* 61(1-2): 259.
- Arnon, R. and V. Regenmortel. 1992. Structural basis of antigenic specificity and design of new vaccines. *FASEB J.* 6:3265-3274.
- Audibert F, M. Jolivet, L. Chedid, R. Arnon, and M. Sela. 1982. Successful immunization with a totally synthetic diphtheria vaccine. *Proc Natl Acad Sci U S A*;79(16):5042-6.
- Berzofsky J. A. 1985. Intrinsic and extrinsic factors in protein antigenic structure. *Science.* Sep 6;229(4717):932-40.
- Berzofsky J. A., K. B. Cease, J.L. Cornette, J.L. Spouge, H. Margalit, I.J. Berkower, M.F. Good, L.H. Miller, C. DeLisi. 1987. Protein antigenic structures recognized by T cells: potential applications to vaccine design. *Immunol Rev.* 98:9-52.
- Bobek LA., P.T. LoVerde, and D. M, Rekosh. 1989. *Schistosoma haematobium*: analysis of eggshell protein genes and their expression. *Exp Parasitol* 68(1):17-30.
- Bobek, L.A., P.T. LoVerde, and D.M. LoVerde. 1991. *Schistosoma japonicum*: analysis of eggshell protein genes, their expression and comparison with similar genes from other schistosomes. *Exp Parasitol.* 72(4):381-390.
- Brown, F.J. 1990. The potential of Peptides as Vaccines. *Semin Virol.* 1: 67-74.
- Capron, A., J.P. Dessaint, M. Capron, M. Joseph and G. Torpier. 1982. Effector mechanics of immunity to Schistosomes and their regulation. *Immunol Rev.* 61:41-66.

- Cruz-Revilla, C., Rosas, G., Fragoso, G., Lopez-Casillas, F., Toledo, A. and E. Sciutto. 1999. *Taenia crassiceps* cysticercosis: protective effect and immune response elicited by ADN immunization. (Aceptado para su publicación en el Journal of Parasitology).
- Davenport, M.P., Ivan A.P. Ho Shon., Adrian, V.S. Hill. 1995. An empirical method for the prediction of T-cell epitopes. Immunogenetics. 42: 392-397.
- DeLisi C., Berzofsky J. A. 1985. T-cell antigenic sites tend to be amphipathic structures. Proc Natl Acad Sci U S A. 82(20):7048-52.
- Dorais, F. J., and G. W. Esch. 1969. Growth rates of two *Taenia crassiceps* strains. Experimental Parasitol. 25: 395-398.
- Falk K, O. Rotzschke, S. Stevanovic, G. Jung, and H.G. Rammensee. 1991. Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. Nature. 351(6324):290-6.
- Fanning DW, J.A. Smith, and G.D. Rose. 1986. Molecular cartography of globular proteins with application to antigenic sites. Biopolymers (5):863-83.
- Fouad A.F. 1997. IL-1 alpha and INF-gamma expression in early periapical lesions of normal and immunodeficient mice. J Dent Res 76(9):1548-54.
- Ferru, Y., B. Georges, J. Estaquier, M. Delacre, D.A. Harn, A. Tartar, A. Capron, H. Grassmasse, and C. Auriault. 1997. Analysis of the immune response elicited by a Multiple Antigen Peptide (MAP) composed of two distinct protective antigens derived from the parasite *Schistosoma mansoni*. Parasite Immunol. 19: 1-11.
- Flisser, A., K. Willms, J.P. Lacleste, C. Larralde, C. Ridaura and F. Beltrán. 1982. Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives. Academic Press, New York.
- Freeman , R.S. 1962. Studies on the biology of *Taenia crassiceps* (Zeder, 1800) Rudolphi, 1810 (Cestoda). Canadian Journal of Zoology. 40: 969-990.
- Gemmel M and Lawson Jr. 1982. Ovine cysticercosis. An epidemiology model for the cysticercosis. II Host immunity and regulation of the parasite population. In: Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives. Academic Press, New York, pp 700.

- Gevorkian, G., K. Manoutcharian, C. Larralde, M. Hernández, J.C. Almagro, M. Viveros, J. Sotelo, E. García, and E. Sciutto. 1996. Immunodominant synthetic peptides of *Taenia crassiceps* in murine and human cysticercosis. *Immunol. Letters* 49: 185-189.
- Gordon D.M., T.W. McGovern, U. Krzych, J.C. Cohen, I. Schneider, R. La Chance, D.G. Heppner, M. Hollingdale, M. Slaoui, et al. 1995. Safety, immunogenicity, and efficacy of a recombinantly produced *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein-hepatitis B surface antigen subunit vaccine. *J infect Dis.* 171: 576-585.
- Hill A.V., J. Elvin, A.C. Willis, M. Aidoo, C.E. Allsopp, F.M. Gotch, X.M. Gao, M. Takiguchi, B.M. Greenwood, A.R. Townsend, et al. 1992. Molecular analysis of the association of HLA-B53 and resistance to severe malaria. *Nature.* 360 (6403):434-9.
- Hopp, T.P., Woods, K. R. 1981. Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 78(6):3824-8.
- Kyte, J., Doolittle, R. F. 1982. A simple method for displaying the hydrophathic character of a protein. *J Mol Biol.* 5;157(1):105-32.
- Larralde, C., R.M. Montoya, E. Sciutto, M.L. Díaz, T. Govezensky, and E. Coltorti. 1989. Deciphering Western Blots of tapeworm antigens (*T. solium*, *E. granulosus* and *T. crassiceps*) reacting with sera from neurocysticercosis and hydatidic disease patients. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 40: 282-290.
- Larralde C., A. Padilla, M. Hernández, T. Govezensky, E. Sciutto, G. Gutiérrez, R. Tapia-Conyer, B. Salvatierra, and J. Sepúlveda. 1992. Seroepidemiología de la cisticercosis en México. *Salud Pública de México.* 34(2):197-210.
- Manoutcharian, K., C. Larralde, A. Aluja, G. Fragoso, G. Rosas, M. Hernández, N. Villalobos, L.F. Rodarte, T. Govezensky, M. Baca, and E. Sciutto. 1995. Advances in the development of a recombinant vaccine against *Taenia solium* pig cysticercosis. p. 63. *In: Vaccine 95.* Cold Spring Harbor.
- Manoutcharian, K., G. Rosas, M. Hernández, G. Fragoso, A. Aluja, N. Villalobos, L.F. Rodarte, and E. Sciutto. 1996. Cysticercosis: Identification and cloning of protective recombinant antigens. *J. Parasitol.* 82: 250-254.

- Margalit, H., Spouge, J.L., Cornette, J.L., Cease, K.B., Delisi, C., Berzofsky, J.A. 1987. Prediction of immunodominant helper T cell antigenic sites from the primary sequence. *J Immunol.* 138(7):2213-29.
- McDevitt, H.O., M. Sela. 1966. Genetic control of antibody response. I. Demonstration of determinant-specific differences in response to synthetic polypeptide antigens in two strains of inbred mice. *J Exp Med.* 122:517-531.
- McNeil M., A.G. Darvill, S.C. Fry, and P. Albersheim. 1984. Structure and function of the primary cell walls of plants. *Annu Rev Biochem.* 53: 625-663.
- Milich, D.R. 1989. Synthetic T and B cell recognition sites: implications for vaccine development. *Adv Immunol.* 45: 195-282.
- Molinari, J.L., D. Rodríguez, P. Tato, R. Soto, F. Arechavaleta, and S. Solano. 1997. Field trial for reducing porcine *Taenia solium* cysticercosis in Mexico by systematic vaccination of pigs. *Vet. Parasitol.* 69(1-2): 55-63.
- Mosmann, T.R., L. Li, and S. Subash. 1997. Functions of CD8 T cells subset secreting different cytokine patterns. *Semin Immunol.* 9(2): 87-92.
- Nascimento, E., J.O. Costa, M.P. Guimaraes, and C.A. Tavares. 1995. Effective immune protection of pigs against cysticercosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 45(1-2): 127-137.
- Nene, V., Gobright, E., Bishop, R., Morzaria, S., Musoke, A. 1999. Linear peptide specificity of bovine antibody response to p67 of *Theileria parva* and sequence diversity of sporozoite-neutralizing epitopes: implications for a vaccine. *Infect Immun* 67(3): 1261-1266.
- Nestor, J. J., Newman, S. R., DeLustro, B., Todaro, G. J., Schreiber, A.B. 1985. A synthetic fragment of rat transforming growth factor alpha with receptor binding and antigenic properties. *Biochem Biophys Res Commun.* 129(1):226-32.
- Novotny, J., Handschumacher, M., Haber, E., Bruccoleri, R. E., Carlson, W.B., Fanning, D. W., Smith, J.A., Rose, G.D. 1986. Antigenic determinants in proteins coincide with surface regions accessible to large probes (antibody domains). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 83(2):226-30.
- Nussenzweig, R.S., V. Nussenzweig. 1984. Development of sporozoite vaccine. 1984. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 307: 117-128.



- Pamer EG, J.T. Harty, M.J. Bevan. 1991. Precise prediction of a dominant class I MHC-restricted epitope of *Listeria monocytogenes*. *Nature* 353 (6347):852-5.
- Patarroyo, G., L. Franco, R. Amador, La. Morillo, C.A. Rocha, M. Rogha, M.E. Patarroyo. Study of the safety and immunogenicity of the synthetic malaria SPf66 vaccine in children age 1-14 years. 1992. *Vaccine* 10: 175-178.
- Rammensee, H.G., T. Friede, and S. Stevanovic. 1995. MHC ligands and peptide motifs: first listing. *Immunogenetics*. 41: 178-228.
- Ramos-Kuri, M., M.R. Montoya, A. Padilla, T. Govezensky, M. Díaz, E. Sciutto, J. Sotelo, and C. Larraide. 1992. Immunodiagnosis of neurocysticercosis. *Arch. Neurol.* 49: 633-636.
- Richards, F., Jr., and P. Schantz. 1991. Laboratory diagnosis of cysticercosis. *Clinic in Lab. Med.* 11: 1011-1028.
- Rickard, M. E., and J. F. Williams. 1982. Hydatidosis/cysticercosis: immune mechanisms and immunization against infection. *Adv. Parasitol.* 21: 229-296.
- Rosas, G., Cruz-Revilla, C., Fragoso, G., Lopez-Casillas, F., Perez, A., Bonilla, M. A., Rosales, R. and E, Sciutto. 1998. *Taenia crassiceps* cysticercosis: humoral immune response and protection elicited by DNA immunization. *J Parasitol* 84(3): 516-523.
- Rose, G. D., Gierasch, L.M. , Smith, J.A. 1985. Turns in peptides and proteins. *Adv Protein Chem.* 37:1-109.
- Rothbard, J. B., Taylor, W. R. 1988. A sequence pattern common to T cell epitopes. *EMBO J.* 7(1):93-100.
- Rudensky A.Yu, P .Preston-Hurlburt, S.C. Hong, A. Barlow, C.A. Janeway. 1991. Sequence analysis of peptides bound to MHC class II molecules. *Nature* 353 (6345):622-7.
- Saikh KU, M. Tamura, K. Kuwano, L.C. Dai, K. West, F.A. Ennis. 1993. Protective cross-reactive epitope on the nonstructural protein NS1 of influenza A virus. *Viral Immunol* (4):229-36.
- Sciutto, E., G. Fragoso, L. Trueba, D. Lémus, R.M. Montoya, M.L. Díaz, T. Govezensky, C. Lomelí, G. Tapia, and C. Larraide. 1990. Cysticercosis vaccine: cross-protecting immunity with *T. solium* antigens against experimental murine *T. crassiceps* cysticercosis. *Parasite Immunol.* 12: 687-696.

- Sciutto, E., A. Aluja, G. Fragoso, L. F. Rodarte, M. Hernández, M.N. Villalobos, A. Padilla, N. Keilbach, M. Baca, T. Govezensky, S. Díaz, and C.Larralde. 1995. Immunization of pigs against *Taenia solium* cysticercosis: factors related to effective protection. *Vet. Parasitol.* 60: 53-67.
- Sela, M., S. Fuchs, R. Arnon. 1962. Studies on the chemical basis of the antigenicity of proteins. 5. Synthesis, characterization and immunogenicity of some multichain and linear polypeptide containing tyrosine. *Biochem J.* 85: 223-235.
- Sotelo, J., O. del Bruto, and G. Román. 1996. Cysticercosis. *Curr. Clin. Trop. Infect. Dis.* 16: 240-259.
- Tainer, J. A., Getzoff, E. D., Paterson, Y., Olson, A. J., Lerner, R. A. 1985. The atomic mobility component of protein antigenicity. *Annu Rev Immunol.* 3:501-35.
- Tamburrini, A., M.A. Gomez Morales, and E. Pozio. 1995. Development of an immunoenzyme test for the diagnosis of human cysticercosis using a heterologous antigen. *Parassitologia.* 37 (2-3): 195-198.
- Tam J.P. 1994. Immunization with peptide carrier complexes: traditional and multiple antigen peptide system. p. 83. *In: Peptide Antigens.* Wisdom G.B. De. Oxford University Press, New York, U.S.A.
- Taylor, M.J., H.F. Cross, A.A. Mohamed, A.J. Trees and A.E. Bianco. 1996. Susceptibility of *Brugia malayi* and *Oncchocerca linealis* microfilariae to nitric oxide and hydrogen peroxide in cell-free culture and from IFN $\gamma$  activated macrophages. *Parasitology.* 112(3):315-322.
- Terrazas L.I., R. Bojalil, T. Govezensky, and C. Larralde. 1998. Shift from an early protective TH1-type immune response to a late permissive TH2-type response in murine cysticercosis (*Taenia crassiceps*). *J. Parasitol.* 84 (1): 74-81.
- Thomas, G.R., M. McCrossan, and M.E. Selkirk. 1997. Cytostatic and cytotoxic effects of activated macrophages and nitric oxide donors on *Brugia malayi*. *Infect Immun* 65(7):2732-2739.
- Thornton, G.B., Milich, D., Chisari, F., Mitamura, K., Kent, S.B., Neurath, R., Purcell, R., and J. Gerin. 1987. *In Vaccine 87.* p 77. Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, New York.

- Valdez, F., M. Hernández, T. Govezensky, G. Fragoso, and E. Sciutto. 1994. Immunization against *Taenia crassiceps* cysticercosis. Identification of the most promising antigens in the induction of protective immunity. *J. Parasitol.* 80: 931-936.
- Welling, G.W., Weijer, W. J., Van der Zee, R., Welling-Wester, S. 1985. Prediction of sequential antigenic regions in proteins. *FEBS Lett.* 188(2):215-8.
- Westhof E, D. Altschuh, D. Moras, A.C. Bloomer, A. Mondragon, A. Klug, M.H. Van Regenmortel. 1984. Correlation between segmental mobility and the location of antigenic determinants in proteins. *Nature* 311(5982):123-6.
- Yedidia-Ben, T. and R. Arnon. 1997. Design of peptide and polypeptide vaccines. *Curr Opin Biotech.* 8: 442-448.

## 8. APENDICE I. VACUNAS PEPTIDOS SINTETICOS.

El desarrollo de vacunas ha sido uno de los más grandes logros de la inmunología y la medicina. Las vacunas tradicionales fueron diseñadas principalmente por agentes intactos que inducían enfermedades, como microorganismos vivos-atenuados (por medio de pases sucesivos), inactivados o muertos ( por medio de calor, rayos U.V., uso de productos químicos) lo que permitía mantener su inmunogenicidad y eliminar su infectividad y/o efectos tóxicos. Algunas vacunas tradicionales permitieron la disminución de la incidencia en movilidad y mortalidad de algunas enfermedades infecciosas como es el caso de la viruela y la polio (Yedidia *et al.*, 1997). Si bien persiste el uso de este tipo de vacunas existen ciertas limitaciones para su producción inherentes a los procedimientos para su preparación, como son la dificultad de cultivo *in vitro* de los patógenos; la alta restricciones por especificidad de cepas debido a las variaciones antigénicas de virus y parásitos, restricciones por el Complejo Principal de Histocompatibilidad, dificultades de almacenamiento, sistemas seguros de aplicación, materiales contaminantes, efectos colaterales indeseados, etc.

Los nuevos enfoques hacia el desarrollo de vacunas se han dirigido principalmente hacia el desarrollo de estrategias que permitan disminuir o evitar este tipo de complicaciones. Esto se ha logrado gracias al desarrollo de nuevas tecnologías de biología molecular lo cual ha permitido por una parte el uso de tecnología de ADN recombinante incluyendo vacunas de ADN, y por otro lado el uso de péptidos sintéticos, que representan epítopes capaces de inducir protección en contra de infecciones causadas por, virus, bacterias o parásitos.

Los péptidos sintéticos fueron utilizados por primera vez a principios de los años sesentas con el propósito de analizar las características estructurales de la antigenicidad (Sela, *et al* ,1962). Estos primeros estudios revelaron las posibilidades del uso de polipéptidos sintéticos de secuencias conocidas, como

modelos antigénicos para poder conocer y analizar los principios básicos de la respuesta inmune tanto humoral como celular. La regulación genética de la respuesta inmune por los llamados genes de la respuesta inmune también fueron descritos utilizando polipéptidos de múltiples cadenas (Mc Devitt *et al.*, 1966). Sin embargo, la utilización de una vacuna sintética no se logró hasta los años ochentas cuando se procedió a la utilización de una vacuna en contra de la difteria (Audibert *et al.*, 1982). Posteriormente surgieron otro tipo de vacunas con la utilización de péptidos sintéticos, utilizando diferentes tipos de acarreadores y adyuvantes (Arnon, 1992). Si bien, el uso de vacunas de tipo peptídico o polipeptídico aún se encuentran en fase de experimentación se han logrado numerosos avances con este tipo de estrategias (Nussenzweig *et al.*, 1984; Patarroyo *et al.*, 1995; Saikh *et al.*, 1993; Gordon *et al.*, 1995; Nene *et al.*, 1999).

A la fecha, el diseño de vacunas basadas en péptidos sintéticos está limitada a la identificación de epítopes continuos. Cabe señalar que un epítope continuo es un fragmento pequeño lineal de un antígeno que es capaz de unirse al anticuerpo generado por la proteína intacta; mientras que un epítope discontinuo es aquel que esta formado por residuos que no son contiguos en secuencia, pero debido a los plegamientos de la cadena peptídica quedan muy cerca uno de otro, en este caso los anticuerpos que genera sólo son capaces de reaccionar en contra de la proteína intacta. Así, por ejemplo en el diseño de una vacuna contra influenza debe considerarse que no sólo son importantes los epítopes B discontinuos, ya que las moléculas adyacentes también contribuyen a generar una respuesta inmune por lo cual se tiene como consenso que no existe una forma general para sintetizar epítopes de tipo B. También deben de considerarse que cuando un epítope de tipo B es claramente lineal, una sola mutación de un aminoácido por fuera de la secuencia puede afectar la especificidad antigénica del epítope, presumiblemente por los cambios conformacionales.

El uso de péptidos sintéticos para vacunación es una de las alternativa más

atractivas por su simplicidad ya que estas vacunas están constituidas por relativamente pequeños péptidos y estos a su vez por epítopes del organismo en contra del cual se quiere obtener una respuesta inmune protectora (Brown, 1990). Esto permite diseñar vacunas de tipo sintético seleccionando sólo aquellos epítopes que confieran una respuesta inmune y excluyendo todos aquellos epítopes responsables del deterioro de la misma. A esto podemos agregar algunas ventajas que tiene este tipo de vacunas.

a) Químicamente definidas, seguras y puras.

b) Se pueden producir de forma masiva.

c) Su costo es bajo.

d) Son estables.

e) Pueden construirse de forma multivalente.

f) Tienen el potencial de poder modular la Respuesta inmune, ya que pueden ser sintetizadas combinando selectivamente sitios de reconocimiento tanto para células B como T.

g) Como pueden producirse como partículas dentro de microesferas o cápsulas biodegradables, esto permitiría dar una mayor permanencia dentro del organismo potenciando la respuesta inmune con la administración de una sola dosis.

Si bien existen excepciones, la regla general indica que para el uso de vacunas de tipo sintético deben de utilizarse adyuvantes muy potentes debido a que son secuencias muy pequeñas y poco inmunogénicas.

Como se mencionó anteriormente gracias a la tecnología de la Biología molecular, las vacunas de tipo sintético se producen previa identificación, aislamiento y caracterización de su secuencia de aminoácidos así como previa secuenciación de sus genes. Existen diversos métodos para la localización de epítopes proteicos los cuales se enumeran en la tabla 5.

## Sitios de reconocimiento para células B.

Con el propósito de desarrollar vacunas de tipo sintético es muy útil y muchas veces indispensable el predecir las posibles regiones de la proteína que serán reconocidas por el sistema inmune. Si bien este es un proceso complicado debido a los factores intrínsecos relacionados con las características estructurales del antígeno, muchos factores extrínsecos relacionados con la regulación y el repertorio del sistema inmune determinan cuales sitios de la proteína serán reconocidos por células B y T ( Berzofsky, 1985; 1987).

Con relación a los factores intrínsecos que determinan la antigenicidad de las células B, existen un gran número de ensayos para predecir los sitios antigénicos de las proteínas a partir ya sea de su estructura secuencial primaria o del plegamiento de su cadena polipeptídica. Todos los modelos descritos hasta el momento asumen que la antigenicidad es un propiedad de superficie y que la accesibilidad a la superficie de la estructura nativa es un requerimiento mínimo para un sitio antigénico de células B. Las propiedades estructurales han sido consideradas como regiones locales de hidrofiliidad en la secuencia de aminoácidos ( Hopp and Woods, 1981; Kyte and Doolittle, 1982), la presencia de  $\beta$  plegadas (Rose *et al.*, 1985; Nestor *et al.*, 1985), las regiones más expuestas o protuberantes de la proteínas (Thornton *et al.*, 1987; Fanning *et al.*, 1986, Novotny *et al.*, 1986), la movilidad de segmentos (Westhof *et al.*, 1984, Tainer *et al.*, 1985) y por último la presencia específica de ciertos aminoácidos en la secuencia ( Welling, 1985), cabe señalar que todas estas propiedades intrínsecas se encuentran altamente relacionadas unas con otras. Además de que los grupos de residuos hidrofílicos se forman o tienden a agruparse más fácilmente en las superficies acuosas de una proteína soluble en agua. Se ha comprobado que el grado de antigenicidad en contra de anticuerpos de ciertos fragmentos péptidos es muy baja, sin embargo la excepción corresponde a los extremos terminales. La fuerte antigenicidad que presentan estos extremos terminales de las proteínas puede ser debido al hecho de que generalmente los aminoácidos se encuentran

orientados hacia la superficie lo que les permite más movilidad que las secciones que quedan orientadas hacia adentro de la cadena polipeptídica (Arnon, 1992).

### **Sitios de reconocimiento para células T.**

Los recientes avances en el desarrollo de vacunas de péptidos sintéticos y el interés por conocer y entender los mecanismos por medio de los cuales un antígeno es reconocido por las células T, ha incrementado la relevancia de predecir las secuencias peptídicas de una proteína que son capaces de generar una respuesta inmune por medio de células T. Existen ciertas propiedades generales de las secuencias de los péptidos que son capaces de activar células T, como son, su capacidad para asociarse con sitios de reconocimientos para clase I y clase II, requisito indispensable para la activación de células T (Milich, 1989). Otra propuesta sugiere que motivos comunes que se encuentran en la mayoría de los determinantes de células T que reconocen las células citotóxicas o ayudadoras. Estos motivos están representados por cuatro o cinco residuos de secuencias peptídicas en los cuales un residuo cargado o una glicina es seguida de dos o tres residuos hidrofóbicos terminando con un residuo polar (Rothbard and Taylor, 1988). Ambas propuestas fueron sustentadas en base a análisis estadísticos para conocer cuales sitios de las células T muestran una mayor correlación con las propiedades estudiadas (De Lisi and Berzofsky, 1985, Margalit *et al.*, 1987, Rothbard and Taylor, 1988). Una limitación teórica de ambos algoritmos es que ninguno de ellos toma en cuenta la influencia del MHC en el sitio de reconocimiento de las células T, los patrones alelo-específicos, la cepa murina, etc. Los métodos que utilizan dos o tres posiciones de los motivos han demostrado reconocer y predecir epítopes para MHC de clase I no así para MHC de clase II ( Davenport *et al.*, 1995). Adicionalmente análisis alelo-específicos de unión de péptidos han demostrado que existen "residuos o motivos de anclaje" los cuales son importantes en determinar la habilidad de los péptidos para unirse a moléculas de MCH ( Falk *et al.*, 1991; Rudensky *et al.*, 1991). Estos motivos de unión de péptidos basados en el conocimiento de estas posiciones de anclaje



están siendo determinadas para alelos de MHC clase I y II. Estos motivos han sido utilizados para predecir epítopes T de clase I en *Listeria monocytogenes* (Pamer *et al.*, 1991), *Plasmodium falciparum* ( Hill *et al.*, 1992), y otros patógenos. Si bien este tipo de predicciones se llevan a cabo, una manera práctica de poder localizar en una secuencia el o los epítopes que tengan la capacidad de unirse a moléculas de MHC consistiría en purificar a partir de los animales vacunados las células infectadas y a partir de éstas, las moléculas de MHC examinando así los péptidos disociados o mejor aún diseñar un sistema *in vitro* de presentación de los péptidos a CPA lo que nos permitiría observar las vías de procesamiento de los mismos.

Si bien existen muchas ventajas sobre el uso de vacunas de tipo sintético con respecto a las vacunas convencionales de microorganismos vivos, atenuados, etc, su uso todavía es aún muy limitado. Probablemente debido a que el uso de una vacuna de tipo sintético requiere de un proceso de investigación prolongado para definir epítopes de tipo T y B, y diseñar vacunas en contra de patógenos individuales o aún contra múltiples patógenos. El conocer epítopes de patógenos, adicionalmente, nos abre la posibilidad de poder modular la respuesta inmune y conocer la interacción de componentes de tipo T y B en las enfermedades.

El diseño de vacunas multivalentes pudiesen también disminuir el problema de las secuencias hipervariables y las restricciones que existen por parte del MHC en vacunas sintéticas. Los grandes avances que se han realizado en esta área nos permiten especular que en un muy corto lapso de tiempo la primera generación de vacunas basadas en péptidos sintéticos sean una realidad para su utilización.

**9. APENDICE II. Artículo desarrollado en colaboración durante mi trabajo de maestría.**

Cruz-Revilla, C., G. Rosas, F. Fragoso, F. López-Casillas, **A. Toledo**, and E. Sciutto. 1998. *Taenia crassiceps* cysticercosis: protective effect and immune response elicited by DNA immunization (Aceptado para su publicación en el Journal of Parasitology).

Running Head: Cruz-Revilla et al.-PROTECTIVE IMMUNITY BY DNA IMMUNIZATION  
**TAENIA CRASSICEPS CYSTICERCOSIS: PROTECTIVE EFFECT AND IMMUNE  
RESPONSE ELICITED BY DNA IMMUNIZATION**

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

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

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

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

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

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Mice**

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

### **Parasites**

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

### **Plasmid**

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

cysticerci antigens were used (Larralde et al., 1989). Briefly, 96-well flat-bottom microtitration plates (NUNC Brand Products, Copenhagen, Denmark) were coated with 1 µg of *T. crassiceps* antigen per well diluted in carbonate buffer, pH 9.6, and incubated overnight at 4 C. Plates were washed 3 times for 5 min with phosphate-buffered saline (PBS) containing 0.1% v/v Tween 20 (PBS-T) and blocked with 200 µl of PBS containing 1% w/v BSA (blocking buffer) at 37 C for 1 hr before washing again with PBS-T. Serum samples were used at 1:100 dilution in blocking buffer as noted above, and 100 µl per well were incubated for 1 hr at 37 C and added in duplicate to the well. Plates were washed 3 times for 5 min with PBS-T. Bound mouse Igs were detected using the alkaline phosphatase-conjugated anti-mouse IgG (whole molecule, Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri) diluted 1:1,000 in blocking buffer for 1 hr at 37 C. The substrate used was detected using *p*-nitrophenyl phosphate (Sigma) in diethanolamine buffer for 10 min at room temperature. The reaction was stopped with 2N NaOH. Optical density readings at 405 nm ( $A_{405}$ ) were carried out in a Humareader ELISA processor (Human Gesellschaft für Biochemica und Diagnostica, Taunusstein, Germany).

### **Proliferation assay**

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

harvest, the cells were centrifuged at 500 x g for 10 min and washed twice in ice-cold PBS containing 10% globulin depleted FBS plus 0.02% NaN<sub>3</sub>. CD3 and interleukine expression was determined by two-color double fluorescence-activated cell sorting (FACS) as previously described (Toledo et al., 1999). Briefly, cells were stained with the FITC-conjugated anti-CD3 monoclonal antibody (Pharmlngen). Intracellular cytokines were assayed by using a cytoStain™ kit (Pharmlngen) to fix and permeabilize the cells. To stain intracellular cytokines, fixed and permeabilized cells were incubated with monoclonal rat anti-IL-2PE, anti-IL-4PE, anti-IL-10PE or anti-INF- $\gamma$ PE (all from Pharmlngen). Parallel samples of the cells were stained with isotype control to account for nonspecific staining of the cells. Ten-thousand cells were analyzed with a CD3<sup>+</sup> lymphocyte gate as defined by light scatter in a FACScan (Becton Dickinson, Palo Alto, California). The percentage of cells in each quadrant is indicated in the dot plot. Quadrant statistics were set on the basis of the corresponding isotype controls.

### **Experimental challenge**

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

### **Statistical analysis**

The effect of DNA immunization on the parasite load in challenged mice was analyzed statistically using the non-parametric Kruskal-Wallis Tests. The statistical significance of the

either i.d. or i.m. whereas no proliferation was observed in those injected with pcDNA3 or non immunized mice.

### **Cytometry Analysis**

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

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

### **DISCUSSION**

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

1993). In addition, variations in inducing antibodies by DNA obtained by diverse procedures could explain some conflicting results that have been reported in other diseases (Yang et al., 1995; Waine et al., 1997). In any case, our results show that i.d. immunization is a more effective alternative to produce antibodies, protective or not, as has been also reported by other authors (Boyle et al., 1997; Gramzinski et al., 1998). However, we cannot discard an additional effect due to the number of inoculations in im. (6 per mouse in total) and in i.d. (18 per mouse in total) immunized mice.

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

Albeit the percentage of CD4<sup>+</sup> cells was increased in the proliferated T-cells from i.m. immunized mice, the percentage of CD8<sup>+</sup> cells was rather higher (Table II). The increased percentage of CD3<sup>+</sup> cells that produced inflammatory cytokines (IFN $\gamma$  and IL-2) could result in macrophage activation at the parasite vicinity which can be involved in the resistance induced. It is probable that this CD8<sup>+</sup> enriched inflammatory response could be a consequence of the features of KETc7, more than the form of immunization, specially considering that immunization with the GK-1 epitope of this antigen induces a very similar immune response (Toledo et al., 1999).

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



Boyle, J. S., A. Silva, J. L. Brady, and A. M. Lew. 1997. DNA immunization: induction of higher avidity antibody and effect of route on T cell cytotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **94**: 14626-14631.

\_\_\_\_\_, J. L. Brady, and A. M. Lew. 1998. Enhanced responses to a DNA vaccine encoding a fusion antigen that is directed to sites of immune induction. *Nature* **392**: 408-411.

Connell, N. D., E. Medina-Acosta, W. R. MacMaster, B. R. Bloom, and D. G. Russell. 1993. Effective immunization against cutaneous leishmaniasis with recombinant bacille Calmette-Guerin expressing the *Leishmania* surface proteinase gp63. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **90**: 11473-11477.

Doolan, D.L., R.C. Hedstrom, M. J. Gardner, M. Sedegah, H. Wang, R. A. Gramzinski, M. Margalith, P. Hobart, and S. L. Hoffman. 1998. DNA vaccination as an approach to malaria control: current status and strategies. *Current Topics in Microbiology and Immunology* **226**: 37-56.

Feltquate, D. M., S. Heaney, R. G. Webster, and H. L. Robinson. 1997. Different T helper cell types and antibody isotypes generated by saline and gene gun DNA immunization. *Journal of Immunology* **158**: 2278-2284.

Fragoso, G., E. Lamoyi, A. Mellor, C. Lomelí, M. Hernández, and E. Sciutto. 1998. Increased resistance to *Taenia crassiceps* murine cysticercosis in Qa-2 transgenic mice. *Infection and Immunity* **66**: 760-764.

Freeman, R.S. 1962. Studies on the biology of *Taenia crassiceps* (Zeder, 1800), (Rudolphi, 1810). *Canadian Journal of Zoology* **40**: 969-990.

- Reliable serology of *Taenia solium* cysticercosis with antigens from cyst vesicular fluid: ELISA and haemagglutination test. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **35**: 965-973.
- \_\_\_\_\_, R. M. Montoya, E. Sciutto, M. L. Díaz, T. Govezensky, and E. Coltorti. 1989. Deciphering Western Blots of tapeworm antigens (*Taenia solium*, *Echinococcus granulosus* and *Taenia crassiceps*) reacting with sera from neurocysticercosis and hydatid disease patients. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **40**: 282-290.
- Loo, L., and A. Braude. 1982. Cerebral cysticercosis in San Diego. A report of 23 cases and a review of the literature. *Medicine (Baltimore)* **61**: 341-359.
- López-Casillas, F., S. Cheifetz, J. Doody, J. L. Andres, W. S. Lane, and J. Massagué. 1991. Structure and Expression of the Membrane Proteoglycan Betaglycan, a Component of the TGF- $\beta$  Receptor System. *Cell* **67**: 785-795.
- Manoutcharian, K., G. Rosas., M. Hernández, G. Fragoso, A. Aluja, N. Villalobos, L. F. Rodarte, and E. Sciutto. 1996. Cysticercosis: Identification and cloning of protective recombinant antigens. *Journal of Parasitology* **82**: 250-254.
- McCormick, G. F. 1985. Cysticercosis, review of 230 patients. *Bulletin of Clinical Neuroscience* **50**: 76-101.
- Molinari, J. L., R. Meza, and P. Tato. 1983. *Taenia solium*: cell reactions to the larva (*Cysticercus cellulosae*) in naturally parasitized, immunized hogs. *Experimental Parasitology* **56**: 327-338.
- \_\_\_\_\_, P. Tato, R. Lara-Aguilera, and A. C. Jr. White. 1993. Effects of serum from neurocysticercosis patients on the structure and viability of *Taenia solium* oncospheres. *Parasitology* **79**: 124-127.

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

FIGURE 1. Individual antibody response in control and pcDNA3 or pTc-sp7 intradermally immunized mice determined by ELISA. The cut-off values were obtained from 2 SD plus the

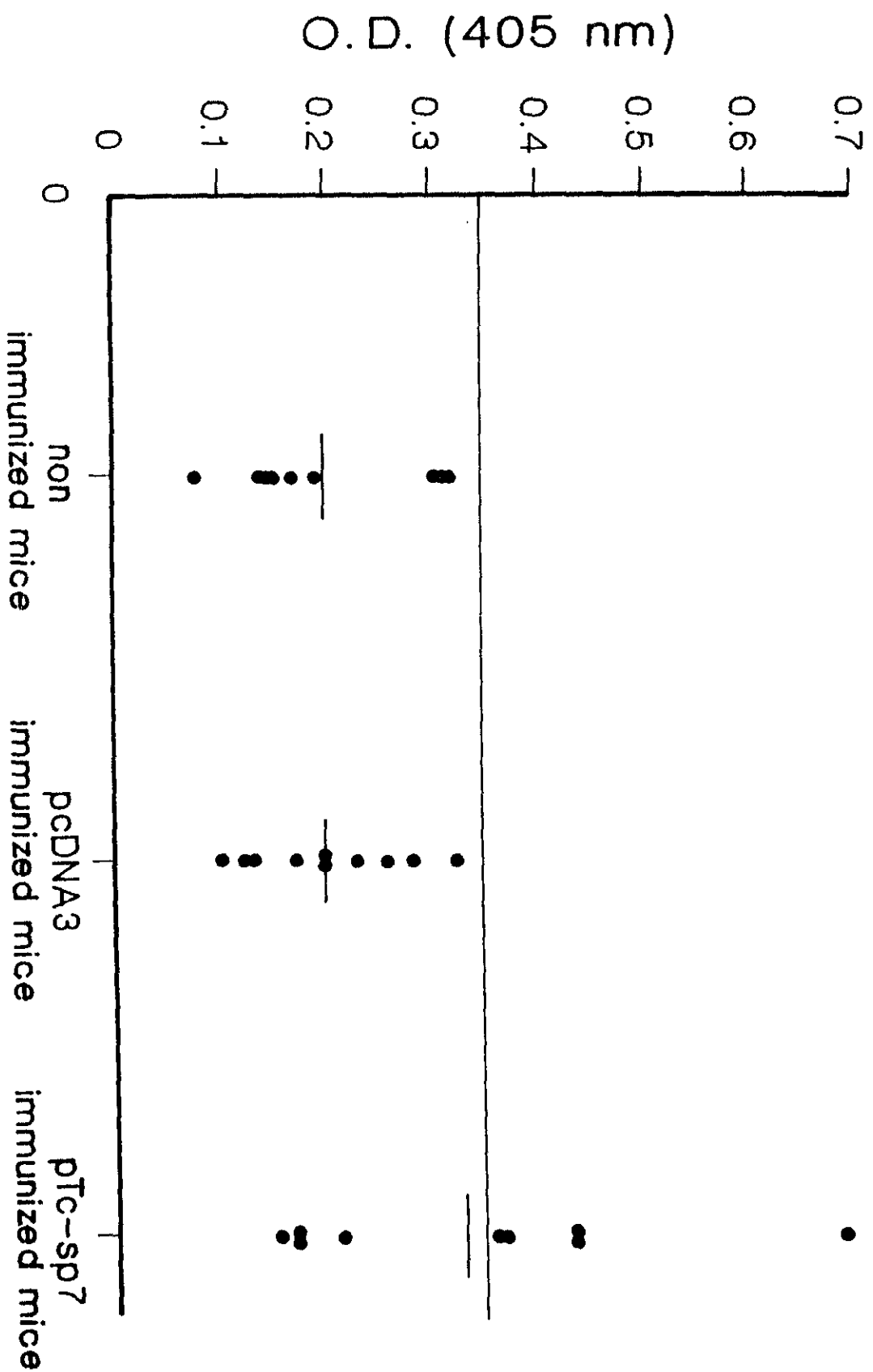
Table I. Protective effect induced against *Taenia crassiceps* murine cysticercosis by intramuscular or intradermal DNA immunization.

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

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

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

**ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA**

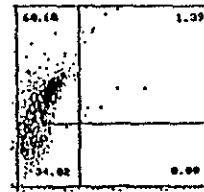
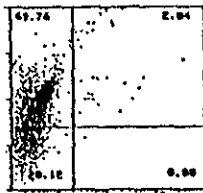


Non immunized

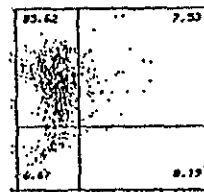
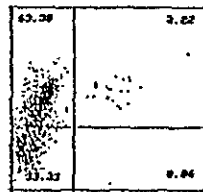
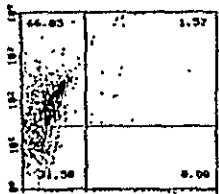
pcDNA3 immunized

pTc-sp7 immunized

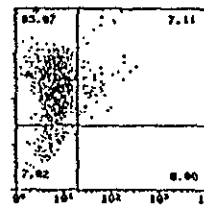
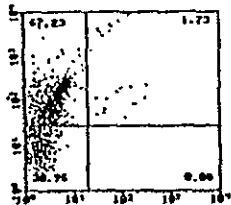
Media



*Taenia crassiceps*



GK-1



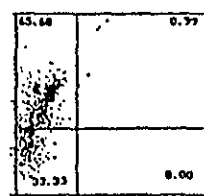
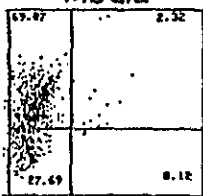
IL-2

Non immunized

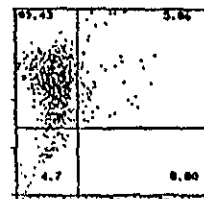
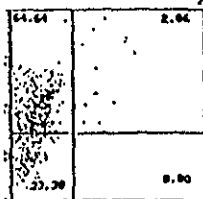
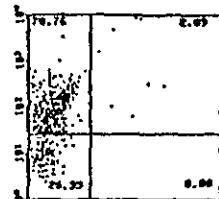
pcDNA3 immunized

pTc-sp7 immunized

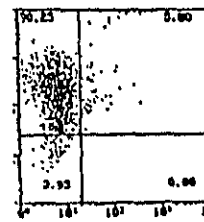
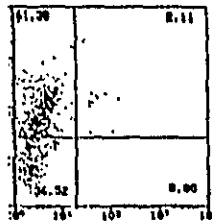
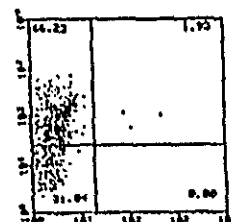
Media



*Taenia crassiceps*



GK-1



IFN-γ