



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
UNIDAD ACADÉMICA DE MEDICINA

MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

**"Evaluación de la inmunogenicidad y efecto
protector de la vacuna oral S3Pvac-papaya contra la
cisticercosis en cerdos"**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

PRESENTA:

MVZ. ALFREDO FIGUEROA DELGADO

**DIRECTOR DE TESIS:
DR. GERARDO HUERTA BERISTAIN**

**CODIRECTORA:
DRA. EDDA L. SCIUTTO CONDE**



Chilpancingo, Gro., Enero, 2014

Índice

	Página
Resumen	1
Abstract	3
Introducción	4
Material y Métodos	7
Resultados	11
Discusión	14
Conclusiones	16
Referencias	17

Resumen

Antecedentes: La neurocisticercosis es una enfermedad parasitaria causada por el establecimiento de la fase larvaria de *Taenia solium*, que puede establecerse en el hombre o en el cerdo. Entre las intervenciones propuestas para su control figura la prevención de la cisticercosis porcina por vacunación. Se ha propuesto una vacuna, denominada S3Pvac, que expresada de manera sintética o recombinante induce altos niveles de protección contra la cisticercosis porcina en cerdos expuestos a condiciones naturales de transmisión.

Objetivo: En este estudio se evaluó la inmunogenicidad y efecto protector de la vacuna oral S3Pvac-papaya contra la cisticercosis porcina en condiciones experimentales de infección.

Material y métodos: Un total de 21 cerdos hembras fueron sometidos a dos inmunizaciones con intervalo de 15 días; de los cuales, 7 cerdos fueron inmunizados vía oral con el vector sin transformar (callos de papaya); 7 cerdos fueron inmunizados con S3Pvac-papaya vía oral con dosis de 60mg/cerdo; y un grupo control de 7 cerdos, recibió solo solución salina. Quince días después de la segunda inmunización los cerdos se desafiaron experimentalmente vía oral con 10,000 huevos de *Taenia solium*. La capacidad inmunogénica de la vacuna fue evaluada 13 días después de la segunda inmunización, cuantificando niveles de anticuerpos específicos y el porcentaje de proliferación *ex vivo* de células mononucleares de sangre periférica.

Resultados: No se detectaron anticuerpos específicos en suero. El tratamiento *in vivo* con S3Pvac-papaya aumenta significativamente la proliferación de células mononucleares de cerdos que recibieron los cuatro tratamientos *ex vivo*, con respecto a las células mononucleares de cerdos no inmunizados.

No se observaron diferencias significativas en el número de cisticercos recuperados entre los diferentes grupos de cerdos, sin embargo, el grupo inmunizado con S3Pvac-papaya presentó mayor porcentaje de cisticercos macroscópicamente dañados.

Conclusiones: En este trabajo no se encontraron evidencias de protección inducida por S3Pvac-papaya oral que sustenten su aplicación.

Será necesario explorar la capacidad inmunogénica y protectora a diferentes dosis de vacuna oral para establecer su posible utilidad en la prevención de la cisticercosis.

Palabras clave: Inmunización oral, cisticercosis porcina, inmunogenicidad, *Taenia solium*

Abstract

Background: Neurocysticercosis is a parasitic disease caused by the establishment of the larval stage of *Taenia solium*, which can be established in humans or pigs. Among the proposed control interventions include prevention of porcine cysticercosis by vaccination. Has been proposed the vaccine, called S3Pvac, that synthetic or expressed recombinantly induces high levels of protection against porcine cysticercosis in pigs exposed to natural transmission conditions.

Aim: In this study was assessed the immunogenicity and protective effect of oral vaccine S3Pvac papaya against porcine cysticercosis in experimental infection.

Methods: A total of 21 female pigs underwent two immunizations with interval of 15 days, of which, 7 pigs were immunized orally with papaya wild type (callus of papaya), 7 pigs were immunized with S3Pvac -papaya oral doses of 60mg/pig and a control group of 7 pigs, received only saline. Fifteen days after the second immunization pigs experimentally challenged orally with 10,000 eggs of *Taenia solium*. The immunogenicity of the vaccine was evaluated 13 days after to second immunization, quantifying levels of specific antibodies and the percentage of *ex vivo* proliferation of peripheral blood mononuclear cells .

Results: No were detected specific antibodies in serum. The treatment *in vivo* with S3Pvac-papaya significantly increases the proliferation of mononuclear cells of pigs receiving the four treatments *ex vivo*, with respect to the mononuclear cells from immunized pigs .

No significant differences in the number of cysticerci recovered between different groups of pigs were observed, however, the group immunized with S3Pvac-papaya presented highest percentage of macroscopically damaged cysticerci .

Conclusions: In this study no evidence of protection S3Pvac-papaya oral induced to support its application were found.

It will be necessary to explore the immunogenic and protective capacity at different doses of oral vaccine to establish its utility in the prevention of cysticercosis .

Key words: Oral immunization, porcine cysticercosis, immunogenicity, *Taenia solium*

Introducción

La cisticercosis es una enfermedad parasitaria causada por el establecimiento de la fase larvaria de la *Taenia solium* en el hombre y en el cerdo. En ambos hospederos el parásito puede instalarse en el sistema nervioso central causando la neurocisticercosis (NC) (Larralde *et al.*, 1992; citado en Toledo *et al.*, 2001).

Cuando el hombre come carne de cerdo cruda o insuficientemente cocida, con cisticercos, los cisticercos se transforman en el intestino delgado del hombre en un gusano plano segmentado. Como otros céstodos, la *Taenia solium*, en su estado adulto, tiene ambos aparatos reproductores, femenino y masculino, en cada uno de sus proglótidos. Cada proglótido tiene la capacidad, una vez maduros, de producir miles de huevos por día, que se eliminan en las heces del hospedero definitivo (el hombre), contaminando el ambiente. Los huevos pueden eventualmente ser consumidos por su hospedero intermediario (el cerdo), desarrollándose en cisticercos y completando así el ciclo de vida del parásito. El humano y el cerdo pueden adquirir la cisticercosis cuando ingieren agua o alimentos contaminados con huevos del parásito (Sciutto *et al.*, 2000).

La oncósfera, es el estado larvario que se libera del huevo de *Taenia solium* durante su trayecto hasta el duodeno, donde atraviesa la barrera intestinal y llega al torrente sanguíneo, teniendo tropismo en humanos por sus tejidos subcutáneo, muscular, ocular y cerebral (Yoshino, 1993; citado en Mendlovic *et al.*, 2014).

La NC humana es una enfermedad considerada endémica en Yucatán, Guanajuato, Guerrero, Chiapas, Oaxaca, Morelos y Puebla (Fleury *et al.*, 2012). Estudios epidemiológicos recientes realizados en áreas rurales de México sugieren que la transmisión activa persiste, dado que se detectó una alta prevalencia de cisticercosis porcina (13.3%) (Morales *et al.*, 2008). La NC continúa siendo una enfermedad frecuente en México, según el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, dado que su prevalencia se ha mantenido entre el 2-3% durante los últimos 15 años (Fleury *et al.*, 2010). Por estos datos la NC debería considerarse como problema de salud pública e implementar medidas para su control y prevención (Fleury *et al.*, 2012).

Para la prevención y control de la cisticercosis se han considerado diferentes estrategias, como promover hábitos de prácticas de higiene (educación), la letrización, tratamiento masivo contra teniasis y la prevención de cisticercosis porcina por vacunación (Boa *et al.*, 2003; Eddi *et al.*, 2003).

La infección por *Taenia solium* en humanos y cerdos muestra signos de ser vulnerable a la intervención inmunológica. En diferentes estudios se han identificado cisticercos calcificados y/o destruidos aun sin mediar ningún tipo de intervención terapéutica, posiblemente destruidos por el propio sistema inmune de los individuos afectados. En contraste, en el sistema nervioso central de los cerdos los cisticercos se mantienen vesiculares, aparentemente ilesos un año después del desafío probablemente debido a una respuesta inmune menos exacerbada en este compartimento (Aluja *et al.*, 1988; citado en Makepeace *et al.*, 2012).

En el músculo del cerdo, la organización de una respuesta inflamatoria activa alrededor del cisticerco en un grado avanzado de destrucción, incluye la participación secuencial de linfocitos CD4+, CD8+ e IgM+ (Pérez-Torres *et al.*, 2002). La resistencia del hospedero ante la instalación del parásito en fase de cisticerco, se ha asociado al desarrollo de una inmunidad concomitante, donde participan proteínas séricas (sistema de complemento), granulocitos, macrófagos y anticuerpos específicos IgG2a en un microambiente generado por linfocitos T cooperadores con perfil de citocinas proinflamatorias de clase Th1 (Makepeace *et al.*, 2012; Rodríguez-Sosa *et al.*, 2004). Por lo que se infiere que la respuesta inmune asociada a resistencia al cisticerco, inducida por vacunación, debe ser hacia el perfil Th1.

Los péptidos KETc1, KETc12 y KETc7 fueron identificados en estructuras anatómicas del huevo, cisticerco y estadio adulto de *Taenia solium* (Toledo *et al.*, 1999 y 2001). Estos péptidos conformaron la primera versión de la vacuna S3Pvac-sintética, evaluada en comunidades del Estado de Puebla, resultando protectora en contra de la cisticercosis porcina en condiciones naturales de transmisión, reduciendo al 50% la prevalencia y al 98% la cantidad de cisticercos viables (Huerta *et al.*, 2001).

En la evaluación del perfil de citocinas producidas por células mononucleares de sangre periférica de cerdos vacunados vía parenteral con S3Pvac sintética, se

reporta un incremento significativo en la producción de citocinas de perfil Th1 (IL-2 e IFN-gamma), pero no de citocinas de perfil Th2 (IL-4 y IL-10), después de ser estimuladas *ex vivo* con cada uno de los péptidos vacunales (Díaz-Orea *et al.*, 2003). La segunda versión de la vacuna, S3Pvac-fago, con los péptidos vacunales expresados en fagos filamentosos, fue evaluada bajo condiciones naturales de infección en comunidades del Estado de Morelos, reduciendo al 54% la prevalencia y al 89% la cantidad de cisticercos viables (Morales *et al.*, 2008; Morales *et al.*, 2011). En la tercera versión de la vacuna, S3Pvac-papaya, se expresaron los péptidos en clonas de callos embriogénicos de papaya, induciendo 90% de protección contra la cisticercosis experimental murina (*T. crassiceps* en ratones) y cunicula (*T. pisiformis* en conejos) administrada por vía oral; resultados que señalan la factibilidad de este medio de expresión de la vacuna contra la cisticercosis porcina.

Los huevos del parásito ingresan al organismo a través de la mucosa gastrointestinal y considerando que la inmunización oral puede generar inmunidad tanto a nivel de mucosas como a nivel sistémico, esta vía parece entonces aún más promisoría que la parenteral para inducir protección contra *Taenia solium*. Adicionalmente, la vacunación oral reduciría los costos logísticos de aplicación comparando con los de la vacuna parenteral. Este sistema de expresión en células vegetales también permite la producción de antígenos a bajo costo y no requiere de purificación adicional ni refrigeración (Hernández *et al.*, 2007).

Sin embargo, el efecto protector y la respuesta inmune contra la cisticercosis por *Taenia solium*, que induce la vacuna oral S3Pvac-papaya, en el cerdo, aún falta por dilucidar. Con base a lo antes mencionado en el presente trabajo de investigación el objetivo fue evaluar la inmunogenicidad y el efecto protector de la vacuna oral S3Pvac-papaya contra la cisticercosis en cerdos, en condiciones experimentales de infección.

Material y métodos

Se evaluó la vacuna oral S3Pvac-papaya contra la cisticercosis porcina en un estudio de tipo experimental. Se incluyeron 21 cerdos hembra de raza Landrace- Yorkshire de 3 meses de edad, originarios de la misma granja. Se organizaron en 3 grupos (**G1**, **G2** y **G3**) de 7 cerdos cada uno. Los grupos se confinaron en cuartos independientes, fueron alimentados con la misma cantidad y frecuencia de alimento balanceado.

Vacunación.

G1. Se le administró dos dosis de 4 ml/animal de solución salina fisiológica estéril vía subcutánea con intervalo de 15 días, inyectadas detrás de la oreja derecha. Este grupo fue incluido como control negativo, sin tratamiento oral.

G2. Se le administró dos dosis de 60 mg/animal de cayo embriogénico liofilizado de papaya (sin expresión de péptidos vacunales) vía oral con intervalo de 15 días. Este grupo fue incluido para determinar el efecto del cayo embriogénico de papaya sin los péptidos vacunales y diferenciar los efectos atribuibles a la vacuna S3Pvac-papaya (con expresión de los péptidos KETc1, KETc12 y KETc7).

G3. Se le administró dos dosis de 60mg/animal de S3Pvac-papaya vía oral con intervalo de 15 días.

Los dos grupos (**G2** y **G3**) a los que se les administró tratamientos vía oral, fueron entrenados por siete días antes de la administración del primer tratamiento, ofreciéndoles bolas de migajón cubiertas de pan molido y aceite de atún, de 3 cm de diámetro, que en su interior contenían una cápsula con colorante. Dicho entrenamiento tuvo el objetivo de acostumbrar a los cerdos al sabor y consistencia del vehículo (bolas de migajón), en las cuales posteriormente llevarían contenidas tanto las cápsulas de tratamientos (cayos embriogénicos de papaya sin péptidos vacunales, para **G2** y S3Pvac-papaya, para **G3**), como las cápsulas con huevos de *Taenia solium*, en sus respectivos tiempos.

Infección experimental.

La infección experimental se realizó mediante la administración vía oral de huevos de *Taenia solium*, a los 30 días de haber administrado la primer dosis de los tratamientos respectivos.

La dosis de infección fue de 10,000 huevos de *Taenia solium*, contenidos en una cápsula de migajón, pan molido y aceite de atún. Los huevos fueron colectados de proglótidos maduros de un parásito adulto expulsado del intestino de una persona, originaria del Estado de Guerrero, quien recibió un tratamiento antihelmíntico con Niclosamida seguido de laxantes. El tratamiento no dañó la integridad del parásito, dado que funciona sólo a nivel neurológico del céstodo, generando una parálisis neuromuscular, causando la inhibición de anclaje en la mucosa intestinal. La viabilidad de los huevos de la *T. solium* fue comprobada por el método de eclosión de hipoclorito de sodio y bilis, en donde se registró más del 85% de viabilidad de las oncósferas.

Recuperación y conteo de cisticercos.

A los 145 días (T145) del primer tratamiento, se llevó a cabo el sacrificio de todos los cerdos, se recuperaron y contaron cisticercos de diafragma, corazón, lengua, músculos de la pierna y psoas de la media canal izquierda.

Evaluación de la inmunogenicidad de la vacuna oral S3Pvac-papaya.

Para evaluar la inmunogenicidad de la vacuna contra la cisticercosis por *T. solium* se determinó la inmunidad humoral y celular inducida por los antígenos vacunales.

Para evaluar la **respuesta inmune humoral**, se cuantificaron niveles séricos de anticuerpos IgG e IgA totales, específicos a los antígenos vacunales, por medio del ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA, indirecto). Se realizó el ensayo en cada una de las muestras 13 días después de la segunda inmunización.

Para evaluar la **respuesta inmune celular**, se realizaron cultivos de proliferación de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) *ex vivo*, de muestras obtenidas de tres cerdos por cada grupo, 13 días después de la segunda inmunización. Se realizó un cultivo de CMSP tratadas con tinción de carboxifluorosceín diacetato succinimidil ester (CFSE) como marcador de proliferación celular. El conteo de células se hizo por citometría de flujo.

Las CMSP se obtuvieron por separación por diferencia de densidad con ficoll, seguida de centrifugación a 2500 rpm por 30 minutos por 4°C. El procedimiento de obtención, conteo y cultivo de CMSP se realizó el mismo día de la toma de muestra, para tener la mayor viabilidad celular posible.

El fundamento de la técnica con CFSE, estriba en que esta molécula es una sonda fluorescente que tiene la capacidad de permear en la célula y unirse a proteínas intracelulares. A medida que ocurre la división celular se diluye a la mitad entre las células hijas, al final del cultivo de proliferación, que dura 5 días, por medio de citometría de flujo se detecta su fluorescencia y se calcula el índice de proliferación de cada tratamiento con respecto al tratamiento con solo medio de cultivo (M).

Se transfirieron por cada cerdo 0.2×10^6 células (CMSP/100µL de RPMI) a placas de cultivo de 96 pozos con 4 tratamientos por triplicado, cultivadas a temperatura de 37°C, 5% CO₂ y recuperadas a los 5 días..

1. **Tratamiento M:** Sin estímulo, sólo con medio de cultivo (RPMI), como control negativo.
2. **Tratamiento FV:** Antígenos totales de fluido vesicular de un cisticerco, como control de infección experimental (si proliferan significa que tuvieron previo desafío con cisticercos).
3. **Tratamiento S3Pvac:** Péptidos vacunales de S3Pvac, tratamiento experimental.
4. **Tratamiento Con A:** Fitomitógeno que desencadenan una respuesta policlonal u oligoclonal. Es un control positivo, pero inespecífico, ayuda a asegurarse que las células de la muestra en cuestión estén viables y haya población de linfocitos T.

Evaluación del efecto protector de la vacuna oral S3Pvac-papaya.

Para evaluar el efecto protector se estimó la carga parasitaria a partir del conteo directo de cisticercos viables y no viables instalados en diafragma, corazón, lengua, los músculos de la pierna y psoas. De los dos últimos músculos sólo se consideró la parte izquierda de la canal, para facilitar el conteo.

Solo se tomaron en cuenta los cisticercos vesiculares como viables y las demás fases de destrucción del cisticerco como no viables, dado que los cisticercos

coloidales, caseosos y calcificados son aquellos que ya no pueden convertirse en tenias adultas, por lo que ya no representan un riesgo a la salud. El cisticerco vesicular de *T. solium* es una vesícula ovalada y translúcida, llena de líquido y mide de 0,5 a 2 centímetros de largo, dotada de un pequeño escólex en su interior. El cisticerco coloidal es una vesícula cuyo contenido pierde fluidez, adquiere aspecto lechoso, gelatinoide en consistencia; la larva se fragmenta fácilmente. El cisticerco caseoso está disminuido de tamaño, la membrana propia se encuentra íntimamente adherida a la cápsula de colágena secundaria formada por el tejido del hospedero, la parte central presenta un contenido caseoso que impide la identificación del escólex. El cisticerco calcificado, se caracteriza por un nódulo de consistencia dura, tamaño reducido y la superficie de corte es blanca.

Análisis estadístico.

Para comparar el porcentaje de proliferación *ex vivo* del tratamiento medio de cultivo (**M**) con cada tratamiento (**FV**, **S3Pvac**, **Con A**) se utilizó prueba exacta de Fisher. Para comparar el porcentaje de cisticercos destruidos para determinar el posible efecto protector entre grupos, se utilizó Chi cuadrada.

Instalaciones y ubicación del equipo.

Los ensayos de ELISA y de proliferación celular por Citometría de Flujo fueron realizados en el Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México; el sacrificio, las necropsias de los cerdos y conteo de cisticercos se llevaron a cabo en el Centro Nacional De Investigación Disciplinaria En Microbiología Animal (CENID-MA) del INIFAP de Palo Alto, Delegación Cuajimalpa, México, D.F.

Resultados

Proliferación *ex vivo* de células mononucleares de sangre periférica, en cultivos con y sin estimulación con antígenos vacunales. En la **Tabla 1** se muestra que el grupo 3 (**G3**), que recibió el tratamiento *in vivo* de S3Pvac-papaya, aumenta significativamente el porcentaje de CMSP que recibieron los cuatro tratamientos *ex vivo*, con respecto a las CMSP de cerdos no inmunizados (**G1** y **G2**) ante los mismos tratamientos *ex vivo*.

Tabla 1

Porcentaje de proliferación *ex vivo* de células mononucleares de sangre periférica, en cultivos con y sin estímulo con antígenos vacunales.

Tratamientos <i>in vivo</i>	Id.	Tratamientos <i>ex vivo</i>			
		Medio	Fluido vesicular	S3Pvac	Concanavalina A
solución salina (G1)	259	2.23	2.22	2	6.54
	269	2.98	4.46	4.73	8.38
	270	3.12	3.58	4.54	9.12
	X±SD	2.8 ± 0.5	3.4 ± 1.1	3.8 ± 1.5	8.0 ± 1.3
Papaya (G2)	584	2.12	2.57	1.93	5.53
	850	4.57	ND	3.88	11.3
	858	20.5	20.86	20	27.89
	X±SD	9.9 ± 1.0	11.7 ± 12.9	8.6 ± 9.9	14.9 ± 11.6*
S3Pvac papaya (G3)	106	21.44	22.45	19.78	41.17
	356	17.92	12.56	12.57	60.65
	614	9.27	6.6	7.37	32.4
	X±SD	16.2 ± 9.3*	16.2 ± 6.3*	13.2 ± 6.2*	44.7 ± 11.5**

*Diferencia estadísticamente significativa con respecto a los resultados de controles en tratamientos *in vivo* (p=0.06), **p<0.05, se utilizó prueba exacta de Fisher.

ND no determinada.

Id.: Identificación del cerdo de acuerdo a su número de chip implantado.

X: Media

SD: Desviación estándar

Niveles séricos de anticuerpos específicos IgG e IgA totales contra los péptidos de la vacuna S3Pvac-papaya. En la Tabla 2 se muestra que no se detectaron anticuerpos séricos IgG e IgA específicos a S3Pvac-papaya e IgA específico a Papaya.

Tabla 2

Densidades ópticas(DO 450nm) de anticuerpos específicos IgG e IgA totales contra los antígenos vacunales

Tratamientos <i>in vivo</i>	Id.	Anticuerpo/Antígeno			Resultado
		IgG/ S3Pvac	IgA/ Papaya	IgA/ S3Pvac- papaya	
solución salina (G1)	784	0.040	0.358	0.373	Negativo
	17	0.045	0.682	0.866	Negativo
	273	0.131	0.868	1.153	Negativo
	282	0.010	0.600	0.808	Negativo
	259	0.019	0.185	0.199	Negativo
	269	0.047	0.206	0.247	Negativo
	270	0.030	0.252	0.290	Negativo
Promedio		0.046	0.450	0.562	
Papaya (G2)	850	0.019	0.069	0.174	Negativo
	610	0.038	0.546	0.735	Negativo
	806	0.131	1.208	1.574	Negativo
	375	0.108	0.929	1.241	Negativo
	65	0.098	0.813	1.033	Negativo
	584	0.039	0.182	0.220	Negativo
	858	0.023	0.257	0.294	Negativo
Promedio		0.065	0.572	0.753	
S3P-papaya (G3)	360	0.056	0.268	0.335	Negativo
	15	0.138	0.928	1.157	Negativo
	10	0.544	1.059	1.338	Negativo
	614	0.038	0.276	0.292	Negativo
	106	0.040	0.237	0.212	Negativo
	356	0.060	0.202	0.242	Negativo
	356	0.006	0.010	0.033	Negativo
Promedio		0.126	0.425	0.515	

Id.: Identificación del cerdo de acuerdo a su número de chip implantado.

Número de cisticercos viables y no viables, recuperados en la necropsia. En la **Tabla 3** se muestra que el tratamiento S3Pvac-papaya, no reduce la cantidad de cisticercos establecidos, pero aumenta significativamente la cantidad de cisticercos dañados.

Tabla 3
Número de cisticercos establecidos y porcentaje de cisticercos destruidos.

Tratamiento	Id.	Cisticercos establecidos		Total	% Destrucción de cisticercos/ Individual	% Destrucción de cisticercos/ Grupo
		Viables	No viables			
solución salina	784	1	22	23	95,7	43,2 ^a
	270	66	16	82	19,5	
	17	0	0	0	0	
	259	21	7	28	25	
	269	25	30	55	54,5	
	273	0	9	9	100	
	282	0	2	2	100	
$\bar{X} \pm SD$				28.4 ± 30.2		
Papaya	850	6	10	16	62,5	51.4 ^a
	858	114	3	117	2,6	
	610	12	3	15	20	
	806	0	66	66	100	
	375	0	32	32	100	
	65	2	17	19	89,5	
	584	0	11	11	100	
$\bar{X} \pm SD$				39.4 ± 39.0		
S3Pvac papaya	360	55	0	55	0	64.7 ^b
	15	0	23	23	100	
	10	49	61	110	55,5	
	356	0	2	2	100	
	78	0	51	51	100	
	106	42	34	76	44,7	
	614	1	98	99	99	
$\bar{X} \pm SD$				59.4 ± 38.9		

Superíndice ^a: No hubo diferencias significativas.

Superíndice ^b: Diferencia estadísticamente significativa con respecto a los resultados de controles en tratamientos *in vivo* p<0.05. Se utilizó Chi²

Id.: Identificación del cerdo; \bar{X} : Media; SD: Desviación estándar

Discusión

En este estudio observamos que la vacuna oral S3Pvac-papaya con dos dosis de 60mg/cerdo en intervalos de 15 días, aumentó el porcentaje de cisticercos destruidos (64.7%) en cerdos en condiciones experimentales de infección; no se encontraron evidencias de un incremento significativo de anticuerpos específicos, y se encontró aumentada la proliferación de células mononucleares.

Al respecto de la respuesta inmune celular inducida, se observó en los cerdos inmunizados con S3Pvac-papaya (**G3**), CMSP con altos porcentajes de proliferación *ex vivo* estadísticamente con diferencia significativa, al compararlos con grupos control (**G1** y **G2**). Estos resultados indican que la vacuna promueve la proliferación celular de manera no específica y este nuevo status inmunológico podría resultar en lograr dañar el parásito instalado con mayor eficiencia aunque no reducir el número de cisticercos que se instalan.

El perfil inmunológico observado en este trabajo se asemeja al previamente reportado en ratones. En ratones inmunizados con los diferentes péptidos vacunales sintéticamente expresados, se ha observado la respuesta inmune celular exacerbada con incremento en la capacidad proliferativa de linfocitos CD4+ y CD8+ en bazo y CD8+ en placas de Peyer, mientras que sólo se observan pequeños incrementos en la respuesta humoral inducida (Toledo *et al.*, 1999; 2001). Resultados similares se han obtenido en cerdos inmunizados con los péptidos sintéticos (Díaz-Orea *et al.*, 2003). Más recientemente se han reportado el efecto de los péptidos vacunales en el aumento de la capacidad proliferativa *in vitro* sobre células mononucleares de humanos enfermos de NCC e individuos sanos. (Díaz-Orea *et al.*, 2013).

La proliferación exacerbada de las CMSP del **G3**, inclusive sin estímulo *ex vivo* (Tratamiento **M**), sugiere que las células de los cerdos inmunizados con S3Pvac-papaya, cuando fueron transferidas a las placas de cultivo, ya estaban activadas y proliferándose. Una respuesta similar de proliferación de larga duración también fue reportada por Guo (2004) en CMSP frente a otro antígeno vacunal contra cisticercosis GST-cC1 (no presente en esta vacuna), aislado de *Taenia solium*, donde reportaron una respuesta de proliferación exacerbada que persistió hasta 20 semanas pos inmunización.

Inducir una respuesta inmune protectora contra patógenos es tan útil como complejo, dado que son muchos y variados los factores atribuibles a los antígenos vacunales (tipo y dosis), hospedero (fenotipo y genotipo), y al ambiente del hospedero, pueden influir en el tipo de respuesta.

El hospedero se esfuerza en mantener la homeostasis de la mucosa, respondiendo a antígenos con tolerancia, en lugar de la activación inmune. Estudios *in vitro* de co-cultivo de cisticercos con células dendríticas y linfocitos, demuestran que existen antígenos del parásito que pueden inducir en células dendríticas la expresión de genes que puedan regular la inflamación, al promover la diferenciación de los linfocitos T a células CD25^{high} Foxp³+ CD4 (Adalid-Peralta *et al.*, 2013).

Aunque la vacuna oral a la dosis empleada parece exacerbar la proliferación de CMSP, este evento no resultó en modificar la cantidad de cisticercos instalados, sin embargo, aumenta significativamente el porcentaje de cisticercos dañados. Una de las posibles razones por las que pudo haber sido insuficiente la capacidad protectora de la vacuna S3Pvac-papaya, fue el tamaño del desafío, es decir, la cantidad de huevos de *T. solium* que se empleó para infectar experimentalmente a los cerdos. En un estudio sobre la infección experimental de cisticercosis porcina con diferente número de huevos de *T. solium*, realizado por Santamaría en el 2002, reportó que el número de cisticercos que se establecen exitosamente puede regular los mecanismos de evasión del sistema inmune. Mientras que en este estudio se utilizaron 10,000 huevos para infectar experimentalmente a los cerdos, otros autores han reportado haber empleado menos de 2500 huevos (Aluja, 1999; Santamaría *et al.*, 2002).

Además de las evidencias de inmunogenicidad de la vacuna S3Pvac, existen varias razones para seguir estudiando y mejorando el efecto protector de la vacuna S3Pvac-papaya. Las plantas transgénicas son sistemas ideales para producir vacunas orales dado que la pared de la célula vegetal puede proteger a los antígenos vacunales de la degradación por enzimas estomacales, permitiendo su efectiva presentación en los tejido linfoides asociados a mucosas (MALT) (Hernández *et al.*, 2007). Siendo que las versiones anteriores de la vacuna, que contienen los tres péptidos KETc1, KETc12 y KETc7, han resultado efectivas contra

la cisticercosis porcina en campo (Huerta *et al.*, 2001; Morales *et al.*, 2008) y que el desarrollo de una vacuna de vía oral podría ser administrada extensivamente para la prevención de la cisticercosis porcina y que podría inducir, a diferencia de la parenteral, inmunidad específica tanto local (mucosa intestinal) como sistémica (Manoutcharian *et al.* 2004), es importante continuar con las investigaciones con este candidato vacunal. Evaluar la misma vacuna oral en diferentes dosis y repeticiones, en cerdos infectados experimentalmente y en cerdos en condiciones naturales de transmisión, sería conveniente para dilucidar las condiciones óptimas del esquema de vacunación y presentación de la vacuna.

Conclusiones

Este estudio sugiere que la vacuna oral S3Pvac-papaya a la dosis empleada exacerba la proliferación de células mononucleares de sangre periférica, pero este evento no modificó la cantidad de cisticercos instalados. Sin embargo, aumenta significativamente el porcentaje de cisticercos dañados. Los péptidos vacunales expresados en cayos embriogénicos de papaya, en dos dosis de 60mg/cerdo aplicadas con intervalo de 15 días, no es adecuada para prevenir la cisticercosis por *Taenia solium*, en condiciones experimentales de infección, utilizando dosis de 10,000 huevos para el desafío. Es necesario evaluar diferentes dosis de vacuna en miras de aumentar la capacidad protectora de la vacuna. Cabe señalar que considerando que la mayor parte de los cerdos en condiciones naturales de infección se exponen a desafíos con menor número de huevos, por lo tanto queda por evaluar la capacidad protectora de la vacuna ante menores desafíos.

Referencias

1. Adalid-Peralta L, Arce-Sillas A, Fragoso G, Cárdenas G, Rosetti M, Casanova-Hernández D, Rangel-Escareño C, Uribe-Figueroa L, Fleury A, Sciutto E (2013); "Cysticerci drive dendritic cells to promote in vitro and in vivo Tregs differentiation". *Clin Dev Immunol.*;2013:981468.
2. Aluja A S, Vargas G (1988); "The histopathology of porcine cysticercosis". *Vet. Parasitol*, 28: 65-77.
3. Aluja, A S, Villalobos A, Plancarte LF, Rodarte M, Hernández C, Zamora y Sciutto E (1999); *Taenia solium* cysticercosis: immunity in pigs induced by primary infection. *Veterinary Parasitology* 81(2): 129-135.
4. Boa M., Mukaratirwa S, Willingham AL, Johansen MV (2003); Regional action plan for combating *Taenia solium* cysticercosis/taeniosis in Eastern and Southern Africa. *Acta Tropica*, 87: 183-186.
5. Díaz-Orea MA, Villalobos N, Aluja A, Rosas G, Gómez-Conde E, Hernández P, Larralde C, Sciutto E, Fragoso G (2003); Th1 and Th2 indices of the immune response in pigs vaccinated against *Taenia solium* cysticercosis suggest various host immune strategies against the parasite. *Vet Immunol Immunopathol.*;93:81-90.
6. Díaz-Orea MA, Mijares JM, Arcega R, Gómez-Conde E, Castellanos-Sánchez VO, Briones-Rojas R, Flores-Alonso JC, Marín-Briones MÁ, Santos-López G (2013); *In vitro* effect of the S3Pvac vaccine against cysticercosis in human mononucleate cells. *Rev Neurol*. May 1;56(9):456-63.
7. Eddi, E, Nari A, Amanfu W (2003); *Taenia solium* cysticercosis/taeniosis: potential linkage with FAO activities; FAO support possibilities. *Acta Tropica*, 87: 145-148.
8. Fleury A, Moreno García J, Valdez Aguerrebere P, de Sayve Durán M, Becerril Rodríguez P, Larralde C, Sciutto E (2010); Neurocysticercosis, a persisting health in Mexico. *PLoS Negl Trop Dis*, 4: e805.
9. Fleury A, Sciutto E, Larralde C. (2012); Neurocysticercosis is still prevalent in Mexico. *Salud Publica Mex*.Nov-Dec;54(6):632-6.
10. Guo, YJ, Sun SH, Zhang Y, Chen ZH, Wang KY, Huang L, Zhang S, Zhang HY, Wang QM, Wu D, Zhu WJ (2004); Protection of pigs against *Taenia solium* cysticercosis using recombinant antigen or in combination with DNA vaccine. *Vaccine*, 28;22 (29-30):3841-7.
11. Hernández M, Cabrera-Ponce JL, Fragoso G, López-Casillas F, Guevara-García A, Rosas G, León-Ramírez C, Juárez P, Sánchez-García G, Cervantes J, Acero G, Toledo A, Cruz C, Bojalil R, Herrera-Estrella L, Sciutto E (2007); A new highly effective anticysticercosis vaccine expressed in transgenic papaya. *Vaccine*, 25: 4252-4260.

12. Huerta M, de Aluja AS, Fragoso G, Toledo A, Villalobos N, Hernandez M, Gevorkian G, Acero G, Diaz A, Alvarez I, Avila R, Beltran C, Garcia G, Martinez JJ, Larralde C, Sciutto E (2001); Synthetic peptide vaccine against *Taenia solium* pig cysticercosis: successful vaccination in a controlled field trial in rural Mexico. *Vaccine*, 20: 262-266.
13. Larralde C, Padilla A, Hernández M, Govezensky T, Sciutto E, Gutiérrez G, Tapia-Conyer R, Salvatierra B, Sepúlveda J (1992); Seroepidemiology of cysticercosis in Mexico. *Salud Publica Mex.* 34:197-210.
14. Manoutcharian K, Rosas G, Hernandez M, Fragoso G, Aluja A, Villalobos N, Rodarte LF, Sciutto E (1996); Cysticercosis: identification and cloning of protective recombinant antigens. *J Parasitol*, 82: 250-254
15. Manoutcharian K, Díaz-Orea A, Gevorkian G, Fragoso G, Acero G, González E, De Aluja A, Villalobos N, Gómez-Conde E, Sciutto E (2004); Recombinant bacteriophage-based multiepitope vaccine against *Taenia solium* pig cysticercosis. *Vet Immunol Immunopathol.* 2004 May;99(1-2):11-24
16. Makepeace BL, *et al* (2012); Granulocytes en Helminth Infection-Who is Calling the Shots?" *Current Medical Chemistry.* 2012 April; 19(10): 1567–1586.
17. Manoutcharian K, Díaz-Orea A, Gevorkian G, Fragoso G, Acero G, González E, De Aluja A, Villalobos N, Gómez-Conde E, Sciutto E. (2004) "Recombinant bacteriophage-based multiepitope vaccine against *Taenia solium* pig cysticercosis". *Vet Immunol Immunopathol.* May;99(1-2):11-24.
18. Mendlovic F, Garza-Rodríguez A, Carrillo-Farga J, González-Domínguez F, Maravilla P, Flisser A. (2014); From stillness to motion: 80 years after the first description of *Taenia solium* oncosphere hatching. *Parasit Vectors.* Jan 16;7(1):12.
19. Morales J, Martínez JJ, Manoutcharian K, Hernández M, Fleury A, Gevorkian G, Acero G, Blancas A, Toledo A, Cervantes J, Maza V, Quet F, Bonnabau H, de Aluja AS, Fragoso G, Larralde C, Sciutto E (2008); Inexpensive anti-cysticercosis vaccine: S3Pvac expressed in heat inactivated M13 filamentous phage proves effective against naturally acquired *Taenia solium* porcine cysticercosis. *Vaccine*, 26: 2899-2905.
20. Morales J, De Aluja A, Martínez JJ, Hernández M, Rosas G, Villalobos N, Hernández B, Blancas A, Manoutcharian K, Gevorkian G, Cervantes J, Díaz A, Fleury A, Fragoso G, Larralde C, Sciutto E (2011); Recombinant S3Pvac-phage anticysticercosis vaccine: simultaneous protection against cysticercosis and hydatid disease in rural pigs. *Vet Parasitol.* Feb 28;176(1):53-8
21. Pérez-Torres A, Ustarroz M, Constantino F, Villalobos N, de AA (2002); *Taenia solium* cysticercosis: lymphocytes in the inflammatory reaction in naturally infected pigs. *Parasitol Res.* Feb;88(2):150-2.

22. Rodríguez-Sosa, M *et al.* (2004); A STAT4- Dependent Th1 Response Is Required for Resistance to the Helminth Parasite *Taenia crassiceps* . Infection and Immunity, Aug: 4552-4560.
23. Santamaría E, Plancarte A, de Aluja AS. (2002); The experimental infection of pigs with different numbers of *Taenia solium* eggs: immune response and efficiency of establishment. J Parasitol. 2002, Feb;88(1):69-73.
24. Sciutto E, Fragoso G, Trueba L, Lemus D, Montoya RM, Díaz ML, Govezensky T, Lomeli C, Tapia G, Larralde C (1990); Cysticercosis vaccine: cross protecting immunity with *T. solium* antigens against experimental murine *T. crassiceps* cysticercosis. Parasite Immunology 12(6):687-696.
25. Sciutto E, Fragoso G, Fleury A, Lacleste JP, Sotelo J, Aluja AS, Vargas L, Larralde C (2000); *Taenia solium* disease in humans and pigs: an ancient parasitosis disease rooted in developing countries and emerging as a major health problem of global dimensions. Microbes and Infection 2(15):1875-1890.
26. Toledo A, Larralde C, Fragoso G, Gevorkian G, Manoutcharian K, Hernández M, Acero G, Rosas G, Lopez-Casillas F, Garfias-Kubli C, Vázquez R, Terrazas I, Sciutto E (1999); Towards a *Taenia solium* cysticercosis vaccine: an epitope shared by *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* protects mice against experimental cysticercosis. Infect Immun, 67: 2522-2530.
27. Toledo A, Fragoso G, Rosas G, Hernández M, Gevorkian G, López-Casillas F, Hernández B, Acero G, Huerta M, Larralde C, Sciutto E (2001); Two epitopes shared by *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* confer protection against murine *T. crassiceps* cysticercosis along with a prominent T1 response. Infect Immun, 69: 1766-1773.
28. Yoshino K. (1993); Studies on the post-embryonal development of *Taenia solium* on the hatching of the eggs of *Taenia solium*. J Formosa Med Ass. 1933;7:139-142.