



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE CIENCIAS

EVALUACIÓN EXPERIMENTAL DE DIFERENTES ESTRATEGIAS DE
VACUNACIÓN EN CONTRA DE LA TENIASIS/CISTICERCOSIS

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

P R E S E N T A

M. EN C. CARMEN LETICIA CRUZ REVILLA

Directora de tesis: Dra. Edda Lydia Sciutto Conde

MÉXICO, D.F.

JUNIO, 2006



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este trabajo de tesis se realizó en el Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, en la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección de la Dra. Edda Sciutto Conde.

El comité tutorial que evaluó el desarrollo del trabajo doctoral estuvo integrado por:

Dra. Gladis Fragoso Gonzáles

Dr. Fernando López Casillas

Durante el desarrollo de los créditos de doctorado se contó con una beca otorgada por el CONACYT y una beca complementaria otorgada por la DGEP (UNAM).

Mi agradecimiento al personal del Bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM; especialmente a Gerardo Arrellín y Georgina Díaz, quienes nos han provisto de la ayuda técnica y los animales necesarios para este trabajo. A Valentín Mendoza, por todo su apoyo técnico en el laboratorio.

Agradecimientos

- *A mis papás, por brindarme todo su amor y confianza, y estar siempre presentes, apoyándome siempre en todos mis proyectos. Mamá, que bueno que estas aquí para compartir estos momentos conmigo. Papá, siempre estás conmigo. Los amo.*

“El amor es la compensación de la muerte, su correlativo esencial”

- *Manolo: gracias por toda tu comprensión, apoyo, confianza y amor. Te quiero muchísimo.*
- *A mi tía Lupe y Ximena, por todo su cariño, sigan adelante en todo lo que se propongan como hasta ahora.*
- *A mi prima Lupita, a Natalia y Toño, gracias por todo su cariño y apoyo.*

- *Jaime, no sabes lo que disfruto compartir contigo este proyecto de vida, compartírnos a nosotros y a nuestro bebe. Te amo.*

“Uno puede hacer en la vida lo que quiere, siempre y cuando no intente justificarlo. Contra cada lágrima el buen conjuro de un deseo, para cada instante en que se nos agoten los deseos, el alivio y la insensatez de una seducción. A ratos, movidos por la cordura y las leyes, tendemos a acusarnos de fáciles, excedidos, de tontos: nunca debí enredarme con las nubes, besándose hasta imaginar el absoluto. De todos los pecados que condena la Biblia, el primero es rendirse a la seducción. Hay que cometerlo a diario, no sólo para contradecir las instrucciones bíblicas, sino porque a veces cuesta vivir, y no hay como abandonarse a la seducción para encontrar, cada jornada, los mil motivos que tiene la vida para hacer que la veneremos.”

Angeles Mastretta

Ana y Teobaldo, gracias por recibirme en su casa y darme todo su cariño.

- *Nuri, Sebastián y Arat, por su apoyo y cariño, y por hacerme más agradables las tardes.*
- *Gabys, por compartir esta amistad, sabes todo lo que significa.*
- *Yoshy, por todo el apoyo durante todos estos años, tus charlas, tu sonrisa y locuras me hicieron pasar grandes momentos dentro y fuera del laboratorio.*
- *Andrea, Jacko, y Jaz por compartir esta amistad y tantos momentos agradables dentro y fuera del laboratorio, por estar ahí cuando se les necesita.*
- *Gina, Crys, Adery y Rodrigo, por brindarme su amistad y compartir tantos momentos juntos, y aunque a veces no nos vemos todo lo que queremos, sabemos que estamos ahí para los demás.*
- *Adam, por compartir conmigo este trabajo y brindarme tu amistad.*
- *Paco, sin ti no nos hubiera sido posible seguir y llegar hasta el final. Mil gracias por dejarme dormir mientras hacías los viajes por mí.*
- *A Mercedes Baca, quién es un ejemplo a seguir, gracias por todo tu apoyo.*
- *A todos mis compañeros y amigos del IBB y del IFICE, por todo su apoyo, comentarios y amistad: Gonzalo, Anahí, Dulce María, Ely, Raúl, Antonio, René, Brenda, Elvis, Mayra, Laura, Mario, Gaby Rosas, Bárbara, Angie,*

Agnes, Dunia, Male, Paty, Gaby.

- *Gracias Vale, por todo el apoyo y disposición incondicional, al compartir conmigo tu amistad y toda tu experiencia en el laboratorio.*
- *Al Dr. Fernando López Casillas por todo el tiempo y la asesoría que le brindó a este trabajo y la oportunidad de realizar parte de este proyecto en su laboratorio.*
- *A Glá, por todos tus comentarios y apoyo a lo largo de todo este tiempo.*
- *Gracias Edda, por todo el apoyo que he recibido de tí y aunque el camino ha sido muy arduo, hoy por fin lo completamos.*

A veces no puedes recordar a todos los que han estado contigo en algún momento, apoyándote, brindándote su amistad y confianza para seguir adelante, porque muchas veces no todos se quedan con nosotros, pero su presencia en los momentos precisos son imprescindibles en la vida. Gracias por compartir conmigo momentos de sus vidas.

“El triunfo, la gloria son pasajeras; hay que matar un toro tras otro para aplazar nuestra propia derrota final, el día que nuestro toro nos mate; hay que cortar oreja y rabo y salir en triunfo todos los días que nos dure la vida”

Carlos Fuentes

INDICE

I. RESUMEN	9
II. ABSTRACT	11
III. INTRODUCCIÓN	12
IV. ANTECEDENTES	22
V. OBJETIVOS	
A. GENERALES	35
B. ESPECÍFICOS	35
VI. HIPOTESIS	35
VII. MATERIALES Y MÉTODOS	36
VIII. RESULTADOS	52
IX. DISCUSIÓN	63
X. CONCLUSIONES PARTICULARES Y GENERALES	68
XI. PERSPECTIVAS	70
XII. APENDICE I	
Artículos que incluyen los resultados de este trabajo de tesis	71
1. C. Cruz-Revilla, A. Sonabend, G. Rosas, A. Toledo, G.. Meneses, F. Lopez-Casillas, B. Hernández, G. Fragoso, and E. Sciutto. 2006. Intrahepatic DNA vaccination: unexpected increased resistance against murine cysticercosis induced by non-specific enhanced immunity. <i>Journal of Parasitology</i> . En prensa.	
2. C. Cruz-Revilla, A. Toledo, G. Rosas, M. Huerta, I. Flores-Perez, N. Peña, J. Morales, J. Cisneros-Quiñones, G. Meneses, A. Díaz-Orea, N. Anciant, F. A. Goldbaum, A. Aluja, C. Larralde, G. Fragoso, and E. Sciutto. 2006. Effective protection against experimental <i>Taenia solium</i> tapeworm infection in hámsteres by primo-infection and by vaccination with recombinant or synthetic heterologous antigens. <i>Journal of Parasitology</i> . En prensa.	
XIII. APENDICE II	72
Artículos en colaboración durante el programa de doctorado	
1. Gemma García, Edda Sciutto, Marco V. José, Gladis Fragoso, Carmen Cruz-Revilla , Andrea Toledo, Nelly Villalobos, Ivan Flores, Aline Aluja, and Carlos Larralde. 2001. Inhibitory role of antibodies in the development of <i>Taenia solium</i> and <i>Taenia crassiceps</i> toward	

- reproductive and pathogenic stages. *Journal of Parasitology*, Vol. 87(3) 582-586.
2. Sciutto, E., Toledo A., **Cruz-Revilla, C.**, Rosas, G., Meneses, G., Laplagne D., Ainciart, N., Cervantes J., Fragoso G., Goldbaum, F. A. 2005. *Brucella spp* lumazine synthase: a novel antigen delivery system. *Vaccine*. 23(21) 2784-90.
 3. Gabriela Rosas, Gladis Fragoso, Natalia Ainciart, Fernando Esquivel-Guadarrama, Oscar Ramírez-Pliego, Angélica Santana, Andrea Toledo, **Carmen Cruz-Revilla**, Gabriela Meneses, Raúl J. Bobes, Paula Berguer, Fernando A. Goldbaum, and Edda Sciutto. 2006. *Brucella spp*. lumazine synthase: A novel adjuvant and antigen delivery system to effectively induce oral immunity. *Microbes and infection*. En prensa.
 4. E. Sciutto, J. Morales, J.J. Martinez, A. Toledo, M. N. Villalobos, **C. Cruz**, G. Meneses, M. Hernández, A. Diaz, L.F. Rodarte, G. Acero, G. Gervorkian, K. Manoutcharian, J. Paniagua, G. Fragoso, A. Fleury, R. Larralde, A. S. De Aluja and C. Larralde. *Taenia solium* cisticercosis: Limits of effective pigs vaccination in controlling transmission. 2006. *Parasitology*. En prensa.

XIV. BIBLIOGRAFÍA

1. RESUMEN

La cisticercosis causada por *Taenia solium* es una enfermedad parasitaria que afecta al hombre y al cerdo, constituyendo un serio problema socioeconómico en países en desarrollo. Para su control se han contemplado diferentes alternativas que implican modificaciones sociales e intervenciones biotecnológicas. En esta tesis se evalúan las posibilidades de vacunación para aumentar la resistencia del hospedero intermediario (el cerdo) y el hospedero definitivo (el hombre).

Para este propósito se ha utilizado un conjunto de péptidos identificados en nuestro grupo que, expresados en forma sintética o recombinante, inducen por inmunización sistémica altos niveles de protección contra la cisticercosis murina por *Taenia crassiceps* y porcina por *Taenia solium*. Considerando su alta capacidad inmunogénica, se han expresado en diferentes sistemas con el propósito de reducir los costos de producción y aumentar su inmunogenicidad.

Entre los antígenos protectores identificados figura el denominado KETc7. La capacidad protectora de este antígeno se confirmó a través de inmunización con DNA tanto por vía intramuscular como intradérmica, utilizando una construcción que incluía la secuencia señal del receptor del betaglicano, un promotor viral fuerte (CMV), y la secuencia de KETc7 clonada en el vector pcDNA3. Esta construcción (pTc-sp7) indujo altos niveles de protección en contra de la cisticercosis experimental murina. En este trabajo utilizamos el antígeno KETc7 en inmunización génica para evaluar las posibilidades del uso de un promotor inducible, que permita una expresión diferencial *in vivo*. KETc7 se clonó en el vector pGEM 11Zf(+), con el promotor/región reguladora de la enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK), que se expresa de manera tejido-específico y cuya expresión se puede regular mediante el control de la dieta y/o ayuno, y que incluye la secuencia de poliadenilación de la hormona de crecimiento humano (hGH). La construcción pPc-sp7 se evaluó *in vitro* e *in vivo* para confirmar su expresión, su efecto en la susceptibilidad a la cisticercosis murina y la respuesta inmune generada. La inmunización con las diferentes construcciones (pPc-sp7, pTc-sp7 y el vector vacío pGEM 11Zf(+)) indujo altos niveles de protección aunque no se observó inmunidad específica. La inmunización con pGEM 11Zf(+), el cual contiene el mayor número de secuencias CpG,

indujo los más altos niveles de protección, aunado al aumento en el número de esplenocitos e incremento en la producción de INF- γ intrahepático.

Simultáneamente y considerando que los 3 péptidos identificados (GK1, KETc1, KETc12) que constituyen la vacuna sintética contra cisticercosis porcina S3Pvac se expresan en la fase adulta de *T. solium*, se exploraron las posibilidades de protección en contra de la teniasis intestinal en condiciones experimentales. Se utilizó como vacuna S3Pvac por vía subcutánea y al péptido KETc1 como quimera recombinante asociado a la proteína polimérica lumazina sintetasa (BLS-KETc1). Ambos inmunógenos indujeron altos niveles de protección en contra de la teniasis intestinal por *T. solium* en hámsteres dorados. Los hallazgos obtenidos señalan por primera vez la posibilidad de generar una nueva herramienta para el control de la teniasis-cisticercosis a través de la prevención de la teniasis intestinal por vacunación oral.

2. ABSTRACT

Experimental murine cysticercosis caused by *Taenia crassiceps* has proved to be a useful model with which to test the efficacy of new vaccine candidates and delivery systems against pig cysticercosis. A high level of protection against murine cysticercosis was previously observed by intramuscular or intradermal DNA immunization using the sequence of the recombinant KETc7 antigen cloned in pcDNA3 (pTc-sp7). To determine the effect of KETc7 differential expression in DNA vaccination, KETc7 was cloned in pGEM 11Zf(+) under the control of the tissue-specific regulatory promoter PEPCK. A high level of protection was induced by intrahepatic immunization with pPc-sp7, pTc-sp7 and the empty vector in the absence of any specific immunity. pGEM 11Zf(+), the plasmid with the highest content of CpG sequences, provided to the most efficient protection. This protection was related to an increased number of splenocytes, enhanced non-specific splenocyte proliferation, and intensified intrahepatic INF- γ production. Overall, intrahepatic plasmid CpG-DNA immunization provokes an exacerbated non-specific immune response that can effectively control *Taenia crassiceps* cysticercosis.

The disease caused by *Taenia solium* is progressively being recognized as a growing global threat for public human health and pig husbandry that requires the development of effective control measures. A central participant in the taeniasis/cysticercosis transmission network is the human carrier of the adult tapeworm because of his great potential in spreading the infection. Herein, evidence is presented that a primary infection of golden hamsters with orally administered *T. solium* cysticerci improved the host's resistance against a secondary infection. Likewise, previous vaccination increased the hamster's resistance. Similar high levels of protection (>78%) were induced by systemic or oral vaccination with the S3Pvac anticysticercosis synthetic peptide vaccine or the highly immunogenic recombinant chimera based on the protective peptide KETc1 bound to Brucella spp lumazine synthase (BLS-KETc1). The contribution to protection from the KETc1 and BLS epitopes in a chimeric vaccine is under study. Preventive vaccination of definitive hosts of *T. solium* against the tapeworm, the most relevant step in the taeniasis/cysticercosis transmission, may greatly impact the dynamics of endemic disease and has not been studied or tried before.

3. INTRODUCCIÓN

La cisticercosis causada por la forma larvaria de *Taenia solium* es una enfermedad parasitaria que afecta al hombre y al cerdo, produciendo serios problemas de salud y socioeconómicos en países en desarrollo, siendo las zonas de alta prevalencia Asia, África y Latinoamérica (Gemmell et al., 1982; Sotelo et al., 1996; Larralde et al., 1992). Aunque la cisticercosis se encuentra parcialmente erradicada en países desarrollados, y afecta principalmente a países en desarrollo, se ha observado un resurgimiento en países desarrollados como consecuencia de las migraciones provenientes de zonas endémicas (Richards and Schantz, 1991; Loo and Braude, 1982; McCormick, 1982, 1985; Grisolia and Wiederholt, 1982). En el hombre, la presencia de la larva en el sistema nervioso central (neurocisticercosis) representa un problema de salud frecuente en México (Del Brutto and Sotelo, 1988), con importantes implicaciones sociales y económicas (García and Del Brutto., 2000).

La transmisión de esta parasitosis se encuentra claramente relacionada con las condiciones sanitarias que prevalecen en las áreas endémicas (falta de higiene, fecalismo al aire libre) y con la crianza rústica de los cerdos que se practica extensamente en los sectores pobres de la población y el consumo de la carne sin inspección sanitaria adecuada (Gemmell et al., 1982). Este control ineficiente del consumo de cerdos criados rústicamente se da por el consumo directo, la falta de rastros suficientes, la corrupción que frecuentemente se presenta en los mismos, la evasión premeditada de rastros aunado a la baja efectividad de las formas de identificación de canales infectados (Aluja, 1982). La porcicultura se ve afectada de manera importante, en especial la que se practica de manera rústica, ya que la crianza de cerdos que deambulan libremente, facilita que los animales tengan una mayor oportunidad de consumir heces de humano contaminadas, mientras que en la porcicultura altamente tecnificada la posibilidad de infección es muy baja. La crianza rústica ocasiona no sólo importantes pérdidas económicas por decomiso de carne infectada (Aluja et al., 1986), cuando ocasionalmente llega a inspección sanitaria, sino también permite la persistencia del ciclo de esta parasitosis (Aluja et al., 1982). Dada la importancia de la cisticercosis en la salud humana y en la porcicultura en México, ha sido objeto de numerosos estudios relacionados con aspectos clínicos (Schantz et al., 1994; Morales et al., 2000; Del Brutto et al., 2001), y patológicos (Restrepo et al., 1998;

Herrera et al., 1999; 2000), así como con su diagnóstico (Schantz et al., 1994; Ito et al., 1998; Sciutto et al., 1998; Hernández et al., 2000; Proaño-Narvaez et al., 2002; Kojic et al., 2003), tratamiento (Del Brutto et al., 2000; García et al., 2002), y prevención Malagón-Valdez, 1999; White et al., 2000).

La factibilidad del control de la transmisión mediante el mejoramiento de la calidad de vida a nivel social, económico y educativo en países en desarrollo no se contempla como una alternativa factible a corto plazo (Keilbach et al., 1989).

El cerdo, hospedero intermediario de este parásito, desempeña un papel fundamental en la transmisión de la teniasis-cisticercosis por *T. solium*, es por eso que numerosos estudios se han enfocado a controlar la enfermedad en el cerdo, por lo que la disminución de la incidencia de la cisticercosis en el cerdo a través de vacunación se ha considerado como una alternativa para prevenir esta enfermedad.

Otro componente esencial en el ciclo del parásito, por su capacidad de diseminación del mismo, es el teniásico portador de la fase adulta. Cada individuo teniásico es capaz de contaminar el ambiente y su entorno con miles de huevos que elimina en las heces diariamente. El control de la teniasis se ha abordado a través del uso masivo o dirigido hacia drogas tenicidas como el uso de niclosamida (Allan et al., 1997; Jeri et al., 2004), praziquantel (Cruz et al., 1989; Diaz-Camacho et al., 1991), y con mucho menos resultados obtenidos se ha utilizado el mebendazol (Chavarria et al., 1977).

En esta tesis contemplamos la posibilidad de la prevención de la teniasis por vacunación, y demostramos su factibilidad en condiciones experimentales.

3.1 Ciclo de vida de *Taenia solium*

El ciclo de vida de la *T. solium* incluye una fase larvaria (cisticerco), que afecta tanto al hombre (huésped definitivo) como al cerdo (huésped intermediario) y se adquiere por la ingesta de huevos presentes en alimentos contaminados con heces humanas (Fig. 1). Cuando el hombre consume carne de cerdo mal cocida e infectada, los cisticercos pueden desarrollarse en el intestino al estado adulto del parásito, la tenia, la cual puede producir cientos de miles de huevos capaces de transformarse en cisticercos cuando son ingeridos por el hombre o el cerdo, completándose así el ciclo de vida del parásito.

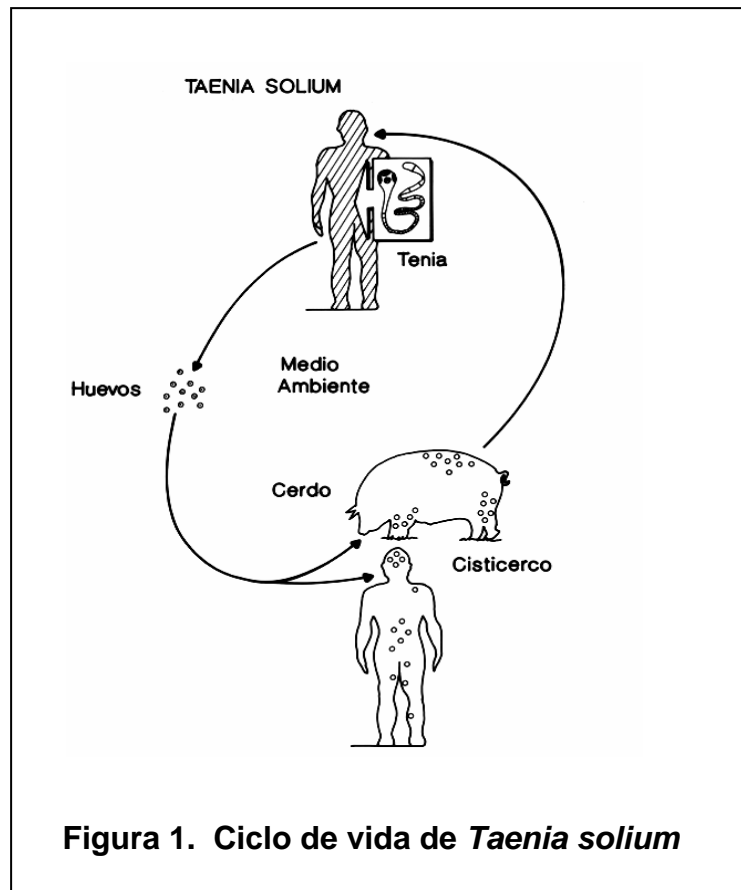


Figura 1. Ciclo de vida de *Taenia solium*

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

- **Huevos**

Los huevos son excretados en las heces de los portadores del parásito adulto, y es la única fase del parásito que se puede encontrar en el medio ambiente, protegidos por una serie de envolturas protectoras. En el huevo maduro, la envoltura más externa se le denomina vitelo o cápsula externa, la cual se forma a partir de la envoltura externa, de la cual solo se observan remanentes o desaparece por completo en el huevo maduro. La cápsula externa rodea una estructura llamada embrióforo. Este consiste en una serie de tabiques proteicos (bloques embriofóricos), unidos mediante una proteína cementante. El embrióforo se forma en el interior de la envoltura interna, la cual desaparece en el huevo maduro. La capa más interna (membrana oncosferral), envuelve directamente al embrión hexacanto maduro (el cual cuenta con tres pares de ganchos), llamado también oncosfera.

Cuando el huevo es ingerido por el hombre o su huésped intermediario (el cerdo), el vitelo o cápsula es removido mecánicamente, estimulando la actividad de los ganchos de la oncosfera. Posteriormente, las enzimas proteolíticas del huésped actúan directamente sobre el embrióforo, provocando la liberación de los bloques embriofóricos. La oncosfera liberada penetra la pared intestinal, alcanza vasos sanguíneos o linfáticos, por cuya corriente es transportada a cualquier tejido (músculo, tejido intradérmico, sistema nervioso, ojos), en donde se desarrolla a cisticerco (Flisser, 1988; Coil, W. H., 1991).

- **Cisticerco**

El estadio larvario (metacéstodo o cisticerco) se encuentra constituido por una vesícula o bolsa que contiene fluido vesicular, en la cual se encuentra el vestíbulo, que contiene un protoescolex invaginado (algunas veces indistinguibles del escolex adulto), al final del canal en espiral. La pared de la bolsa consta de tegumento, subtegumento, y parénquima. La superficie de la pared vesicular representa la superficie más expuesta al huésped, y a través de la cual se relaciona con él, metabólicamente e inmunológicamente. Cabe señalar que el cisticerco carece de sistema digestivo (tiene un sistema de nutrición por difusión), posee una innervación extensa (placas neuromusculares), y en el parénquima pueden observarse corpúsculos calcáreos. El sistema excretor se encuentra compuesto por ductos con túbulos, que terminan en células en flama (Coil, W. H., 1991).

- **La Tenia**

Cuando el hombre ingiere al cisticerco en carne de cerdo cruda o mal cocida, las enzimas y sales biliares del aparato digestivo inducen la activación del parásito, el cual evagina, y se ancla en la pared del intestino delgado para desarrollarse en un gusano adulto.

La *T. solium* es un helminto hermafrodita, de cuerpo aplanado y alargado. Se fija al intestino por el escólex (Coil, W. H., 1991), que presenta ganglios nerviosos, una doble corona de ganchos (rostelo), y cuatro ventosas. Posteriormente al cuello continúa el estróbilo, que se conforma por cientos de segmentos (proglótidos), llegando a medir hasta 9 metros. Cada proglótido maduro es un órgano de reproducción independiente, en donde se lleva a cabo la fecundación y la producción de miles de huevos. Los proglótidos se

producen inmediatamente detrás del cuello (área de estrobilación), por lo que los proglótidos más viejos y maduros se desprenden continuamente del extremo posterior de la tenia, siendo eliminados en las heces.

La *T. solium* posee una cubierta externa llamada tegumento, que tiene funciones de absorción, digestión y protección. El tegumento envuelve a todo el gusano, actuando como interfase entre el gusano, y el contenido del intestino delgado. El tegumento esta conformado por un epitelio, donde la parte más externa es anucleada, denominándosele citoplasma distal. Por debajo se encuentra la lámina basal, que contiene proteínas similares al colágeno y fibras estriadas. Posteriormente se encuentran capas musculares subtegumentarias, y justo por debajo se encuentra el citoplasma proximal nucleado. El citoplasma proximal se conecta con el citoplasma distal por finas protuberancias celulares (extensiones protoplásmicas), que cruzan las finas capas musculares, y la lámina basal (Coil, W. H., 1991).

3.2 La enfermedad

- **Cisticercosis humana**

La alta frecuencia de infecciones humanas ocasionadas por el metacéstodo de *T. solium* puede resultar como consecuencia de la ingestión de huevos de *T. solium* a través de:

- a. Ingestión de los huevos en alimentos o agua contaminados (heteroinfección).
- b. Autocontaminación por personas que tienen un gusano adulto en el intestino.
- c. Posiblemente por autoinfección interna producida por un peristaltismo inverso, que hace retroceder los huevos al duodeno o el estómago para que eclosionen, y tras la migración al interior de tejidos somáticos o viscerales, produzcan cisticercosis (Gemmell et al., 1985).

El estadio larvario de este gusano se ha encontrado prácticamente en todos los órganos y tejidos del cuerpo humano. Así, se le ha encontrado en tejidos dérmicos y musculares, en ojo y también en el cerebro (Willms and Merchant., 1980; McCormick et al., 1982; Rabiela-Cervantes et al., 1982). Los síntomas que producen varían de acuerdo al número de parásitos y del tejido invadido. Las alteraciones histopatológicas son muy variables en tipo, severidad, y localización topográfica. Los signos y síntomas causados

por la neurocisticercosis son variables y a veces difícil en su diagnóstico, excepto cuando la cisticercosis es cutánea, intradérmica u ocular, en donde el parásito es fácilmente identificable. En zonas de alta prevalencia, en un adulto que presente epilepsia, se debe descartar la probabilidad de que sea causada por neurocisticercosis. 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 (Dixon and Lipscomb., 1961; Aluja et al., 1986).

3.3 Modelo experimental murino por *Taenia crassiceps* para la evaluación de experimental de inmunógenos y formas de vacunación

La elevada frecuencia con la que se presenta la parasitosis por *T. solium*, así como sus consecuencias en la salud y su impacto económico justifican los intentos para prevenirla. Debido a las limitaciones para controlar la transmisión mejorando el nivel de vida de la población en los países subdesarrollados, y tomando en cuenta el papel esencial del cerdo como huésped intermediario en el ciclo de vida de *T. solium*, el desarrollo de una vacuna efectiva en el cerdo ofrece la posibilidad realista para el control de esta parasitosis, interrumpiendo la transmisión al disminuir la prevalencia de la cisticercosis porcina. Así, diferentes grupos de investigación han comenzado a identificar antígenos de interés para el desarrollo de una vacuna contra la cisticercosis porcina (Molinari et al., 1983, 1993, 1997; Sciutto et al., 1990, 1995b; Nascimento et al., 1995; Manoutcharian, et al., 1995, 1996; Evans et al., 1997).

La experimentación con cerdos involucra dificultades económicas y experimentales. Un análisis sistemático de los factores biológicos que participan en la susceptibilidad del huésped al parásito requiere de la instalación de un modelo experimental de cisticercosis por *T. solium*, que no ha sido factible desarrollar. Con el fin de disponer de un modelo experimental de cisticercosis, se comenzó a estudiar un modelo experimental de cisticercosis murina causado por *Taenia crassiceps*, en la cepa susceptible de ratones BALB/cAnN (Larralde et al., 1990; Sciutto et al., 1995a), en donde la cantidad de parásitos recuperados puede utilizarse como un parámetro de susceptibilidad a ser modificado por la vacunación.

Según las observaciones realizadas, la cisticercosis por *T. crassiceps* (Freeman, 1962; Dorais and Esch, 1969), presenta características atractivas para ser considerada como un buen modelo experimental, entre las que se puede mencionar:

- a. Su capacidad de infectar ratones, especie muy estudiada tanto genética como fisiológicamente, lo que facilita el estudio de los mecanismos de protección asociados a esta parasitosis, y la posibilidad de extrapolarlos al hombre y al cerdo.
- b. Se reproduce por gemación en la cavidad peritoneal de los ratones, propiedad que le permite mantenerse fácilmente en ratones de laboratorio por pases intraperitoneales sucesivos (Freeman, 1962; Dorais and Esch, 1969), infectando ratones con solo algunos cisticercos y recuperando en pocos meses de infección, una gran cantidad de cisticercos, además de ser un compartimento muy accesible de estudiar y de ser modificado, dando la oportunidad de evaluar los procesos de vacunación de forma sistemática y controlada. La cepa utilizada en este modelo es la cepa ORF, la cual no presenta escólex.
- c. Existe una extensa similitud antigénica entre *T. solium* y *T. crassiceps* (Larralde et al., 1989), por lo que estos antígenos compartidos pueden ser importantes tanto para el diagnóstico como para la vacunación.
- d. El ciclo de vida de *T. solium* y *T. crassiceps* es muy semejante, aunque *T. crassiceps* presenta la característica adicional y diferencial de reproducirse asexualmente por gemación.
- e. Prácticamente no ofrece riesgos potenciales de infección para el humano.

Estas características han alentado la utilización de la cisticercosis murina como modelo experimental en el cual identificar antígenos de potencial interés en vacunación contra cisticercosis por *T. solium*.

T. crassiceps (Zeder, 1800; Rudolphi, 1810) es un gusano platelminto de la clase céstoda, que se encuentra comúnmente en el intestino de los zorros rojos de Europa y Norteamérica. El estado larvario de *T. crassiceps* es el *Cysticercus longicollis*, sus huéspedes naturales son roedores pequeños de Europa y Norteamérica, los cuales adquieren la infección al ingerir los huevos presentes en las heces de cánidos infectados. Dentro del roedor, los huevos se transforman en cisticercos que pueden además

reproducirse por gemación polar múltiple. La forma adulta de *T. crassiceps* se desarrolla cuando un roedor con cisticercos es ingerido por un predador cánido. La tenia alcanza la edad madura después de 6 semanas de haber ingresado los cisticercos en el intestino de zorros y perros (Freeman, 1962), completándose de esta forma el ciclo de vida de *T. crassiceps*. (Fig. 2).

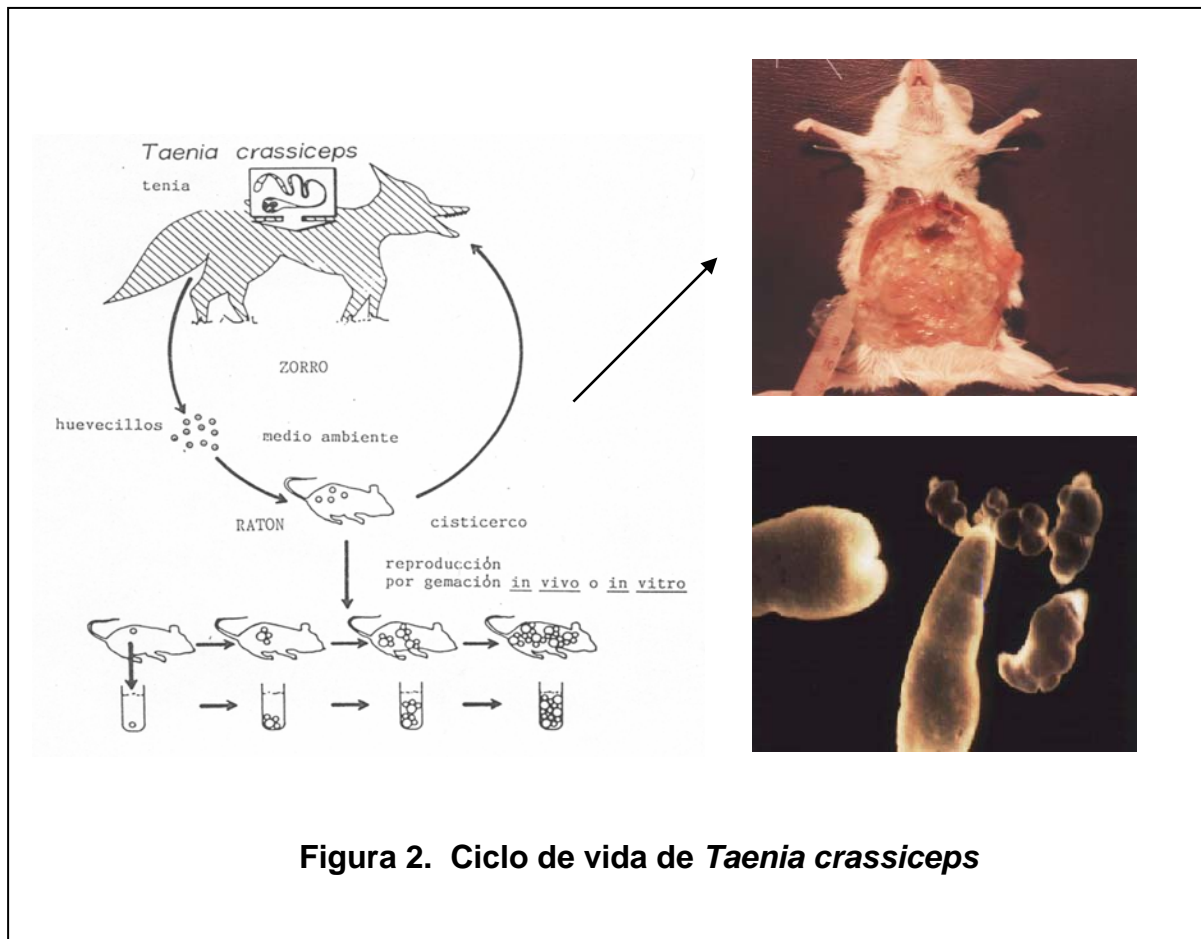
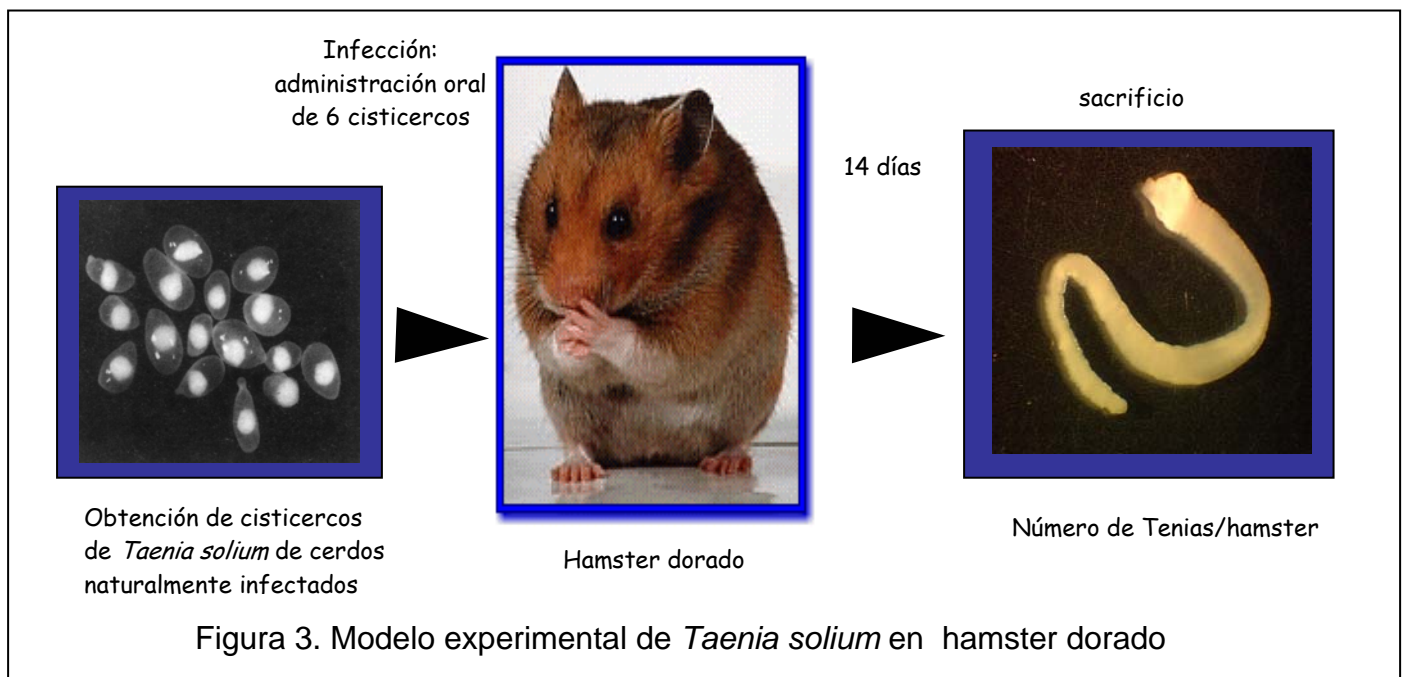


Figura 2. Ciclo de vida de *Taenia crassiceps*

3.4 Modelo experimental en hamster dorado por *Taenia solium* y su potencial utilidad para la evaluación de las posibilidades de vacunación en contra de la teniasis intestinal

El modelo experimental de taeniasis en hamster dorado fue originalmente reportado por Gnezdilov (en Gnezdilov V. G., 1957) (Fig. 3). Desde entonces se ha venido utilizando para el estudio de diferentes aspectos relacionados con la evolución del cisticerco a tenia, aspectos de la respuesta inflamatoria relacionados con la instalación del parásito en el intestino (Maravilla et al., 1998; Merchant et al., 1998; Avila et al., 2002, 2003; Willms et al., 2001, 2003).



La fase adulta del parásito puede instalarse sin la inmunosupresión del hospedero, aunque en estas condiciones el parásito se elimina más tempranamente. En el hamster el cisticerco puede transformarse a tenia, anclarse al intestino, desarrollarse y crecer algunos centímetros. Sin embargo, en el hospedero no inmunosuprimido, *Taenia solium* se puede desprender sin maduración previa al cabo de algunas semanas. Esta es una limitante de este modelo experimental que señala la importancia de desarrollar otros modelos alternativos que permitan simular mas cercanamente los fenómenos que ocurren en la teniasis intestinal en el hombre, en donde el parásito puede desarrollarse, madurar y producir miles de huevos permaneciendo hasta años en su hospedero.

En este trabajo el modelo experimental de teniasis se utilizó para evaluar las posibilidades de prevenir la teniasis por vacunación de forma oral o sistémica, empleando los antígenos vacunales protectores en contra de la cisticercosis, compartidos por la fase adulta del parásito, considerando su amplia distribución en la región tegumentaria de la tenia.

4. ANTECEDENTES

Entre las diferentes alternativas más exploradas que se han contemplado para la prevención de la teniasis/cisticercosis figuran:

a. Campañas de educación y mejoramiento sanitario, considerando que la cisticercosis es frecuente en países en desarrollo, donde prevalecen condiciones inadecuadas de vivienda e higiene que favorecen la transmisión (Sarti et al., 1997; Flisser and Lightowlers., 2001; Flisser et al., 2006; Pawlowski et al., 2005).

b. Tratamiento masivo contra la teniasis (Chavarria et al., 1977; Cruz et al., 1989; Diaz-Camacho et al., 1991; Allan et al., 1997; Flisser et al., 2003; Jeri et al., 2004; Pawlowski et al., 2006).

c. Tratamiento cisticida de los cerdos antes de su consumo (Flisser et al., 1989; Gonzalez et al., 1998; Torres et al., 1992).

d. El desarrollo de vacunas contra la cisticercosis porcina (Molinari et al., 1983, 1993, 1997; Sciutto et al., 1990, 1995b; Nascimento et al., 1995). Esta estrategia contempla al cerdo como eslabón a través del cual interrumpir el ciclo de vida del parásito. Se han utilizado exitosamente como vacunas desde extractos proteicos (Molinari et al., 1983; Sciutto et al., 1990, 1995a), y proteínas nativas purificadas (Valdez et al., 1994; Nascimento et al., 1995; Plancarte et al., 1999), antígenos recombinantes (Manoutcharian et al., 1995; Plancarte et al., 1999; Flisser et al., 2004), péptidos sintéticos (Huerta et al., 2001) así como vacunación con DNA en modelos experimentales (Rosas et al., 1998; Cruz-Revilla et al., 2000) y mas recientemente en contra de *Taenia solium* (Guo et al., 2004; Wang et al., 2003).

Respecto al desarrollo de una vacuna eficiente para la protección, utilizando el modelo experimental murino de cisticercosis, se han identificado antígenos de potencial interés contra la cisticercosis porcina (Larralde et al., 1989). En los últimos años se ha encontrado que los antígenos del cisticerco de *T. crassiceps* son capaces de proteger en contra de la infección experimental murina (Sciutto et al., 1990), así como a los cerdos desafiados con huevos de *T. solium* (Sciutto et al., 1995b). Se comenzó con la evaluación de la capacidad de protección de antígenos totales del cisticerco de *T. crassiceps*, en contra de la cisticercosis murina y porcina. Se encontró que se podía inducir protección en contra de ambas parasitosis en la dosis apropiada (90% de protección en contra de la

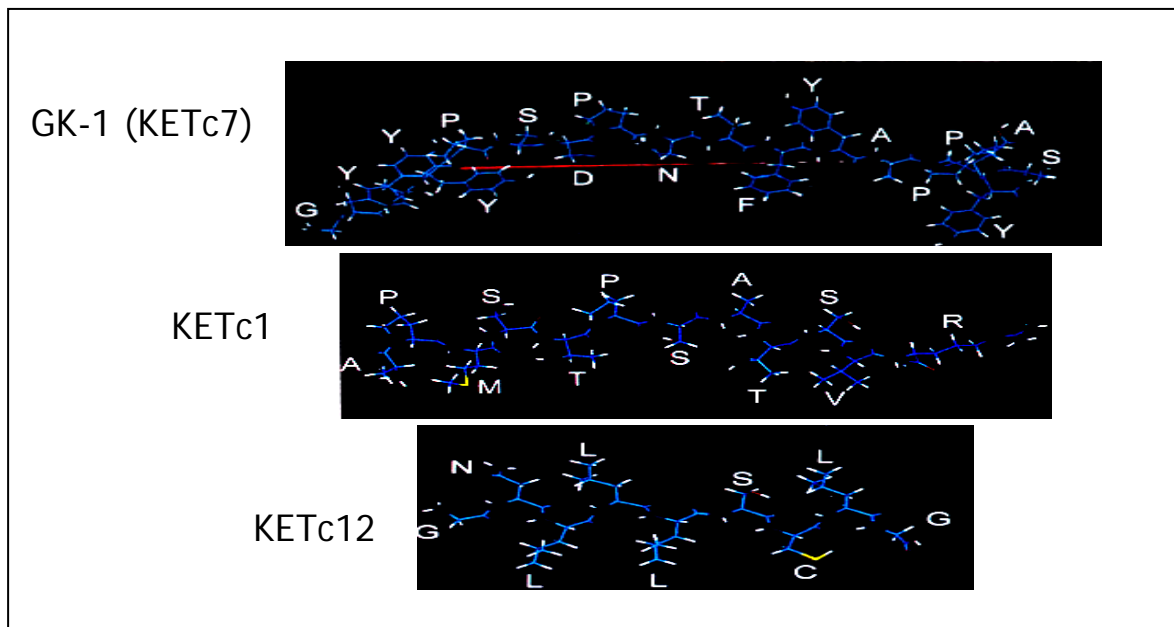
cisticercosis murina y 50% en contra de la cisticercosis porcina) (Valdez et al., 1994; Manoutcharian et al., 1995), pues esta dependía de la dosis empleada (Sciutto et al., 1995b). En dosis altas se podía inducir facilitación a la parasitosis. Este resultado sugirió la presencia de proteínas que pudieran inducir facilitación y no protección en el extracto total. Para poder identificar a los antígenos protectores presentes en este extracto antigénico total, éste fue separado electroforéticamente, obteniéndose 12 fracciones antigénicas (8 kDa-220 kDa), las cuales fueron utilizadas para evaluar su capacidad protectora en ratones. De estas 12 fracciones antigénicas, se seleccionaron 3 fracciones (56, 66 y 74 kDa), que indujeron protección en contra de la cisticercosis murina y porcina (Valdez et al., 1994; Manoutcharian et al., 1995). También se observó que estos antígenos fueran capaces de ser reconocidos por sueros de cerdos infectados con cisticercos de *T. solium* (Valdez et al., 1994). Con base en estos resultados y con el fin de contar con cantidades adecuadas de estas fracciones para vacunación, se construyó una biblioteca de cDNA en el vector Uni-ZapXR, a partir del RNAm del cisticerco de *T. crassiceps*. Por procesos de inmunodetección con sueros hiperinmunes de conejo, que fueron inmunizados con las fracciones antigénicas protectoras previamente mencionadas, y con sueros tanto de ratones como de cerdos infectados, se identificaron y seleccionaron cinco clonas que codificaban para proteínas recombinantes de *T. crassiceps* (KETc1, KETc4, KETc7, KETc11, y KETc12), las cuales fueron evaluadas tanto contra la cisticercosis murina como porcina, resultando KETc1, KETc7 y KETc12 protectores (Manoutcharian et al., 1995; 1996; Toledo et al., 2001). La vacunación en contra de la cisticercosis porcina requiere proteger al cerdo durante su corta expectativa de vida (aproximadamente de 1 año), por lo que la respuesta inmune protectora inducida por vacunación solo tendría que proteger al cerdo durante este período de tiempo.

Además se ha avanzado en la identificación de epítopes protectores en el polipéptido KETc7 y su inmunogenicidad. Con el propósito de identificar las regiones antigénicas protectoras en este antígeno recombinante, se comenzó analizando la secuencia de estos antígenos. En base a su secuencia de aminoácidos se realizó una predicción teórica de las regiones de mayor antigenicidad (Gevorkian et al., 1996). Por medio de esta predicción se seleccionaron tres regiones de alta antigenicidad que se denominaron GK-1, GK-2 y GK-3 y se sintetizaron químicamente, encontrándose que solo

el péptido GK-1 de 18 aminoácidos fue capaz de conferir altos niveles de protección, inducir una respuesta inmune celular preferencialmente de tipo CD8⁺ y una respuesta de anticuerpos (Toledo et al., 1999).

4.1 Vacuna sintética S3Pvac

Se han utilizando 3 epítopes protectores compartidos por *T. solium* y *T. crassiceps* (GK-1, KETc1, KETc12) para el diseño de una vacuna sintética denominada S3Pvac (Rosas et al., 1999, Cruz et al., 2000; Gevorkian et al., 1996; Toledo et al., 1999; 2001), con la caracterización de las propiedades inmunogénicas de los péptidos que la constituyen (Díaz et al., 2003) y su evaluación en cerdos expuestos al desafío natural (Huerta et al., 2001; Sciutto et al., 2003).



4.2 Principales características inmunogénicas y propiedades del péptido vacunal KETc1

KETc1 es un antígeno recombinante de 12 aminoácidos (Manoutcharian et al., 1996) originalmente identificado en una librería de cDNA de *T. crassiceps*. El péptido KETc-1 (Ala Pro Met Ser Thr Pro Ser Ala Thr Ser Val Arg (Gly)), se produjo por síntesis en fase sólida con N-terbutiloxicarbonil derivados de L-aminoácido en resina asociados a los

aminoácidos que se señalan en paréntesis (Sigma Chemical Co., St Louis, Mo). El péptido fue utilizado al 95% de pureza según análisis de cromatografía líquida de alta presión con columnas de fase reversa C18. La secuencia de aminoácidos se confirmó en un secuenciador de proteínas de fase líquida (Applied Biosystems). El péptido KETc1 sintético se mantuvo refrigerado (2-4° C) hasta su uso.

Expresado en forma sintética o recombinante induce altos niveles de protección contra la cisticercosis murina (Toledo et al., 2001). La inmunización con KETc1 induce una respuesta de tipo Th1 con incrementos de INF- γ e IL-12 tanto en ratones como en cerdos. El epítipo KETc1 es compartido con *T. solium*, habiéndose detectado en las tres fases del parásito (huevo, cisticerco, y en la fase adulta del parásito o tenia).

4.3 Expresión de KETc1 en forma quimérica asociada a la Brucella spp lumazina sintetasa (BLS)

BLS es una proteína citoplasmática de 18 kDa, que en su forma monomérica esta presente en la fracción soluble de cepas lisas y rugosas del género Brucella. Entre las propiedades principales de la proteína BLS figuran su estructura pentamérica (90 kDa) en su forma nativa. La estructura tridimensional muestra que los últimos 8-10 residuos amino terminales no son esenciales para el plegamiento general del pentámero, debido a esta característica es posible crear proteínas quiméricas insertando péptidos en los residuos N-terminales sin dañar el plegamiento general, funcionando así como proteína acarreadora (Baldi et al., 2000; Laplagne et al., 2004) (Fig. 4).

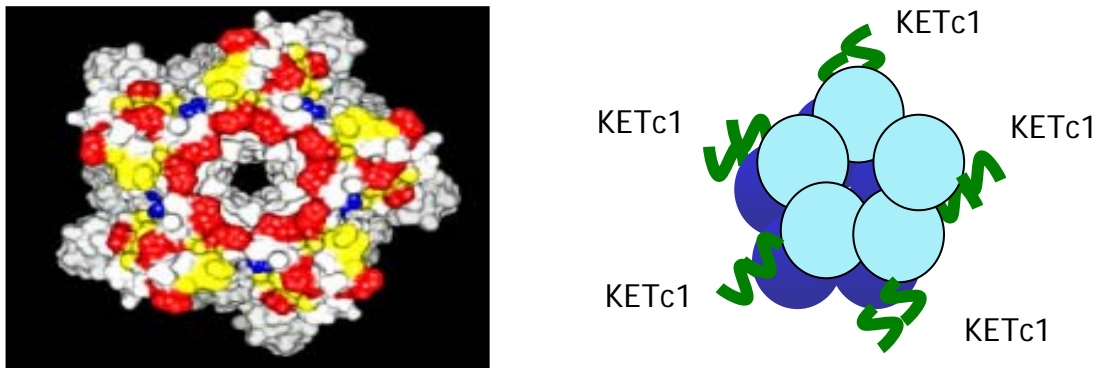


Figura 4. Arreglo cuaternario de lumazina sintetasa de *Brucella* spp. (BLS). Ilustra la superficie de BLS que forma la interfase pentámero-pentámero. Los residuos de histidina están en rojo y los de fenilalanina en amarillo. Los extremos 5 C-terminal de las hélices, 4 sobresalen en la periferia mientras que el círculo interno de histidina se mantiene en el centro, cercano al poro que pasa a través del centro del pentámero (Tomado de Fornasari et al., 2004; Zylberman et al., 2004).

- **Estabilidad estructural**

En estudios realizados por Zylberman et al., 2004, se evaluó la estabilidad termodinámica de BLS mediante la desnaturalización inducida por agentes químicos (urea y GdnHCl), pH y temperatura. Los resultados indicaron la gran estabilidad de la proteína a cambios en condiciones extremas en su estructura cuaternaria como en las terciaria y secundaria.

4.4 Inmunización con DNA

La vacuna de DNA o vacuna génica consiste en un plásmido, en donde generalmente se utiliza con un promotor viral fuerte, el gen de interés y una secuencia de señal de poliadenilación. El plásmido se transforma en bacterias, se amplifica, se purifica, se disuelve en solución salina, y se inyecta directamente en el huésped. El DNA plasmídico es captado por las células del huésped y la proteína de interés es expresada.

La observación de que el DNA purificado inyectado directamente en ratones podía expresarse, fue realizada por Atanasiu en 1961 (Manickan et al., 1997). No fue sino hasta

varios años después que estas observaciones se confirmaron. Felgner y Wolf (Wolff et al., 1990), trabajaban en el diseño de un sistema de expresión de genes para terapia génica, empacando el DNA plasmídico en liposomas catiónicos, con el propósito de fusionar estos liposomas con las membranas celulares. Lograron muy exitosamente que el plásmido se liberara dentro de las células *in vivo*, y curiosamente observaron que el DNA inoculado también se expresaba. A la luz de las observaciones disponibles hasta entonces, esto no tenía sentido. Felgner repitió muchas veces el experimento, obteniendo el mismo resultado, hasta que se convenció de que el DNA por si solo, podía entrar y expresarse en las células *in vivo*, observando la expresión de genes reporteros en músculos cuádriceps de ratones. Tang y colaboradores (Tang et al., 1992), probaron por primera vez que la administración por gene gun del DNA plasmídico en ratones era una manera efectiva de generar una respuesta de anticuerpos en contra de la hormona de crecimiento humano y la α -1 anti-tripsina humana. Posteriormente, Liu y colaboradores (Ulmer et al., 1993), demostraron inicialmente la efectiva protección de la inmunización con DNA en contra de una proteína viral, inyectado directamente en los músculos cuádriceps de los ratones, produciendo una respuesta tanto celular como humoral, utilizando una construcción que expresaba la nucleoproteína (NP) del virus de la influenza A, protegiendo en un 90% contra los retos letales del virus, en donde solo el 20% de los controles sobrevivía, lo que fue confirmado por Yankaukas y colaboradores (1993).

Estas observaciones generaron grandes expectativas y provocaron un incremento impresionante de trabajos en esta área de investigación, que reportaron tanto protección como la generación de respuesta inmune humoral, células Th y CTLs contra los correspondientes antígenos (Tang et al., 1992; Fynan et al., 1993a, 1993b; Robinson et al., 1993; Ulmer et al., 1993; Raz et al., 1994; Rhodes et al., 1994; Webster et al., 1994).

La vacunación génica se ha aplicado en diferentes modelos animales: ratón, ratas, hurones, conejos, gatos, pollos, cerdos, primates no humanos, humanos (Hengge et al., 1996; Yang et al., 1995; Donnelly et al., 1997; Swain et al., 1997), aplicada por diferentes métodos: inyección con jeringa hipodérmica de DNA en solución salina o por la técnica de liberación de DNA llamada gene gun, que se basa en el bombardeo de los tejidos con partículas de oro cubiertas con DNA o RNAm (Williams et al., 1991; Eisenbraun et al.,

1993; Fynan et al., 1993b; Feltquate et al., 1997; Torres et al., 1997). También se ha propuesto por el Dr. Rod Ruoff en 1998 (Department of Physics at Washington University; St Louis, MO) un tipo de partículas para gene gun llamadas Magnetic Designer Particles (DP), que pueden tener diferentes formas (aún para la aplicación de líquidos), o ser de diferentes materiales como cerámica, metal o vidrio. La compañía Vaxin Pharmaceuticals INC, dirigida por el Dr. De-Chu Tang en septiembre de 1998, propuso una tecnología de liberación del DNA en la piel a través de un parche adhesivo (libre de agujas), lo cual reduciría el costo de la vacunación en personas, además de ser aplicada sin dolor. Todos los métodos que se han aplicado tienen el fin de lograr la incorporación del DNA en las células, con la mayor eficiencia posible para expresar las respectivas proteínas vacunales, e inducir una respuesta inmune que confiera protección. También se han evaluado diferentes rutas de inmunización como el músculo (en cuádriceps o tibialis), en piel, de forma intravenosa o en mucosas (como de forma intranasal o intratraqueal), aunque el método por gene gun se ha aplicado generalmente en piel (Wolf et al., 1991; Davis et al., 1993; Fynan et al., 1993b; Robinson et al., 1995; Felquate et al., 1997).

La mayor eficiencia de la inmunización intradérmica frente a la inmunización intramuscular, inyectando directamente con jeringa hipodérmica, ha sido previamente reportada por Raz y colaboradores (1994), y en nuestro grupo de trabajo (Cruz-Revilla et al., 2000) encontramos que la inmunización con pTc-sp7 de forma intradérmica, indujo un nivel de protección del 80% frente a un 63% por la ruta intramuscular. Por otro lado, el método de administración del DNA, usando una aguja convencional e inyectando intradérmicamente, también ha sido investigado por Donnelly y colaboradores (1994), Hoffman y colaboradores (1995) y Ertl y colaboradores (1995). En el caso de la inmunización con el vector que expresa la nucleoproteína NP para el virus de la influenza, aunque se induce una respuesta de CTLs, la protección estudiada comparando ratones inmunizados intramuscularmente o intradérmicamente con DNA NP, sugiere que el método intradérmico es menos efectivo (Donnelly et al., 1994). Estas divergencias en los resultados reportados por los distintos autores, apoyan el hecho de que esto puede reflejar las diferentes capacidades de los plásmidos para expresar el antígeno.

Por otra parte, se observó el efecto inmunoestimulador de ciertos motivos de DNA, el cual es capaz de inducir monocitos, macrófagos, dendríticas, células B, T y "Natural

Killer“ (NK), para que produzcan citocinas de tipo Th1 como IL-12, IFN- γ e IFN- $\alpha\beta$, a lo que se le ha denominado efecto adyuvante no específico del DNA plasmídico (Feltquate et al., 1997; Roman et al., 1997). Se ha observado que incluidas en el promotor del citomegalovirus, así como en el gen de resistencia a ampicilina, existen pequeñas secuencias de DNA inmunoestimuladoras, que contienen dinucleótidos CpG, flanqueadas por dos purinas en el extremo 5' y dos pirimidinas en el extremo 3', con la fórmula general 5'-PurPurCGPyrPyr-3' (Krieg et al., 1995, 1998; Klinman et al., 1996, 1997a; Sato et al., 1996; Roman et al., 1997; Kline et al., 1998; Yi et al., 1998a). Estas contienen el hexámero CpG siguiente: 5'-GACGTC-3', 5'-AGCGCT-3' y 5'-AACGTT-3'. Los dinucleótidos CpG son poco representados en el DNA vertebrado y usualmente se encuentran metilados. En contraste, los dinucleótidos CpG se encuentran presentes en frecuencia esperada en el DNA bacteriano y se encuentran no metilados (Yi et al., 1996a). Se ha reportado que estos motivos inducen una amplia variedad de citocinas, y activan células B, monocitos, células dendríticas y células NK (Weiner et al., 1997). Yi y colaboradores (1996b), observaron una rápida activación en la transcripción de IL-6 inducida por los CpG a través de la vía dependiente de los intermediarios de oxígeno reactivo. También se ha observado que los motivos CpG en el DNA bacteriano activan leucocitos (inducción de la transcripción de genes leucocitarios y la secreción de citocinas), a través de la generación de especies de oxígeno reactivo dependientes del pH (Yi et al., 1998b). Estos estudios demuestran una vía novedosa de activación de leucocitos por motivos CpG. En diciembre de 1998, el grupo de “Dynavax Technologies Corporation” (fundada en 1996) publicó que una sola administración sistémica o por mucosas (intranasal o intratraqueal), de motivos CpGs, en el modelo murino de asma alérgica, inhibe los síntomas de la enfermedad de forma tan efectiva como la administración diaria y sistémica de corticosteroides por 7 días. Además, a diferencia de los corticosteroides, las inyecciones con motivos CpG fueron capaces de redireccionar la respuesta inmune, llevando de una fuerte respuesta Th2 asociada a la inflamación alérgica, a una respuesta Th1 no alérgica. Este estudio demuestra por primera vez *in vivo*, que las secuencias con motivos CpGs pueden ser utilizadas como una droga, tanto para inhibir como para modificar las enfermedades alérgicas (Broide et al., 1998), así como el asma. Además, la tecnología creada por Dynavax provee de la oportunidad de

intervenir directamente en los procesos de enfermedades autoinmunes e inflamatorias, ofreciendo alternativas únicas en el tratamiento, o en su uso para el aumento en la respuesta inmune hacia enfermedades infecciosas. Davis y colaboradores (1995 y 1996), utilizando oligodeoxinucleótidos sintéticos (ODN), con motivos CpGs, inmunizando junto con el antígeno de superficie recombinante del virus de la hepatitis B (HbsAg) en ratones, encontraron títulos de anticuerpos 5 veces más altos que la inmunización con HbsAg y el adyuvante estándar (hidróxido de aluminio). Pero cuando se inmunizaba con HbsAG y CpG ODN además del aluminio, los títulos fueron 35 veces más altos que los ratones inmunizados con el aluminio, indicando la fuerte interacción sinérgica entre CpG ODN y el aluminio. Los ODN sin motivos CpG, tienen poca o no aumentan la respuesta inmune. El aluminio induce una respuesta humoral Th2 (IgG1 principalmente), y no CTLs. En contraste, CpG ODN induce una fuerte respuesta TH1, predominantemente de anticuerpos IgG2a y CTLs, aún mezclado con el aluminio. Con ello se demuestra la capacidad prometedora de los CpG ODN para ser usados en vacunación, aunque también se ha observado que la capacidad de inmunoestimulación de los motivos CpG pueden ser bloqueados por ciertos motivos (Sanjay et al., 2000), por lo que es importante identificar que motivos estimulan y cuales suprimen.

Las vacunas de DNA se han probado para enfermedades parasitarias, en contra de protozoarios unicelulares como *Leishmania major* (Xu and Liew, 1994, 1995; Zimmermann et al., 1998; Handman 2001), *Plasmodium yoelii* (Sedegah et al., 1994; Gardner et al., 1996; Doolan et al., 1996), o *Plasmodium berghei* (Leitner et al., 1997); contra proteínas de parásitos metazoarios multicelulares como *Schistosoma mansoni* (Kayes et al., 1998) o *Schistosoma japonicum* (Yang et al., 1995), *Fasciola hepatica* (Smooker et al., 2001), y los céstodos *Taenia crassiceps* (Rosas et al., 1998; Cruz-Revilla et al., 2000), o *Taenia ovis* (Rothel et al., 1997). El grupo de Glaxo Wellcome en colaboración con PowderJect Pharmaceuticals plc (PowderJect vaccines Inc.), dirigido por el Dr. Paul R. Drayson, informó el 7 de diciembre de 1998, el logro de la primera vacuna de DNA profiláctica, capaz de inducir una respuesta inmune protectora en humanos contra la hepatitis B humana. Esto señala el primer logro de respuesta inmune protectora con vacunación génica, en pruebas clínicas humanas.

La vacunación génica crea nuevas esperanzas para el desarrollo de vacunas, pues aparentemente presenta ventajas no solo respecto a las vacunas vivas atenuadas, o formas muertas de todo el organismo, sino también frente a las vacunas con proteínas nativas o recombinantes. Las vacunas vivas atenuadas presentan el inconveniente de que se administra todo el patógeno completo, como las vacunas de la polio, viruela, sarampión, paperas o rubeóla; por lo que existe el riesgo intrínseco de que pueda ser patogénico otra vez. La ventaja de este tipo de vacunas es que puede inducir una respuesta de CTLs, Th y de anticuerpos, lo cual no ocurre con las vacunas que utilizan formas muertas de todo el organismo, pues generalmente no son capaces de inducir una respuesta de CTLs, aunque no llevan el riesgo de una vacuna viva. La administración de proteínas nativas o recombinantes, como las vacunas contra el tétano, difteria tóxide o derivados recombinantes, como el antígeno de superficie B contra la hepatitis, no inducen generalmente una respuesta citotóxica, y se requiere de estímulos sucesivos para inducir y mantener una respuesta inmune tanto celular como humoral. Los sistemas de expresión recombinante *in vitro*, producen proteínas que pueden tener modificaciones postraduccionales, o una conformación alternativa o diferente a la que tendría la proteína de tipo silvestre, producida por ejemplo en una infección viral. En cambio, las vacunas con DNA al expresar las proteínas dentro de las células del huésped, son capaces de inducir una respuesta tanto humoral y/o celular prolongada (Yankauckas et al., 1993; Xu and Liew, 1994; Nichols et al., 1995; Donnelly et al., 1997), sin el riesgo asociado a las vacunas vivas, pues se ha visto que los plásmidos pueden mantenerse en las células musculares por un largo tiempo (Wolff et al., 1992; Ulmer et al., 1993; Deck et al., 1997). Sin embargo, se requiere identificar en bibliotecas genómicas o directamente en los tejidos, por medio de técnicas como PCR, las secuencias que codifican para las proteínas protectoras (Barry et al., 1995; Lu et al., 1996).

Aunque aún no se compruebe si este tipo de vacunación pueda realmente reemplazar a las vacunas actuales, si pueden proveer de un recurso para manipular la respuesta inmune en situaciones donde la respuesta hacia determinado agente sea inapropiada o no efectiva.

- **Identificación de un promotor inducible**

En la tecnología de inmunización con DNA, un objetivo deseable es tener el control temporal de la expresión del gen en un estado de desarrollo en particular o en un órgano específico. Para ello se necesita contar con un promotor inducible que permita expresarlo en el momento del desarrollo del ratón que se considere adecuado, y en órganos específicos en donde se pueda evaluar su expresión y su efecto en el mismo. Para ello se consideró a la región promotor-reguladora del fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK), involucrada en la expresión tejido-específico y en la regulación de la enzima fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (GTP), la cual es clave en las vías de la glucogénesis y glicólisis. El plásmido p7218R, el cual contiene la secuencia PEPCK fue donado por el Dr R. W. Hanson. El promotor PEPCK permite que el transgen se exprese principalmente en el hígado del ratón, y que pueda ser regulado mediante alteraciones en los niveles de carbohidratos y proteínas en la dieta de los ratones y/o por ayuno (McGrane et al., 1988; Brooks et al., 1997).

La introducción del DNA en el hígado (Wilson et al., 1992), puede resultar en la transfección directa de células presentadoras de antígeno profesionales como las células de Kupffer, o de las células del parénquima o hepatocitos. El repertorio de linfocitos presentes en el hígado difiere dramáticamente de los que se encuentran en sangre periférica, pues los niveles de CD8+ y NK son muy altos. Los hepatocitos puede llevar a la activación de células T naive, en particular CD8+, lo que puede ser único en órganos sólidos, tal vez por la permeabilidad del hígado. Todas las células del hígado expresan MHC de clase I, por lo que pueden ser APC potenciales. La cantidad de interleucinas producidas es muy alta. Se pueden encontrar células T NK (o células Pit), células NK, células CD4+ y CD8+, Células B, células estelares o células de Ito, células endoteliales sinusoidales de hígado (LSEC), células de Kupffer, células dendríticas y hepatocitos, que son las células principales en el hígado, comprendiendo el 80% de las células hepáticas (Bertolino et al., 2002).

4.5 Principales características del polipéptido vacunal KETc7

La clona KETc7 forma parte de la fracción de 56 kDa, consta de 100 aminoácidos, y es similar a las extensinas debido a su alto contenido de prolinas y la presencia de dos secuencias repetidas características de éstas. Se ha encontrado que la proteína KETc7 se expresa tanto en cisticercos de *T. crassiceps* como de *T. solium*. En cisticercos de *T. crassiceps* se encuentran abundantemente distribuidos en el tegumento. Mientras tanto, en cisticercos de *T. solium* se encuentra ampliamente distribuido en el canal espiral. En el huevo se presentan intensamente en la oncosfera y en el embrióforo, y también en el citoplasma distal del tegumento del parásito adulto.

Al respecto de la inmunización con DNA, en 1989 Felgner y Wolff (Wolff et al., 1990), comprobaron accidentalmente que el DNA por si solo, podía entrar y expresarse en células *in vivo*, pues observaron la expresión de genes reporteros en músculos cuádriceps de ratones. Posteriormente observaron que se podía generar una respuesta inmune en contra de una proteína antigénica. Liu y colaboradores (Ulmer et al., 1993) fueron los primeros en demostrar la efectiva protección de la inmunización con DNA en un modelo animal. Estas observaciones provocaron una muy activa investigación dirigida a conocer las posibilidades de esta nueva forma de inmunización (Robinson, 1995; Fynan et al., 1993a, 1993b; Wang et al., 1993).

Así, la capacidad protectora de KETc7 fue confirmada por vacunación con DNA. Para la evaluación de KETc7 por inmunización con DNA, se utilizó como vector de expresión para células eucariontes el plásmido pcDNA3, clonando en este vector la secuencia que codifica para el antígeno recombinante KETc7, ya sea solo o con la secuencia para el péptido señal del receptor del Betaglicano (López-Casillas et al., 1991; Rosas et al., 1998). Se evaluaron diferentes protocolos de inmunización y se encontró que la inmunización con la construcción de KETc7 más el péptido señal (pTc-sp7) indujo protección en contra de la cisticercosis murina similar a la observada previamente con la proteína recombinante KETc7.

Estos resultados indican que esta forma de inmunización y la construcción de pTc-sp7 pueden ser consideradas en la inmunopprofilaxis de la cisticercosis, así como en la caracterización de la respuesta inmune inducida por este tipo de inmunización (Rosas et al., 1998; Cruz-Revilla et al., 2000). Una de las limitantes del uso de pTc-sp7, como

muchas vacunas génicas, es que es necesario grandes cantidades de DNA para ser administrado, por lo que para extender su uso la obtención de las cantidades necesarias con la calidad de DNA adecuada para vacunación implica un alto costo. Así, es hoy un área de gran interés el diseño de estrategias que permitan reducir la cantidad de DNA necesario para inducir una respuesta inmune eficiente. Entre ellas se ha explorado el uso de diferentes formas de inmunización como inyección intramuscular, intradérmica, intravenosa, intraperitoneal (Finan et al., 1993), oral (Roy et al., 1999), en combinación con el uso de adyuvantes (Kim et al., 2001) o promotores más eficientes que controlen el nivel de expresión o que tengan expresión genética restringida a un órgano o a un tipo celular (Morita et al., 2001) aunque aún este aspecto no se ha resuelto. Casi todos los reportes de inmunización con DNA utilizan promotores virales fuertes, especialmente el promotor de CMV, pero no se sabe si es el promotor óptimo para la inmunización con DNA, tomando en cuenta que el nivel de expresión puede ser crucial en la respuesta inmune.

5. OBJETIVOS

- **GENERALES**

1. Evaluar la inmunización génica utilizando la secuencia del antígeno protector contra la cisticercosis murina KETc7, regulando su expresión *in vivo* mediante un promotor tejido-específico e inducible mediante el control de la dieta y/o ayuno en la cisticercosis experimental murina por *Taenia crassiceps*.

2. Evaluar el efecto de la vacunación oral y sistémica en contra de la teniasis intestinal experimental en hamster dorado por *Taenia solium*.

- **PARTICULARES**

1.- Construcción del vector que contenga el promotor inducible PEPCK, la secuencia de interés KETc7 y la secuencia de poliadenilación del gen de la hormona de crecimiento humano.

2.- Evaluar el efecto de la expresión de la construcción *in vitro* e *in vivo*.

4.- Evaluar el efecto de la inducción de la expresión en la susceptibilidad a la cisticercosis murina por *Taenia crassiceps* y la respuesta inmune asociada.

5. Evaluación de la protección de la vacuna sintética S3Pvac (GK1, KETc1, KETc12) y el péptido KETc1 como proteína quimérica recombinante asociado a la proteína polimérica lumazina sintetasa (BLS-KETc1), en el modelo de hamster dorado y la respuesta inmune asociada.

6. HIPÓTESIS

1. El uso de un promotor inducible aumenta la capacidad protectora de una vacuna de DNA en contra de la cisticercosis murina.

2. Es posible proteger contra la teniasis intestinal a través de vacunación oral o sistémica con antígenos protectores en contra de la cisticercosis compartidos por la fase adulta del parásito.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Animales

- **Ratones**

Para la evaluación de la construcción y la capacidad protectora de KETc7, se utilizaron ratones BALB/cAnN hembras y machos, caracterizados como susceptibles a la cisticercosis experimental murina (Fragoso et al., 1998). Los ratones utilizados comprendieron de 4 a 6 semanas de edad, al comienzo de los experimentos.

- **Hámsteres**

Hámsteres dorados (*Mesocricetus auratus*) hembras y machos no inmunosuprimidos de 6 a 8 semanas de edad, fueron usados en todos los experimentos, mantenidos con agua y alimento *ad libitum*.

7.2 Parásitos

- **Los cisticercos de *Taenia crassiceps***

Los cisticercos de *Taenia crassiceps* de la cepa ORF (Zeder, 1800; Rudolphi, 1810), aislados por Freeman (1962) se han mantenido por pases intraperitoneales seriados en hembras BALB/cAnN por 10 años en el Bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Los cisticercos son obtenidos de la cavidad peritoneal de ratones, entre 2 a 3 meses después de la infección con 10 cisticercos (2-3 mm de diámetro), por ratón.

- **Los cisticercos de *Taenia solium***

Los cisticercos de *T. solium* se obtienen del músculo esquelético de diferentes canales de cerdos infectados naturalmente inmediatamente después del sacrificio. Los cisticercos obtenidos fueron lavados y guardados en PBS estéril a 4°C hasta el día siguiente para su administración oral a hámsteres. Por otro lado, de cada canal se obtuvieron cisticercos para la prueba de evaginación *in vitro*, en bilis de cerdo al 10 % en PBS estéril, a 37°C.

7.3 Construcción del plásmido pPc-sp7

Para la construcción pPc-sp7 se purificó el plásmido pTc-sp7 previamente descrito (Rosas et al., 1998), que contiene la secuencia de interés KETc7 que corresponde a un antígeno recombinante del cisticerco de *T. crassiceps* reportado previamente (Manoutcharian et al., 1996); el plásmido p7218R, que contiene la secuencia del promotor inducible de la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK, donado por el Dr. Hanson), y el plásmido pBSKShGH³end, que contiene la secuencia de poliadenilación y terminación de la transcripción de la hormona de crecimiento humano (el extremo 3' terminal, donado por el Dr López-Casillas). Todos los plásmidos fueron purificados mediante el Kit de Maxipreps de Qiagen (Qiagen Inc., Santa Clarita, California), según instrucciones del fabricante. Se realizaron digestiones con distintas enzimas de restricción para comprobar que los tamaños de los fragmentos eran los adecuados y que tenían los sitios de corte esperados. También se purificó el plásmido pGEM 11Zf(+) de 3.2 Kb (pGEM®*-11Zf(+), Promega Corporation, Madison WI), el cual se utilizó como vector de clonación, para llevar a cabo la construcción, y como control de vector vacío para los experimentos.

Para la construcción, se deletaron 4 pb correspondientes al sitio de reconocimiento para Hind III en el vector pGEM 11Zf(+). Entre los sitios de restricción *NotI* y *SacI* del vector, se clonaron los fragmentos de DNA que contienen los sitios de reconocimiento para los siguientes sitios de restricción: *NotI*, *SnaBI*, *XbaI*, *BglII*, *EcoRV*, *BamHI*, *HindIII*, *XhoI*, *SpeI*, *Sall*, *SmaI*, *SacI*, para crear así un nuevo polilinker que estuviera de acuerdo a las necesidades para llevar a cabo las demás subclonaciones. El fragmento que corresponde a la señal de poliadenilación y terminación de la transcripción de la hormona de crecimiento humano (hGHpA, 932 pb), se obtuvo digiriendo con *XbaI* y *Sall* el plásmido pBSKShGH³end, y subclonando el fragmento en los sitios *SpeI* y *Sall* del vector. El plásmido p7218R que contiene la secuencia del promotor de PEPCK, fue cortado con *XbaI* y *BglII*, y el fragmento obtenido (nucleótidos -490 a +73, 560 pb) fue ligado al vector en los sitios *XbaI* y *BglII*. El inserto KETc7 (565 pb) que contiene la secuencia del péptido señal del receptor del β -glicano, se obtuvo cortando el plásmido pTc-sp7 con *BamHI* y *XhoI*, y subclonando en el sitio *BamHI* y *XhoI* del vector (Fig. 5).

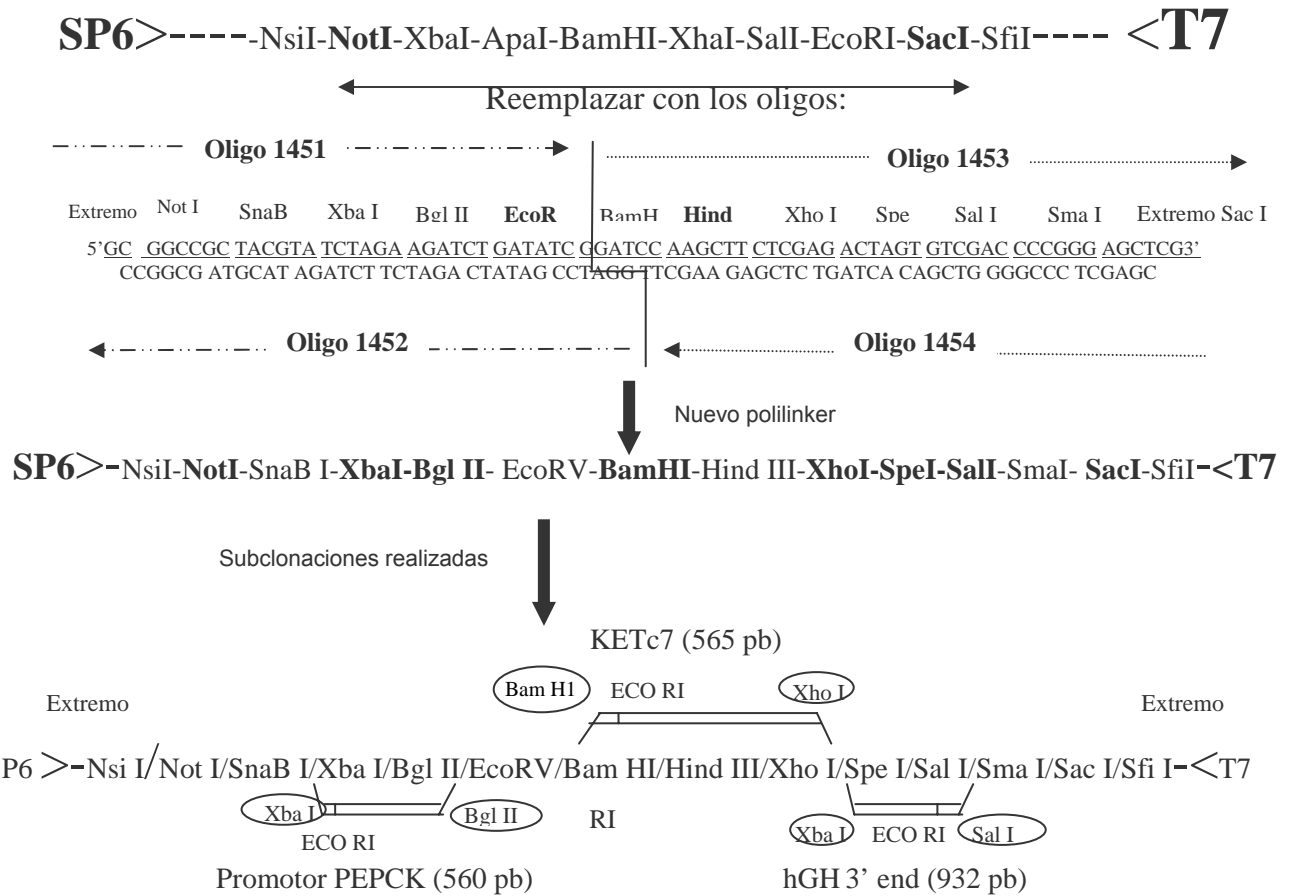


Figura 5. Diagrama que muestra la forma en que se llevó a cabo la construcción del plásmido pPc-sp7

El plásmido resultante se le denominó pPc-sp7, y fue verificado por secuenciación de DNA. Los plásmidos se crecieron en la cepa *Escherichia coli* DH5α usando técnicas estándar (Sambrook et al., 1989), y el DNA fue purificado mediante columnas de purificación de Qiagen (Qiagen Inc., Santa Clarita, California), según instrucciones del fabricante. El DNA fue cuantificado mediante espectrofotometría a 260 nm y la calidad fue determinada mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. El DNA se guardó a -20°C

hasta su uso. La expresión de KETc7 fue confirmada *in vivo* después de su inoculación en hígado.

7.4 Transfección de las células con los plásmidos e inmunohistoquímica

La construcción pPc-sp7 fue transfectada a diferentes líneas celulares hepáticas (FTO-2B, HepG2) y en la línea celular COS. También se transfectaron células con pPc-sp (el vector sin la secuencia para KETc7) y con pTc-sp7, la cual sabíamos que era una construcción funcional (Rosas et al., 1998). Se utilizó el método de transfección por fosfato de calcio, DEAE-Dextrán y lipofectamina, y un panel de anticuerpos disponibles en el laboratorio. Como primer anticuerpo se utilizaron: suero preinmune de ratón, suero de ratón parasitado con *T. crassiceps*, suero de ratón anti-GK-1 (Toledo et al., 1999) y suero de ratón anti-KETc7, obtenido mediante vacunación con DNA (Rosas et al., 1998; Cruz-Revilla et al., 2000). Para la verificación de la expresión se realizó inmunofluorescencia indirecta, ensayo por marcado metabólico y electroforesis en geles de poliacrilamida y Western Blot, tanto de los sobrenadantes como de las células en cultivo, según procedimientos antes reportados (Rosas et al., 1998) o según instrucciones del fabricante. También se evaluaron diferentes concentraciones de los sueros utilizados como primer anticuerpo (1:20, 1:50, 1:100, 1:200) y del segundo anticuerpo anti IgE de ratón marcado con FITC (1:200, 1:3000, 1:5000).

7.5 Dietas para la inducción/inhibición del promotor PEPCK

Los ratones tuvieron libre acceso al agua y a la comida, excepto cuando se colocaron en ayuno por 40 horas o recibieron las dos distintas dietas sintéticas de Harlan Teklad (Madison, Wisconsin), durante 8 días antes o después de la inmunización. Para observar la inhibición o inducción del promotor PEPCK, se utilizaron dietas altas en carbohidratos (HCD, decremento del 70 al 90% de la expresión) o alta en proteínas (HPD, aumento de 30 veces la expresión) (McGrane et al., 1988). La dietas alta en carbohidratos contiene 80% sucrosa, 12.2% caseína, 0.3% DL-methionina, 4% aceite de semilla de algodón, 3.5% vitaminas y minerales y colorante rojo. La dieta alta en proteína y libre de carbohidratos contiene 64% caseína, 0.5% DL-methionina, 22% alphacel no nutritivo, 8% aceite de semilla de algodón, 2% levadura de cerveza, 3.5 % vitaminas y minerales y colorante azul

(Patel et al., 1994). Cuando los ratones no se alimentaron con comida especial, tuvieron acceso a comida balanceada Purina (dieta control, CD) (Harlan Teklad).

7.6 Protocolos de inmunización

a. Inmunización con DNA y la regulación de la expresión antigénica

Los plásmidos (pTc-sp7, pTc-sp7 y pGEM 11Zf(+)), se inyectan directamente en el hígado de los ratones a una concentración de 200 μ g de DNA en 40 μ l de SSI (Williams et al., 1991, Wilson et al., 1992, Yoshida et al., 1997, Yoshida et al., 2000), mediante jeringa de insulina, una sola vez. Se obtuvo un grupo control con ratones no inmunizados para cada experimento. La inmunización se lleva a cabo anestesiando a los ratones con Imalgén 1000 (Ketamine, Merial) y Rompun^{M.R.} (Xylazina, Bayer) inyectado de forma intraperitoneal. Se realizó una pequeña incisión (0.5-1 cm) en el abdomen debajo de la línea del diafragma. Se expuso el hígado a través de la incisión y se inyectó el DNA directamente en el lóbulo pequeño derecho usando una aguja de 30Gx8 mm, para proceder inmediatamente a suturar usando un hilo de sutura quirúrgico absorbible.

Para la evaluación de la expresión de la construcción pPc-sp7, se inmunizaron ratones con una dosis de 200 μ g DNA en 40 μ l de SSI, para la posterior obtención del RNA individual del hígado y la realización de Northern Blot. Se utilizó como sonda a KETc7 (tamaño esperado de 1.7 Kb). Para la evaluación de la inhibición o inducción del promotor PEPCCK mediante el cambio en la dieta de los ratones y/o ayuno, los ratones fueron alimentados durante 8 días antes y después de la inmunización con dieta control (CD) o rica en carbohidratos (HCD), para el decremento de su expresión, o rica en proteína pero sin carbohidratos (HPD) para inducir su expresión. Ratones con 40 horas de ayuno se utilizaron para inducir la expresión. Por otra parte también se inmunizó un grupo con el plásmido pTc-sp7, el cual se mantuvo con dieta control (CD). Los ratones fueron sacrificados al término del ayuno o de las diferentes dietas (Moorman et al., 1990; Patel et al., 1994).

b. Teniasis experimental en hámsteres

- **Vacunación**

Los animales fueron inmunizados por vía oral y/o subcutánea (sc), y recibieron una o dos dosis de los inmunógenos. Las dosis de los inmunógenos utilizados fueron las siguientes: S3Pvac constituida por los 3 péptidos producidos en forma sintética denominados KETc1, KETc12 y GK-1 administrados con o sin saponina (15 µg/hamster de cada péptido con 50 µg de saponina en 200 µl SSI), el péptido sintético KETc1 (50 µg/200 µl SSI), KETc1 expresado como proteína quimérica (BLS-KETc1) (50 µg/200 µl SSI), o la proteína lumazina sintetasa (BLS) (50 µg/200 µl SSI). Los péptidos fueron preparados por Research Genetic Laboratory. Todos los péptidos utilizados tienen el 95% de pureza según análisis de cromatografía líquida de alta presión con columnas de fase reversa C18. La secuencia de aminoácidos se confirmó en un secuenciador de proteínas de fase líquida (Applied Biosystems) como se describe en Huerta et al., 2001. Los péptidos sintéticos se mantuvieron refrigerados (2-4° C) hasta su uso.

Un grupo se inmunizó oralmente con BLS-KETc1, 6 días más tarde se inmunizó con S3Pvac (sc), y se desafiaron 5 días después de la última inmunización con 6 cisticercos del mismo cerdo cisticercoso. Como controles, otro grupo fue inmunizado con SSI o fue tratado con niclosamida, para tener un grupo con el cual comparar un tratamiento convencional efectivo con los efectos producidos con la vacuna. En todos los casos, el tratamiento con niclosamida (chlorosalicylamide, Overoid) fue por vía oral con 250 mg/500 µl de SSI por hamster. Los hámsteres fueron sacrificados 16 días después de la infección.

Con el propósito de determinar la relevancia relativa del efecto de la vacuna sistémica y de la vacuna oral, se repitió este experimento utilizando los dos inmunógenos en conjunto y por separado. Se inmunizaron dos grupos con BLS-KETc1 (oral) y 6 días después se inmunizaron con S3Pvac (sc) y se desafiaron 4 o 14 días después de la última inmunización respectivamente. Otros grupos se inmunizaron con S3Pvac (sc) o con BLSKETc1 (oral) por separado y se desafiaron 10 días después. Los controles fueron inyectados con SSI o saponina sola en los tiempos respectivos. Se sacrificaron 16 días después de la infección. Todos los hámsteres se infectaron con cisticercos del mismo cerdo cisticercoso, excepto el grupo de infección de 14 días, en donde se utilizó un cerdo diferente naturalmente infectado.

7.7 Infección

a. Cisticercosis experimental murina

Para la evaluación de la capacidad protectora del antígeno KETc7 bajo el control del promotor PEPCK, grupos de 7 ratones fueron inmunizados con los plásmidos pPc-sp7, pTc-sp7, pGEM 11Zf(+) o con SSI y mantenidos en ayuno por 40 horas después de la inyección. Posteriormente los ratones fueron alimentados con HPD por 30 días, para después cambiar a CD y ser infectados cada uno con 10 cisticercos (de 2 mm de diámetro en PBS), como se ha reportado previamente (Fragoso et al., 1998). Treinta días después de la infección, tiempo estandarizado para cuantificar la carga parasitaria (Sciutto et al., 1990), los ratones fueron sacrificados y los cisticercos encontrados en la cavidad peritoneal de los ratones son contados individualmente.

b. Teniasis experimental en hámsteres dorados

Para este propósito se utilizó el modelo experimental de hamster dorado originalmente reportado por Gnezdilov (Gnezdilov V. G., 1957). Los experimentos reportados en este trabajo se realizaron desafiando por vía oral hámsteres inmunocompetentes con 6 cisticercos de *Taenia solium* por hamster, obtenidos de cerdos infectados naturalmente, y sacrificándolos 16 días después del desafío. Los hámsteres fueron sacrificados en todos los casos mediante cámara de CO₂, y el número de tenias en el intestino de cada uno de los hámsteres fue contado. Para contar el número de tenias se examinó el intestino delgado de forma longitudinal abriéndolo con bisturí por la mitad, confirmando la presencia de parásitos en microscopio estereoscópico. También se midió el tamaño (largo) encontrado en cada una de las tenias, además de la recolección de suero y heces de cada hamster.

- **Determinación de las condiciones de infección**

Para determinar las mejores condiciones de infección para la realización de la evaluación de los efectos de los diferentes inmunógenos empleados, hámsteres hembras (n=15) y machos (n=15) no tratados, fueron desafiados con 6 cisticercos por hamster,

obtenidos de un mismo cerdo naturalmente infectado. Cinco hembras y 5 machos se sacrificaron a las 2, 3 o 4 semanas después del desafío.

- **Primo-infección**

Para observar si una primera infección pudiera proteger en contra de una segunda infección, un grupo de 7 hámsteres fueron infectados y sacrificados 16 días después de la infección, como control de la primera infección. Otro grupo de 7 hámsteres fue tratado 10 días antes con niclosamida y junto con otros 7 hámsteres no tratados, fueron infectados con cisticercos provenientes del mismo cerdo infectado. El grupo con tratamiento de niclosamida fue sacrificado 16 días después de la infección. El grupo solamente infectado fue tratado 10 días después con niclosamida, re-infectado con un cerdo cisticercoso distinto 10 días después, y sacrificados 16 días posteriores.

7.8 Extracción de RNA y Northern Blot

Con el fin de contar con otra metodología para la confirmación de la expresión de la construcción pPc-sp7, se procedió a obtener el RNA de los hígados obtenidos y congelados a -70 °C de los animales inmunizados para la realización de Northern Blot, usando como sonda el DNA del fragmento de KETc7. Se procedió a la extracción con TRizol[®] Reagent (Invitrogen, San Diego, California) según las instrucciones del fabricante. Todo el material para la extracción de RNA y RT-PCR es libre de pirógenos, RNAsas y DNAsas y el material de laboratorio tratado con agua-DEPC (Diethyl pyrocarbonate), para su posterior esterilización. Los reactivos son preparados con agua libre de pirógenos y RNAsas. Al macerado de los hígados se le agregó 1 ml de TRizol[®], se agitó en vortex por 30 segundos. Se agregaron 200 µl de cloroformo, se agitó a mano 15 segundos, y se incubó a temperatura ambiente por 3 minutos. Se centrifugó a 12000 rpm, 10 minutos a 4°C. Se recolectó la fase acuosa y se le agregaron 500 µl de isopropanol, se agitó y se incubó en hielo por 15 minutos. Se centrifugó a 11500 rpm, 10 minutos a 4°C. Se decantó el isopropanol y la pastilla se dejó secar a temperatura ambiente por 5 minutos. Se le agregó 1 ml de etanol al 70%, se agitó en vortex por 30 segundos, se centrifugó a 12000 rpm 15 minutos a 4°C. Se decantó el sobrenadante y se agregó 1 ml de etanol, se agitó en vortex por 30 segundos, y se centrifugó a 12000 rpm 15 minutos a 4°C. Se decantó el

sobrenadante y se dejó secar a temperatura ambiente por 20 minutos. La pastilla se disolvió en 30-50 μ l de agua y se guardó a -70°C para su uso posterior. La calidad y cantidad del RNA fue determinado por absorbancia a 260/280 nm.

El Northern Blot se realizó según Sambrook y Russell (Sambrook et al., 1989). Brevemente, el RNA total de cada ratón (30 μ g por carril), se corrió por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5%, conteniendo 2.2 M de formaldehído antes de ser transferido a membranas de nylon. El RNA fue hibridizado con la sonda KETc7 o PEPCK marcada con ^{32}P . Las sondas se marcaron utilizando el Kit de marcado random primed (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis). La hibridización se llevó a cabo a 60°C por 16 horas en un buffer de fosfato de sodio 0.5 M, pH 7.2; EDTA 1 mM, pH 7 y 7% de SDS. Las membranas se lavaron una vez con SSC 1x (0.015 M NaCl con 0.015 M de citrato de sodio) con 0.1% SDS a temperatura ambiente por 10 minutos y luego por tres veces con 0.5 X SSC-0.5% SDS por 10 minutos a 68°C y expuestas a papel film para autoradiografía.

Además se hicieron estudios posteriores para descartar la posibilidad de que las bandas observadas en el Northern Blot fueran remanentes de la construcción pPc-sp7. Para ello, el plásmido pPc-sp7 ya sea circular o linearizado con la enzima EcoRV con o sin el RNA total del hígado de ratones no vacunados se utilizó para hibridizarlo con la sonda KETc7 marcada con ^{32}P .

7.9 Inducción del promotor PEPCK

Se evaluó la inducción endógena de PEPCK bajo las diferentes dietas. El RNA fue transferido e hibridizado con la sonda PEPCK marcado con ^{32}P previamente obtenido mediante RT-PCR con los primers F361 (5'-ACTGTTGGCTGGCTCTCACT-3') y B1500 (5'-ATGGCTGCTCCTACAAACAC-3'). Se utiliza como templado el RNA total de ratones alimentados con HPD por 24 horas. Para la reacción de RT-PCR, se obtuvo un producto de 1159 pb el cual se clonó usando el kit TOPO TA cloning (Invitrogen, USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante y se confirmó el cDNA de PEPCK por secuenciación.

7.10 Respuesta de anticuerpos

Las muestras de suero de los ratones y de los hámsteres, y las heces de hámsteres se colectaron individualmente antes de comenzar los experimentos y antes de la realización de la infección, o se recolectaron en el momento de la realización de las proliferaciones celulares y/o citometrías de flujo. Se guardaron a -70°C hasta su uso. Se realizó la detección de anticuerpos por ELISA.

- **Modelo de cisticercosis murina**

Los anticuerpos IgG e IgA anti KETc7 fueron determinados por ELISA en suero (Rosas et al., 1998), utilizando un IgG anti-ratón acoplado a fosfatasa alcalina (ZymaxTM San Francisco, California), y una IgA anti-ratón acoplada a biotina (BD Biosciences Palo Alto, California). Como antígeno se utilizaron antígenos solubles del cisticerco de *T. crassiceps* (Larralde et al., 1989). Para la técnica de ELISA para fosfatasa, se sensibilizó la placa con 10 μg del antígeno (1 hora a 37°C) o toda la noche a 4°C , diluido en 100 μl de buffer de carbonatos. Se prepararon las diluciones del suero en PBS-BSA 1% (1:100), se lavó 4 veces con PBS-Tween 0.3% dejando pasar 3 minutos en reposo entre cada lavado, se bloqueó la placa con 100 μl /pozo de PBS-BSA 1%. Se dejó incubar 1 hora a 37°C . Se lavó 4 veces con PBS-Tween 0.3% dejando pasar 3 minutos de reposo entre cada lavado. Se adicionó el suero problema (100 μl /pozo). Se dejó incubar 1 hora a 37°C . Se lavó 4 veces con PBS-Tween 0.3% dejando pasar 3 minutos entre cada lavado, y se le adicionó el conjugado (α -IgG) con fosfatasa, en dilución 1:1000 en PBS-BSA 1% (100 μl /pozo). Se dejó incubar 1 hora a 37°C . Se lavó 4 veces con PBS-Tween 0.3% dejando pasar 3 minutos entre cada lavado. Se adicionó el sustrato p-NPP (para-nitro fenil fosfato) en dilución 1mg/ml (100 μl /pozo) en amortiguador de dietanolamina, y se incubó a 37°C aproximadamente 20 minutos. Se detuvo la reacción con NaOH 2N (50 μl /pozo). Se lee a 405 nm con un diferencial de 630 nm.

Para la técnica de ELISA para biotina, se siguen las instrucciones anteriores pero el conjugado que se agrega es un anticuerpo monoclonal biotinilado (α -IgA), en dilución 1:1000 en PBS-BSA 1% (100 μl /pozo). Se dejó incubar 30 minutos a 37°C y se lavó 3 veces con PBS-Tween 0.3% dejando pasar 3 minutos entre cada lavado. Se adicionó estreptoavidina biotinilada-peroxidasa en dilución 1:1000 en PBS-BSA 1% (100 μl /pozo).

Se dejó incubar 30 minutos a 37°C, se lavó 3 veces con PBS-Tween 0.3%, y se adicionó el sustrato TMB (100 µl/pozo). Se incubó a 37°C de 5-10 minutos y se detuvo la reacción con H₂SO₄ 0.2M (100 µl/pozo). Se lee a 405 nm con diferencial de 630 nm.

- **Modelo de teniasis en hamster**

Los niveles de anticuerpos anti-IgG en los distintos grupos experimentales fueron determinados en suero y heces por ensayos de ELISA utilizando placas de microtitulación (Costar, Corning Incorporated, Corning, NY, USA), las cuales fueron cubiertas con 2.0 µg/ml del péptido sintético KETc1, o BLS o BLS-KETc1 en amortiguador de carbonatos a 4°C durante toda la noche. Para determinar los niveles de anticuerpos séricos, las placas se incubaron con el suero diluido (1:100) en PBS-BSA 1%. Para detectar la unión de inmunoglobulinas (Ig's) de ratón se emplea anti- IgG de ratón acoplado a fosfatasa alcalina en dilución 1:10000 durante 1 hora a 37°C, de acuerdo al procedimiento descrito (Toledo et al., 1999). El desarrollo de la actividad de la fosfatasa se realizó a temperatura de incubación empleando el sustrato p-nitrofenil fosfato disódico (Sigma Diagnostics, Poole Dorset, UK) en buffer de dietanolamina por 10 minutos. La reacción se detuvo con NaOH 2N. Finalmente, la absorbancia se midió a 405 nm en un lector de ELISA (Human Gessellschaft für Biochemica und Diagnostica, Taunusstein, Germany). Para determinar los niveles de anticuerpos en heces, se obtuvieron extractos fecales solubles por la adición de 1 ml de PBS conteniendo 1% de albúmina sérica bovina (BSA) y 1 mM de una solución de fluoruro de fenil-metil sulfonilo (Gibco BRL) por 0.1 mg de material fecal. Los tubos se incubaron toda la noche a 4°C, la suspensión resultante se centrifugó a 11,000 RPM, por 5 minutos y los sobrenadantes se colectaron y conservaron a -20°C hasta su uso. Para los ensayos de ELISA, se utilizaron 100 µl de los extractos fecales por pozo, y se incubaron en placas sensibilizadas una hora a 37°C. Después se sigue el mismo procedimiento que para la detección de inmunoglobulinas en suero. Con la finalidad de evaluar los anticuerpos anti-KETc1 específicos, los sueros y extractos fecales de todos los grupos experimentales se absorbieon. Para esto, cada suero y extracto fecal se incubó toda la noche a 4°C en placas de ELISA sensibilizadas con 2 µg de BLS por pozo. Este procedimiento se repitió 5 veces hasta que se observa que los sueros de los ratones

inmunizados con BLS quedan completamente absorbidos. Finalmente los niveles de anticuerpos anti-KETc1 específicos se determinan como se describió anteriormente.

7. 11 Ensayos de proliferación celular

- **Modelo de cisticercosis murina**

Se llevaron a cabo ensayos de proliferación celular en grupos de 3 ratones control e inmunizados (pPc-sp7, pTc-sp7, pGEM 11Zf(+)), mantenidos en ayuno por 40 horas después de la inyección. Después los ratones fueron alimentados por 30 días con HPD y los bazos de cada grupo se obtuvieron antes del reto en condiciones asépticas y fueron colocados en 5 ml de medio RPMI 1640 (GIBCOBRL, Grand Island, New York) suplementado con L-glutamina (0.2mM), 2-β-mercaptoetanol (0.05mM), aminoácidos no esenciales (0.01mM), penicilina (100U/mL), estreptomina (100ug/mL) y 10% de suero fetal bovino (FBS) como se ha reportado previamente (Cruz-Revilla et al., 2000). Posteriormente se perfundieron los bazos y las células se centrifugaron a 2500 rpm durante 10 minutos a 4°C, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el botón celular en 3-5 ml de solución hemolizante (Sigma, St Louis, Missouri) durante 10 minutos para eliminar los eritrocitos. La reacción se detuvo agregando medio RPMI en relación a 3 veces el volumen de la solución hemolizante empleada. Se colocaron 2×10^5 células esplénicas en un volumen total de 200 μ l y se estimularon ya sea con el mitógeno (Con A, 5 μ g/ml), el antígeno total de *T. crassiceps* (10 μ g/ml), obtenido como previamente se ha descrito (Sciutto et al., 1990) o con el péptido GK-1 (100 μ g/ml) a 37 °C en una atmósfera húmeda en 5% de CO₂. Se procedió al marcaje con methyl ³H-thymidine (1 μ Ci/pozo) (Amersham, Life Science, Little Chalfont, United Kingdom) a las 96 horas de cultivo en placas de microtitulación planas de 96 pozos (Nunc-Immuno™ Plate MaxiSorp™ Surface, Nalge Nunc International, Denmark) y la cosecha se realizó a las 18 horas posteriores (Toledo et al, 1999). La incorporación de timidina se midió en un contador de líquido de centelleo betaplate 1205 (Wallac Oy, Turku, Finland). Todos los ensayos se realizaron por triplicado en tres ratones individuales por grupo. Los datos son expresados como promedio de las cpm por minuto por cada grupo experimental.

- **Modelo de teniasis en hámsteres**

La detección de proliferación celular en hamster se lleva a cabo mediante la incorporación de BrdU. Para la obtención de núcleos, tres hámsteres por grupo experimental fueron re-inmunizados 15 días después de la última inmunización por vía oral con los diferentes tratamientos (SSI, BLS y BLS-KETc1). Veinticuatro horas después se les administró 2 mg de BrdU (Sigma) por vial oral y 2 mg por vía peritoneal. Dos horas después se les dió otro pulso de BrdU bajo las mismas condiciones. Dos horas después los hámsteres fueron sacrificados en una cámara de CO₂, obteniéndose en PBS frío el bazo, las placas de peyer (PP) y los ganglios mesentéricos (GM) de cada uno. Los tejidos fueron procesados para la obtención de células. Brevemente, los tejidos se incubaron en 5 ml de una solución de digestión (Colagenasa 0.5 mg/ml, DNAasa 40 µg/ml y RPMI suplementado con SFB 5%) por 10 minutos a 37°C. Los tejidos se disgregaron sobre una malla para obtener una suspensión celular que se centrifuga a 1500 rpm por 8 minutos a temperatura ambiente. El pellet se trata con la solución de lavado (RPMI suplementado, EDTA 5mM, DNA 5 µg/ml) y se centrifuga de nuevo a 1500 rpm por 8 minutos. Para la obtención de los núcleos, el pellet se trató con una solución de pepsina (0.4 mg/ml en HCl 0.1N) y se incubó por 30 minutos a 37°C con agitación. La suspensión nuclear se filtró a través de una malla de 50 µm y se centrifugó a 500 X g por 8 minutos. El pellet se resuspende en una solución de HCl 2N por 30 minutos, se centrifuga a 500 X g por 8 minutos y se incubó con una solución de Borato de sodio 0.1M pH 8.5 por 2 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se resuspendió en solución amortiguadora de fosfatos (PBS) con BSA al 5% para la realización del FACS.

7.12 Citometría de flujo

- **Modelo de cisticercosis murina**

Para determinar las subpoblaciones celulares (CD3+, CD4+, CD8+), a los ratones previamente inmunizados y controles, se procedió a la extracción de células esplénicas, las cuales se estimularon previamente *in vitro*, tanto como con antígeno total de cisticercos de *T. crassiceps*, como con el péptido GK-1 (100 µg/ml) o Concanavalina A (5 µg/ml) como control positivo. Estas células se marcaron con anticuerpos monoclonales específicos para cada una de las moléculas anteriormente mencionadas: anti-CD4 conjugado a FITC, anti-

CD8 conjugado a FITC. También se utilizaron anticuerpos específicos para moléculas de activación como CD25 o C69 marcados con estreptoavidina conjugado a PE-Cy5, para observar el estado de activación de las células, ya sea en su conjunto o por separado, y CD19 marcada con PE como marcador de linfocitos B (todos los anticuerpos de Pharmingen, San Diego, California). Se utilizó un citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson, San Jose, California) y los datos fueron analizados con el Software Cell Quest.

- **Modelo de teniasis en hámsteres**

Para la evaluación de la incorporación de BrdU en células en división por citometría, por condición experimental y por tejido se resuspendieron cinco millones de células procesadas para la obtención de núcleos, como se explicó anteriormente, en 50 μ l de una solución de PBS adicionada con 0.5% de Tween 20 y 2.5 μ g de un anticuerpo FITC anti-BrdU (eBioscience) y se incubaron por 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Los núcleos se lavaron tres veces con 0.2 ml de 0.5% Tween 20 en PBS. La incorporación de BrdU se evaluó en un FACscan y se analizó en el programa WinMDI 2.8.

7.13 Análisis histológico e inmunohistoquímica

Los ratones vacunados e infectados fueron sacrificados para determinar el número de cisticercos por ratón. El hígado recién obtenido fue fijado con paraformaldehído al 4% en buffer de fosfatos 0.2 M, pH 7.4 (PBS) e inmerso en parafina. Los tejidos fijados fueron cortados en secciones seriales de 7- μ m, y tratados con 0.1 M de buffer de citratos para eliminar proteínas pegadas no deseadas. La actividad endógena de la peroxidasa se inhibió utilizando una solución de H₂O₂ en PBS por 10 minutos y lavando tres veces con PBS por 5 minutos. La inmunodetección se llevó a cabo usando el kit HISTOMOUSE™SP (Zymed Laboratories Inc., Carlsbad, California), siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se usaron sueros de ratones no tratados (control negativo) y ratones infectados (control positivo), a una concentración final de 1:5000 en 1% BSA-PBS por 1 hora a 37°C. Después de 3 lavados de 5 minutos cada uno con PBS, las secciones fueron incubadas con un anticuerpo IgG anti-ratón acoplado a biotina (Zymed), por 30 minutos a 37°C. Después de 3 lavados adicionales, las secciones fueron incubadas con estreptoavidina-peroxidasa por 30 minutos a 37°C y lavados tres veces más. Los

anticuerpos específicos fueron revelados usando DAB (3'3-Diaminobencidina, Zymed). Todos los cortes fueron contrastados con hematoxilina del mismo kit, y los cortes fueron montados con el kit Histomount (Zymed). Cada hígado fue realizado individualmente.

7.14 Detección de la expresión de citocinas mediante transcriptasa reversa PCR (RT-PCR) en el modelo murino

Para la detección de la expresión de citocinas se usó la determinación semicuantitativa por RT-PCR. El RNA purificado como antes se mencionó, se transcribió reversamente (RT) para la reacción específica de amplificación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para TNF- α , INF- γ e IL-10 (Ulett et al., 2000), junto con β -actina (220 bp, sentido 5'-GGGTCAGAAGGATTCCTATG-3'; antisentido 5'-GGTCTCAAACATGATCTGGG-3'). Por cada 5 μ g de RNA, se agregaron 36 μ l del Mix RT: 15 μ l de Buffer 5X first strand buffer, 3 μ l de DTT 0.1M, 3 μ l de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 3 μ l del primer Oligo dT y 3 μ l de la enzima M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen). El PCR de los productos de cDNA (5 μ l) se llevaron a cabo en un volumen final de 50 μ l que contiene: 1.5 mM MgCl₂ (Gibco/BRL), 10 mM de mix deoxynucleoside triphosphate (dNTP-mix), 15 μ M del respectivo primer sentido y antisentido específico para cada citocina (Invitrogen), 2 μ l del buffer Taq (10X), y 5 U/ μ l de Taq DNA polimerasa (*Thermus aquaticus*) (Gibco/BRL). Cada reacción de PCR de cada citocina se llevó a cabo bajo diferentes condiciones de desnaturalización, alineamiento y extensión (Tabla 1).

Los productos de PCR se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, teñidos con bromuro de etidio. La expresión relativa de la citocinas se muestra como el radio de cada gen estudiado relativo a la expresión en la misma preparación del gen de β -actina, usado como control de expresión constitutiva (Scion Image, Scion Corporation, based on NIH image, USA, 2000).

Tabla 1. Conjunto de primers, secuencia de nucleótidos de los primers, tamaño de los productos y las condiciones de PCR

<u>Primers</u>	<u>Secuencia nucleotídica de los primers^a</u>	<u>Productos (bp)</u>	<u>Condiciones de PCR</u>
TNF- α	5'-GGCAGGTCTACTTTGGAGTCATTGC-3'	(307)	D 94°C for 30 sec
	5'-ACATTCGAGGCTCCAGTGAATTCGG-3'		A 63°C for 50 sec E 72°C for 40 sec
INF- γ	5'-AGCGGCTGACTGAACTCAGATTGTAG -3'	(243)	D 94°C for 30 sec
	5'-GTCACAGTTTTTCAGCTGTATAGGG-3'		A 60°C for 40 sec E 72°C for 40 sec
IL-10	5'-ACCTGGTAGAAGTGATGCCCCAGGCA-3'	(237)	D 94°C for 45 sec
	5'-CTATGCAGTTGATGAAGATGTCAAA-3'		A 63°C for 45 sec E 72°C for 45 sec

^aPara cada par de primers, la secuencia sentido se muestra arriba de la de antisentido.

^bDesnaturalización, ^cAlineación, ^dExtensión

7.15 Estadística

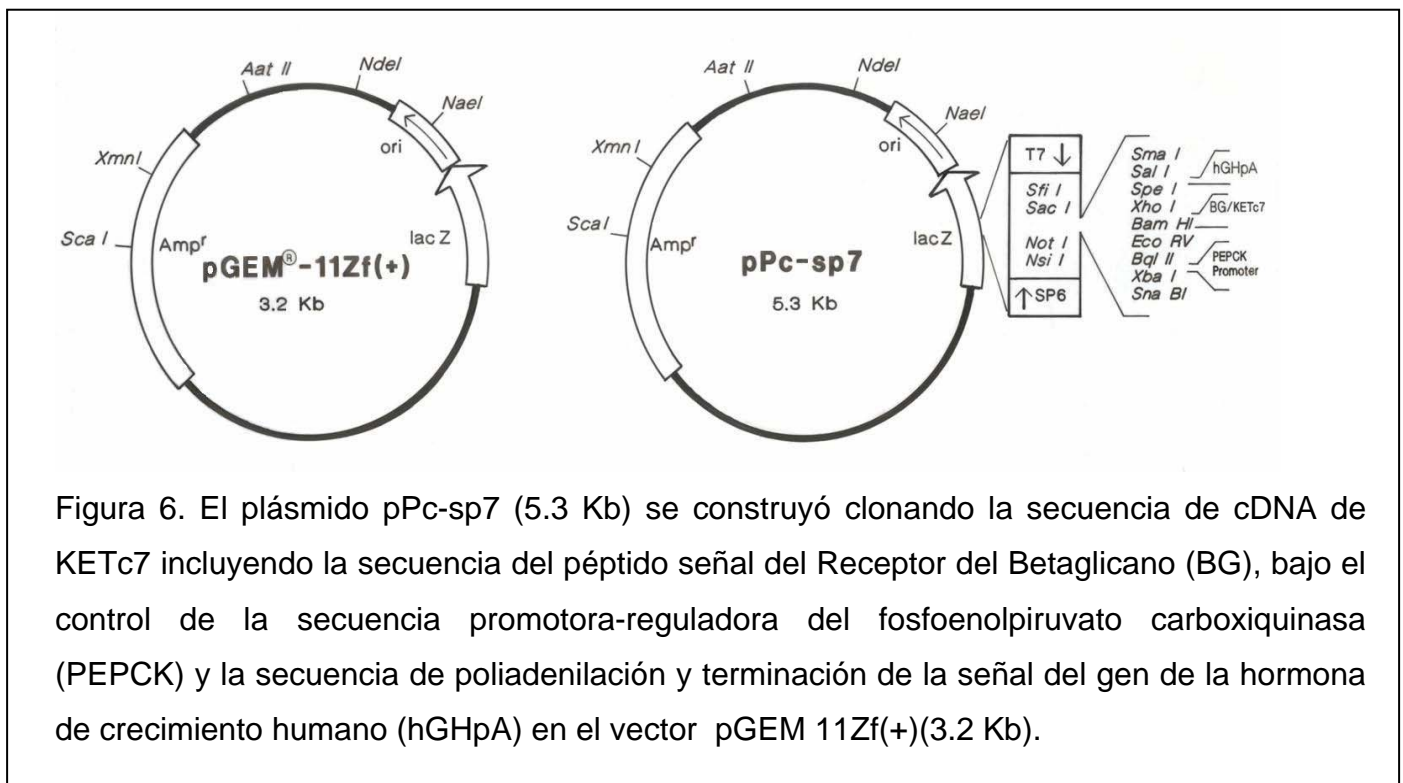
Los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente utilizando el programa InStat Software Program (GraphPad). Las diferencias entre grupos se consideraron significativas con una $P < 0.05$.

8. RESULTADOS

8.1 Evaluación de la capacidad protectora y la respuesta inmune inducida por el plásmido pPc-sp7 en el modelo murino de cisticercosis por *Taenia crassiceps*

a. Obtención de la construcción pPc-sp7

Se obtuvo la construcción pPc-sp7, la cual contiene un nuevo polilinker, la secuencia de interés KETc7, que corresponde a un antígeno recombinante del cisticerco de *T. crassiceps*, la secuencia del promotor inducible de la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK), y la secuencia de poliadenilación y terminación de la transcripción de la hormona de crecimiento humano (Fig. 6).



b. Transfección de las células e inmunocitoquímica

Utilizando distintas líneas celulares (HepG2, FTO-2B, COS) transfectadas con la construcción pPc-sp7 y con la construcción pTc-sp7, cuya expresión *in vitro* e *in vivo* fue previamente confirmada (Rosas et al., 1998; Cruz-Revilla et al., 2000) y empleando

distintas metodologías de transfección (Fosfato de calcio, DEAE-Dextran y lipofectina), y diferentes condiciones experimentales de reacción, no se confirmó la expresión de la proteína *in vitro* (datos no mostrados).

c. Inmunización en hígado para la evaluación de la expresión de la construcción

Con el propósito de confirmar la expresión de la construcción, fue inyectada directamente en el hígado de los ratones. Su evaluación se realizó obteniendo el RNA para la realización del Northern Blot correspondiente.

Realizando el Northern Blot de todos los ratones inmunizados y controles y utilizando como sonda a KETc7, se observó solamente en los ratones inmunizados con la construcción pPc-sp7 con 40 horas de ayuno (Fig. 1A, artículo 1) la presencia clara de dos bandas de 4.7 y 0.5 Kb que indican la expresión de KETc7 en 2 de 3 ratones, aunque no son del tamaño esperado (565 pb), pero no se observa hibridización al proporcionar a los ratones vacunados las distintas dietas (CD, HPD, HCD; datos no mostrados). En el resto de los ratones inmunizados con pTc-sp7, pGEM 11Zf(+) o controles, bajo las diferentes condiciones de alimento proporcionado (CD, HPD, HCD) no se observó señal de hibridización (datos no mostrados). Experimentos adicionales utilizando pPc-sp7 circular o linearizado con Eco RV, soportan la idea de que ninguna de estas bandas corresponde a la forma circular o linearizada remanentes del plásmido inyectado. La misma membrana se utilizó para ser revelada con la sonda de cDNA PEPCK y una banda de 2.6 kb fue detectada como se esperaba (datos no mostrados).

La expresión de KETc7 fue confirmada también por inmunohistoquímica. La expresión de KETc7 se observa en los hepatocitos inmunizados con pPc-sp7 al menos hasta 12 semanas después de la vacunación (Fig. 1B, artículo 1).

d. Evaluación de la expresión de la construcción en la susceptibilidad a la cisticercosis murina

La Tabla 1 (artículo 1) muestra el efecto de la vacunación intrahepática en el número de cisticercos recuperados después de 30 días de infección. Ya sea con la inmunización del plásmido vacío pGEM 11Zf(+) o con pPc-sp7 o pTc-sp7, se obtuvo una protección total de los ratones del 42.8 al 60%, que parece encontrarse relacionado con el número de

motivos GACpGTT o AACpGTT/Kb presentes en cada plásmido. Una reducción significativa de la carga parasitaria comparado con los ratones controles se obtuvo cuando se inmunizó con pGEM 11Zf(+) o pTc-sp7, no así con pPc-sp7. Se encontró una relación entre el nivel de expresión debido a los hepatocitos transfectados después de la inyección con pTc-sp7 o pPc-sp7 y la cantidad de parásitos recuperados después del desafío (Fig. 7).

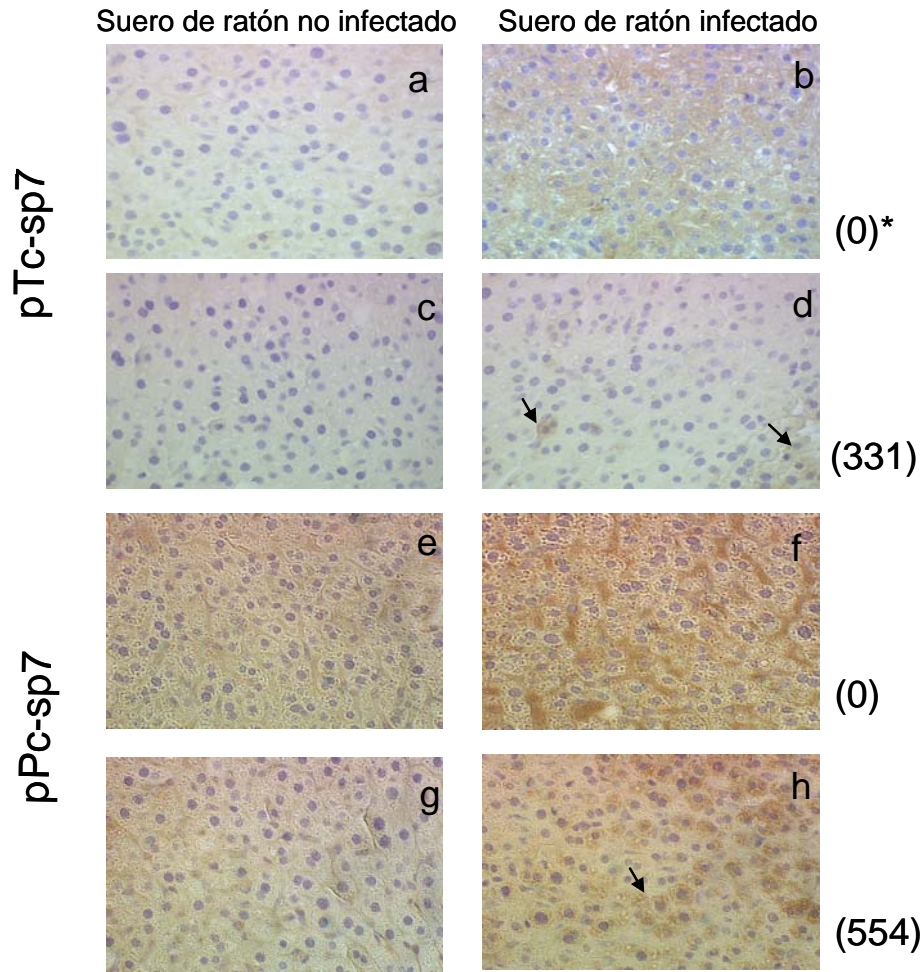


Figura 7. La expresión en el hígado de KETc7 se encuentra relacionada con la carga parasitaria obtenida. Inmunohistoquímicas de cortes de hígado inmunizados con 200 μ g de DNA (1 dosis) con pTc-sp7 (a, b, c, d) o pPc-sp7 (e, f, g, h). Secciones de 7 $m\mu$ fueron procesado e incubados con un conjunto de sueros de ratones no infectados (1:5000) (a, c, e, g) o infectados con cisticercos de *T. crassiceps* (b, d, f, h). 30 días después de la inmunización, los ratones fueron infectados con 10 cisticercos de *T. crassiceps* y la carga parasitaria fue determinada 30 días después. *Número de cisticercos recuperados por ratón. Las flechas muestran la expresión de KETc7 en las células transfectadas.

e. La vacunación intrahepática no induce anticuerpos específicos

La respuesta de anticuerpos hacia los ratones controles o vacunados con pGEM 11Zf(+), pPc-sp7 o pTc-sp7 fueron medidos por ELISA. No se encontraron anticuerpos específicos IgG o IgA a las 8 o 12 semanas después de la inmunización intrahepática con DNA, en ninguno de los ratones inmunizados con las distintas construcciones (datos no mostrados).

f. Respuesta proliferativa *in vitro* e *in vivo*

La inmunización con el plásmido pGEM 11Zf(+) produjo un incremento de la proliferación linfocitaria tanto *in vitro* como *in vivo*. De cada uno de los bazo recuperados de cada ratón, se determinó la cantidad total de células, y se encontró un número significativamente mayor de células de bazo en los ratones inmunizados únicamente con pGEM 11Zf(+) ($7.2 \times 10^7 \pm 8 \times 10^6$) ($P < 0.004$) con respecto a los ratones control ($5.2 \times 10^7 \pm 7 \times 10^6$, $P < 0.004$) o los ratones vacunados con pTc-sp7 ($5.3 \times 10^7 \pm 9 \times 10^6$) o pPc-sp7 ($2.2 \times 10^7 \pm 10 \times 10^6$). También se observó un incremento significativo de la respuesta de proliferación en los ratones inmunizados con pGEM 11Zf(+) ($P < 0.05$), comparados con el resto de los grupos (Tabla 2), la cual no se modificó cuando las células fueron cultivadas en presencia del antígeno.

Tabla 2. Respuesta de proliferación de los esplenocitos de los ratones control e inmunizados con DNA

	Tratamiento <i>in vitro</i> :			
	Medio	Extracto total de cisticercos de <i>T. crassiceps</i>	GK-1	Con A
Control	123 ± 32	80 ± 35	167 ± 43	1.5 x 10 ⁵ ± 7.5 x10 ⁴
Inmunizado con:				
pGEM 11Zf (+)	2588 ± 2986*	2530 ± 2285*	4156 ± 3640*	1.9 x 10 ⁵ ± 8.6 x10 ⁴
pPc-sp7	162 ± 78	222 ± 82	211 ± 88	2.2 x 10 ⁵ ± 3.9 x10 ⁴
pTc-sp7	325 ± 200	531 ± 318	563 ± 264	1.6 x 10 ⁵ ± 3.9x10 ⁴

Ratones BALB/cAnN hembras fueron inmunizados en hígado con SSI (controles) o con 200 µg de DNA/ 40 (1 SSI (una dosis). Se obtuvieron las células totales de cada bazo por perfusión. La respuesta de proliferación celular fue determinada por incorporación de [3H] timidina a las 96 horas de cultivo e incubadas con antígeno total de *Taenia crassiceps* o con GK-1 (100(g/ml). Como control positivo las células fueron incubadas con Concanavalina A (5(/ml). Las cpm leídas de los bazos de las células inmunizadas con pGEM 11Zf(+) fueron significativamente mayores (P<0.05), que las obtenidas en el resto de los grupos (Mann-Whitney Test). * Los datos se muestran en promedio (SD.

g. Citometría de flujo

No se observó un cambio significativo en las distintas subpoblaciones celulares realizando un análisis por citometría de flujo de las células de bazo recobradas de los ratones control, comparados con los inmunizados con pGEM 11Zf(+), pPc-sp7 o pTc-sp7 (datos no mostrados).

h. Expresión de citocinas determinadas por PCR

Como se muestra en la Figura 2 (artículo 1), un incremento significativo de la proporción de INF- γ / β -actina se detectó solamente en los hígados inmunizados con pGEM 11Zf(+) ($p < 0.05$). Se observó un decremento de la expresión relativa de TNF- α en los ratones inmunizados con pGEM 11Zf(+) y pPc-sp7, pero se incrementó en los ratones inmunizados con pTc-sp7. La expresión de IL-10 fue significativamente mayor en el grupo inmunizado con pPc-sp7 que en el grupo control, con variables grados de expresión.

8.2 Evaluación de la capacidad protectora y la respuesta inmune inducida por la vacunación con S3Pvac, KETc1 o BLS-KETc1 en el modelo de teniasis experimental en hamster dorado

a. El máximo número de tenias se obtuvo a los 14 días de infección

Para determinar las mejores condiciones para la evaluación de los efectos de los diferentes inmunógenos empleados, hámsteres hembras y machos no tratados fueron desafiados con 6 cisticercos cada uno. Cinco hembras y 5 machos se sacrificaron a las 2, 3 o 4 semanas después del desafío y el número de tenias en el intestino de cada uno de los hámsteres fue contado. Como se muestra en la Figura 1 (artículo 2), se recobraron niveles similares de tenias tanto de hembras como de machos al día 14 post-infección. Después de este tiempo, el número de tenias disminuye significativamente en machos aunque no en hembras ($p = 0.03$); 7 de 10 machos no tienen parásitos, mientras que todas las hembras se encuentran infectadas. Esta es la primera evidencia de dimorfismo sexuales en el control de la tenia intestinal por *T. solium*.

b. Una primo-infección experimental por *Taenia solium* confiere protección en contra de infecciones subsecuentes

La Tabla 1 (artículo 2) muestra los resultados obtenidos de la infección de 21 hámsteres hembras. En el grupo parasitado para confirmar la efectividad de la primera infección, en cada hamster se observó de 2 a 6 tenias (3.1 ± 1.9), excepto un hamster que no tuvo ninguna tenia. De los 14 hámsteres restantes, en el grupo con una primo-infección se observó un número significativamente menor de tenias que las recobradas en ausencia

de una primo-infección ($P=0.05$). El tratamiento previo con niclosamida no afecta el número de tenias instaladas después de la infección.

c. Se observó protección inducida por la vacunación con los distintos inmunógenos

- En la Tabla 2 (artículo 2, Experimento #1) se observa la protección inducida por la inmunización simultánea con BLSKETc1 (oral) seguida de una inmunización con S3Pvac (sc) en contra de la infección. El grupo control con niclosamida se utilizó para comparar la capacidad de protección de la vacuna con una droga convencional efectiva anti-helmíntica. La inmunización con ambas vacunas induce protección total, igual que el tratamiento con niclosamida.

- La inmunización sistémica con S3Pvac (sc) y oral con BLS-KETc1 usadas en su conjunto redujo el número de tenias esperadas igual que solo una dosis de S3Pvac (sc) o BLS-KETc1 (oral) (Tabla 2, artículo 2, Experimento #2). Se registró el largo de las tenias recuperadas en animales controles y vacunados. Comparando el largo de las tenias obtenidas en el total de animales vacunados relativo a el largo de las tenias obtenidas en el total de los animales controles, se observó una disminución en los animales vacunados, sugerente a que la respuesta inmune inducida podría controlar el número de tenias establecidas y su desarrollo (Tabla 3). La vacunación con S3Pvac o BLS-KETc1 no aumenta significativamente los niveles de anticuerpos específicos en heces en los hamster controles y vacunados antes del desafío, como se observa en la Tabla 3. Tampoco se observaron incrementados los niveles de anticuerpos IgG específicos (datos no mostrados). Analizando si existía correlación entre la cantidad de parásitos recuperados en los hámsteres vacunados y los niveles de anticuerpos en cada uno de ellos, no se observó correlación entre ambas variables (datos no mostrados).

Tabla 3. Protección inducida por vacunación

Inmunizado con:	Número de tenias por hamster	Largo de las tenias (cm)
Salina	⁺ 6, 6, 4, 1, 2, 0, 5 3.4 ± 2.4	⁺⁺ 1.2, 2.7, 0.6, 1, 3.7, 0.6
Saponina	5, 3, 4, 6, 3, 6 4.5 ± 1.4	3, 1.6, 2.6, 5.2, 6.7, 4.2
BLS-KETc1/S3Pvac	2, 0, 2, 0, 1, 0, 0 0.7 ± 0.9*	0.8, 2, 1.7
S3Pvac	1, 4, 0, 0, 0, 1 1 ± 1.5*	3, 0.1, 0.1
BLS-KETc1	0, 0, 0, 2, 0, 1 0.5 ± 0.8*	0.3, 0.4

⁺Número de tenias recuperadas por hamster (Promedio ± DS por grupo). ⁺⁺Promedio del largo de las tenias recuperadas por hamster. Los hámsteres se inmunizaron con BLS-KETc1 (oral) y 6 días después se inmunizaron con S3Pvac (sc), y se desafiaron 4 días después de la última inmunización. Los otros grupos se inmunizaron con S3Pvac (sc) o con BLSKETc1 (oral) y se desafiaron 10 días después. Los controles fueron inyectados con SSI o saponina en los tiempos respectivos. Se sacrificaron 16 días después de la infección. *Diferencias significativas respecto al control (P< 0.05, Mann-Whitney Test).

d. La inmunización con BLS-KETc1 indujo proliferación celular

Con la intención de conocer en que órgano se daba la activación y proliferación celular *in vivo* por efecto de la vacunación con BLS-KETc1, los hámsteres inmunizados con BLS y BLS-KETc1 se inmunizaron por segunda vez 15 días después de la primera inmunización, y se trataron con BrdU 24 horas después junto con los hámsteres inmunizados solamente con SSI, para ser sacrificados 4 horas después para realizar la citometría de flujo de los ganglios mesentéricos, del bazo y de placas de Peyer. Como se

muestra en la Figura 8, se indujo proliferación celular específica *in vivo* tanto en los animales inmunizados con BLS como en aquellos inmunizados con BLS-KETc1.

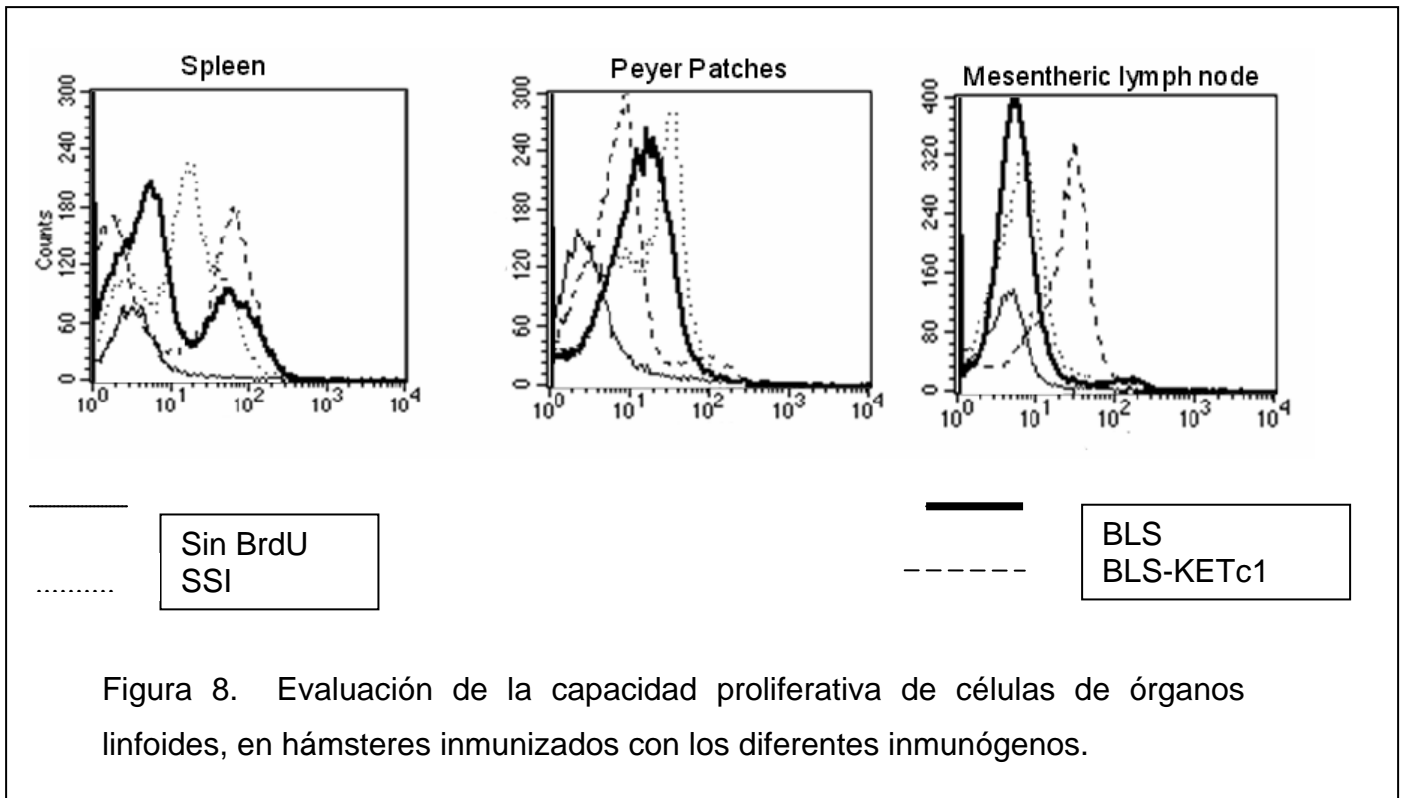


Figura 8. Evaluación de la capacidad proliferativa de células de órganos linfoides, en hámsteres inmunizados con los diferentes inmunógenos.

RESULTADOS

Los resultados de esta tesis se incluyen en los siguientes artículos:

1. **C. Cruz-Revilla**, A. Sonabend, G. Rosas, A. Toledo, G. Meneses, F. Lopez-Casillas, B. Hernández, G. Fragoso, and E. Sciutto. 2006. Intrahepatic DNA vaccination: unexpected increased resistance against murine cysticercosis induced by non-specific enhanced immunity. *Journal of Parasitology*. En prensa.

2. **C. Cruz-Revilla**, A. Toledo, G. Rosas, M. Huerta, I. Flores-Perez, N. Peña, J. Morales, J. Cisneros-Quiñones, G. Meneses, A. Díaz-Orea, N. Anciant, F. A. Goldbaum, A. Aluja, C. Larralde, G. Fragoso, and E. Sciutto. 2006. Effective protection against experimental *Taenia solium* tapeworm infection in hámsteres by primo-infection and by vaccination with recombinant or synthetic heterologous antigens. *Journal of Parasitology*. En prensa.

En el apéndice I, se adjuntan los artículos antes mencionados.

9. DISCUSIÓN

9.1 Vacunación con DNA en contra de la cisticercosis murina por *Taenia crassiceps*

El objetivo inicial del trabajo fue evaluar la utilización de promotores inducibles en la vacunación con DNA con el empleo del modelo de cisticercosis murina y el antígeno protector KETc7. Se utilizó la secuencia del péptido KETc7 considerando trabajos previos en los que demostramos que este antígeno inducía altos niveles de protección en contra de la cisticercosis experimental murina por *T. crassiceps*, tanto cuando se utilizaba como antígeno recombinante (Manoutcharian et al., 1995) como en inmunización intramuscular o intradérmica con DNA (Rosas et al., 1998; Cruz-Revilla, 2000). La secuencia de KETc7 incluye por lo menos dos epítopes protectores, los cuales producidos sintéticamente también inducen altos niveles de protección en el modelo murino (Toledo et al., 1999; Manoutcharian et al., 1999). Esta secuencia altamente inmunogénica se utilizó para evaluar el efecto de la modulación de la expresión del antígeno en vacunación con DNA. Para este propósito, se construyó el plásmido pPc-sp7 utilizando el promotor inducible tejido-específico PEPCK (Hanson and Reshef, 1997; Hatzoglou et al., 1990) para ser evaluado en inmunización intrahepática con DNA en el modelo murino de cisticercosis. Confirmamos la capacidad *in vivo* de la transcripción y traducción de KETc7 en hígado después de la inmunización intrahepática con pPc-sp7 a través de la detección del RNA mensajero y de las proteínas en hígado de ratones inmunizados. Observamos por inmunohistoquímica que podía detectarse a KETc7 en hígado aún después de 12 semanas de la inmunización intrahepática. Esta expresión solo fue observada con ayuno. Estos resultados demuestran que el promotor PEPCK es capaz de controlar la expresión del DNA en el tejido hepático mediante al ayuno.

Contrariamente a lo esperado encontramos que aun en condiciones de expresión de la construcción *in vivo*, no se encontraron evidencias de respuesta inmune específica: no se encontraron anticuerpos específicos IgG o IgA o respuesta de proliferación celular específica *in vitro*. Tampoco se observaron diferentes subpoblaciones linfoides mediante citometría de flujo en el bazo de los ratones inmunizados con pTc-sp7 o pPc-sp7, antes o después del estímulo específico. Estos resultados contrastan con la respuesta inmune celular y humoral específica inducida por vacunación intramuscular o intradérmica con pTc-

sp7 (Rosas et al., 1998; Cruz-Revilla et al., 2000). La ausencia de respuesta inmune específica en los ratones inmunizados intrahepáticamente, considerando que esta construcción ha resultado inmunogénica administrada por vía intramuscular o intradérmica, nos permite sugerir la existencia de fenómenos reguladores que controlan la inducción de una respuesta inmune específica en la inmunización intrahepática. Esta ausencia de respuesta inmune específica, podría deberse a la participación de las células endoteliales sinusoides del hígado (LSEC), las cuales se ha probado que inducen tolerancia de células T hacia los antígenos (Limmer and Knolle, 2001; Limmer et al., 2000; Limmer et al., 2005). Las LSEC contribuyen en el control de la respuesta inmune en contra de antígenos en circulación y son fundamentales en la generación de tolerancia en el hígado. Además, se ha observado que esta inducción de la tolerancia puede decrecer con la presencia de motivos CpGs. Los motivos CpGs pueden activar células de Kupffer y dendríticas, a través de TLR9, induciendo una respuesta inflamatoria (Knolle and Limmer, 2003). Estos resultados son compatibles con la posibilidad de que pGEM 11Zf(+) a través de sus secuencias CpG induzca activación de receptores Toll presentes en hepatocitos, células en las que este receptor se ha descrito (Liu et al., 2002). Se han reportado que las secuencias CpG pueden inducir una respuesta inmune (Magnusson et al., 2001). Quintana y colaboradores (2000) han reportado que la vacunación con el plásmido vacío o con oligonucleótidos CpG inhibe la diabetes en ratones diabéticos (NOD) y no solo su construcción pHSP60. Este estudio presenta evidencias del incremento en la inducción de la expresión relativa de INF- γ en los grupos vacunados, que pudiera resultar consecuencia de la activación de células a través de secuencias CpG incluidas en el plásmido utilizado para la inmunización intrahepática con DNA (Zhao et al., 2004).

El alto nivel de protección observado por vacunación intrahepática (Tabla 1, artículo 1) en ausencia de respuesta inmune específica es compatible con la relevancia la inmunidad no específica en contra de la infección. Como se observa en la Tabla 1 (artículo 1), el mayor nivel de protección se observó al inmunizar intrahepáticamente con el vector vacío pGEM 11Zf(+). Esta inmunidad no específica incluye un incremento en la respuesta de proliferación celular de los esplenocitos *in vivo* e *in vitro* (Tabla 2). La activación por LSEC por motivos CpG no metilados pueden iniciar una respuesta inmune inflamatoria que puede controlar el establecimiento de los parásitos (Magnusson et al., 2001; Zhu et al.,

2001; Knolle and Limmer, 2003; Liu et al., 2002). Esta posibilidad puede suceder también cuando se observa resistencia a la cisticercosis murina al inmunizar intramuscular o intradérmicamente con el plásmido vacío pcDNA3, mediado también por los motivos CpG (Rosas et al., 1998). Se ha observado que la respuesta sistémica inflamatoria inducida por CpGs se caracteriza por la proliferación de esplenocitos, el incremento de INF- α y el decremento de IL-10 (Hemmi et al, 2003; Zhao et al., 2004) encontrados en este trabajo.

Se observa una gran variación en la capacidad de protección con la vacunación intrahepática con DNA (Tabla 1, artículo 1). Así hay algunos ratones totalmente protegidos, mientras otros se encuentran parcialmente protegidos y en otros no se observa protección alguna. Es factible que estas divergencias se debieran a diferencias en la efectividad de la inmunización génica. Para evaluar esta posibilidad se realizaron inmunohistoquímicas del hígado de los ratones después de la infección utilizando anticuerpos contra KETc7, considerando su presencia como un parámetro asociado a la intensidad de la transfección. Como se observa en la Figura 6, existe un menor número de células que expresan KETc7 en los hígados de los ratones con mayor número de parásitos. Estos resultados sugieren que el nivel de expresión/transfección se relaciona con la protección inducida por vacunación intrahepática. Así, los diferentes niveles de transfección de las células podrían participar en las diferencias en la capacidad protectora inducida entre los diferentes ratones.

9.2 Modelo de teniasis experimental en hamster dorado

Para la prevención de la *Taenia solium* resulta necesario el desarrollo de programas sistemáticos para su control. Para este propósito se han contemplado el desarrollo de diferentes tecnologías tanto para su prevención como para su diagnóstico (Tsang et al., 1989; Sotelo et al., 1985; Gonzalez et al., 2002, Huerta et al., 2001; Manoutcharian et al., 2004; Flisser et al., 2004). Un participante central en la teniasis/cisticercosis es el hospedero definitivo de la tenia adulta, con una alta eficiencia para la transmisión de la enfermedad (Anderson and May, 1985; Gemmell, 1969). Aunque tratamientos con niclosamida, praziquantel o albendazol han mostrado efectividad en contra de varios helmintos, incluyendo *T. solium* (Tanowitz et al., 2001; Jeri et al., 2004), el poder desarrollar estrategias para su prevención resultaría una meta mas atractiva considerando

que permitiría la prevención del establecimiento del parásito y de la producción de millones de huevos con capacidad de desarrollarse a cisticercos. Una vacunación efectiva en contra de la tenia adulta podría impactar importantemente en la dinámica de la endemia en la fase más activa de la transmisión.

El incrementar la resistencia en contra del establecimiento de la tenia en el intestino del hospedero definitivo mejorando su respuesta inmune a través de vacunación, es una estrategia que no había sido considerada ni explorada en la teniasis por *T. solium*. Mientras tanto, en otras cestodiasis se han explorado las posibilidades de prevenir la teniasis intestinal a través de la exacerbación de la respuesta inmune, en particular la sistémica (Andreassen, 1991; Andreassen and Hopkins, 1980; Herd et al., 1975; Heath et al., 1980; Hopkins, 1982; Ping-chin et al., 2004; Rickard et al., 1977; Richard and Adolph., 1977).

Para la evaluación de las posibilidades de la vacunación en contra de la teniasis utilizamos en esta tesis el modelo de hamster dorado desarrollado por Gnezdilov (1957). Este modelo ha resultado útil en otros laboratorios para el estudio de los estados iniciales de desarrollo del cisticerco en el parásito adulto (Verster, 1971; Merchant et al., 1998).

Por vez primera en este trabajo se observa la relevancia de la inmunidad adquirida en contra de la tenia. Como se muestra en la Tabla I, una primera infección aumenta significativamente la resistencia del huésped a una segunda infección. La capacidad de inducir naturalmente protección por primo-infección permite considerar factible simular la primo-infección por vacunación con resultados al menos similares. Adicionalmente, esta observación podría estar relacionada con la baja frecuencia de portadores de la fase adulta del parásito en medio endémico en donde se reportan altos porcentajes de individuos seropositivos y con proliferación positiva (ambos indicadores de contactos previos con el parásito). Así, podríamos considerar que vivir en el medio endémico, la inmunidad adquirida por contacto con el parásito en alguna de sus formas, podría ser efectiva en interrumpir el establecimiento y/o desarrollo del parásito en el intestino (Chavarria et al., 2003; Fleury et al., 2003).

En este trabajo de tesis observamos que inmunizando tanto por vía sistémica con la vacuna S3Pvac como por vía oral con la proteína quimérica BLS-KETc1, se reduce el número de tenias establecidas en el intestino en la infección experimental. La vacunación

con ambos inmunógenos redujo el número de tenias instaladas desde un 85 % hasta un 100% (Tabla II, artículo 2). Un hallazgo muy relevante es la capacidad de inducir altos niveles de protección a través de la inmunización oral, aún sin el uso de adyuvantes (Tabla II, artículo 2). La prevención a través de una intervención por vía oral representa una inmensa ventaja considerando su factibilidad de aplicarla en forma masiva en programas de vacunación.

Si bien queda aún mucho por explorar al respecto de la respuesta inmune inducida por vacunación, las primeras evidencias estudiando la capacidad proliferativa en diferentes compartimentos linfoides nos permiten sugerir que la vacunación activa tanto la respuesta inmune sistémica como local. Así, como se observa en la Figura 8, se indujo proliferación celular específica *in vivo*. BLS-KETc1 indujo mayor actividad proliferativa en los ganglios mesentéricos de los animales vacunados y en menor extensión en el bazo. No se observaron núcleos teñidos con BrdU en las Placas de Peyer, probablemente debido a que en este compartimento ocurren principalmente fenómenos de activación linfocitaria.

10. CONCLUSIONES

• PARTICULARES

Modelo murino de cisticercosis por *Taenia crassiceps*

- Se confirmó la capacidad de la transcripción y traducción *in vivo* de KETc7 en hígado después de la inmunización intrahepática con pPc-sp7, inducida con ayuno. Estos resultados sustentan el uso del promotor PEPCK para controlar *in vivo* la expresión del DNA en el tejido hepático.

- Aunque la expresión de la construcción fue demostrada, no se encontraron evidencias de la inducción de una respuesta inmune específica: no se detectaron anticuerpos específicos IgG o IgA o respuesta de proliferación celular específica *in vitro*. Tampoco se observaron diferentes subpoblaciones linfoides mediante citometría de flujo en el bazo de los ratones inmunizados con pTc-sp7 o pPc-sp7, antes o después del estímulo específico.

- El alto nivel de protección observado por vacunación intrahepática en ausencia de respuesta inmune específica, permite considerar la inducción de inmunidad no específica efectiva en contra de la infección, probablemente mediada por secuencias CpG incluidas en los plásmidos vacunales. El mayor nivel de protección se observó al inmunizar intrahepáticamente con el vector vacío pGEM 11Zf(+) (que presentaba mayor % de secuencias CpG). Esta inmunidad no específica incluye un incremento en la respuesta de proliferación celular de los esplenocitos *in vitro* e *in vivo*, y un incremento de la citocina INF- γ , que permite proponer que pGEM 11Zf(+) a través de sus secuencias CpG podría estar induciendo activación de receptores Toll presentes en hepatocitos.

- Se observa una gran variación en la capacidad de protección con la vacunación intrahepática con DNA, probablemente debido a diferencias en la capacidad de transfección hepática por inmunización con DNA.

Modelo de teniasis experimental en hamster dorado

- En este trabajo se observan las primeras evidencias experimentales de la relevancia de la inmunidad adquirida en contra de la teniasis intestinal en *Taenia solium*. Una primera infección aumenta la resistencia del huésped a una infección ulterior.

- Utilizando por vía sistémica la vacuna S3Pvac y por vía oral la proteína quimérica BLS-KETc1, se puede reducir el número de tenias establecidas y su desarrollo.

- BLS-KETc1 (oral) o S3Pvac (sc) son capaces de inducir un nivel similar de protección, lo que señala la posibilidad del desarrollo de vacunas orales contra la teniasis.

- **GENERALES**

Modelo de cisticercosis murina

La inmunización intrahepática con pGEM 11Zf(+) induce altos niveles de protección con una respuesta proliferativa en bazo y un incremento de la citocina INF- γ , probablemente mediados por una respuesta inmune no específica. Los resultados indican la relevancia de la respuesta inmune no específica en el control de la cisticercosis experimental murina.

Modelo de teniasis experimental en hamster dorado

En este trabajo se establecen las primeras evidencias experimentales que permiten proponer la factibilidad de prevenir contra la teniasis intestinal. Se propone a la quimera BLS-KETc1 como candidato de vacuna oral para la prevención de las teniasis intestinal humana causada por *Taenia solium*.

11. PERSPECTIVAS

- La información obtenida resulta de interés en el marco de los fenómenos de activación celular que pueden ocurrir en hígado, órgano que hasta muy recientemente se ha propuesto como un participante de la orquesta regulatoria de la respuesta inmune. En este sentido convendría explorar la regulación de la respuesta inmune innata y la adquirida en este compartimento y su relevancia en infecciones y patologías hepáticas.

- Los resultados presentados en este trabajo permiten proponer un primer candidato de vacuna oral recombinante potencialmente útil para la prevención de la teniasis humana causada por *Taenia solium*. En este tema quedan aun muchos interrogantes por explorar, desde las mejores combinaciones de inmunización (adyuvantes, número de dosis, tamaño de dosis) para lograr una inmunidad efectiva duradera, así como los fenómenos inmunológicos asociados a la protección inducida.

Date: 2005-11-22 11:10:21
Last Sent: 2005-11-22 11:10:21
Triggered
By: Vickie Hennings

BCC: Redacted
Subject: ManuscriptGE-665R1 Decision Letter
Message: Dear Edda,

I am pleased to inform you that your manuscript "PROTECTION INDUCED BY INTRAHEPATIC DNA VACCINATION USING A TISSUE-SPECIFIC INDUCIBLE PROMOTER" has been accepted for publication in the Journal of Parasitology. Your manuscript will appear in the next available issue.

This is a nice piece of work. Good job to you and your colleagues!

Please take the time to carefully look at your Article File and make certain that this is the correct version of your manuscript. If you should notice any typographical errors/changes that need to be made then email them to us, and Vickie will try to incorporate them before officially sending to Allen Press for publication.

Thank you for your contribution to our Journal. If you have any questions, feel free to contact me.

Sincerely,

Jerry Esch
Editor, Journal of Parasitology
Department of Biology
Wake Forest University
P.O. Box 7629
Winston-Salem, NC 27109
Phone: (336) 758-4487
Fax: (336) 758-6008
E-mail: esch@wfu.edu

RH: RESEARCH NOTE

INTRAHEPATIC DNA VACCINATION: UNEXPECTED INCREASED RESISTANCE AGAINST MURINE CYSTICERCOSIS INDUCED BY NON-SPECIFIC ENHANCED IMMUNITY

C. Cruz-Revilla, A. Sonabend, G. Rosas*, A. Toledo, G. Meneses, F. Lopez-Casillas†, B. Hernández‡, G. Fragoso, and E. Sciotto, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), A.P. 70228, Ciudad Universitaria, C.P. 04510 México D.F.; *Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, A.P. 62210 Cuernavaca, Morelos, México; †Instituto de Fisiología Celular, UNAM, A.P. 70246, Ciudad Universitaria, C.P. 04510 México, D.F.; ‡Facultad de Medicina, UNAM, Ciudad Universitaria, C.P. 04510 México, D.F. *e-mail: edda@servidor.unam.mx*

ABSTRACT: Experimental murine cysticercosis caused by *Taenia crassiceps* has proved to be a useful model with which to test the efficacy of new vaccine candidates and delivery systems against pig cysticercosis. A high level of protection against murine cysticercosis was previously observed by intramuscular or intradermal DNA immunization using the sequence of the recombinant KETc7 antigen cloned in pcDNA3 (pTc-sp7). To determine the effect of KETc7 differential expression in DNA vaccination, KETc7 was cloned in pGEM 11Zf(+) under the control of the tissue-specific regulatory promoter phosphoenolpyruvate carboxykinase. A high level of protection was induced by intrahepatic immunization with pPc-sp7, pTc-sp7 and the empty vector in the absence of any specific immunity. The empty vector pGEM 11Zf(+), the plasmid with the highest content of CpG sequences, provided to the most efficient protection. This protection was related to an increased number of splenocytes, enhanced non-specific splenocyte proliferation, and intensified intrahepatic INF- γ production. Overall, intrahepatic plasmid CpG-DNA immunization provokes an exacerbated non-specific immune response that can effectively control *Taenia crassiceps* cysticercosis.

In 1990, a promising novel form of vaccines was proposed based on immunization with "naked" DNA (Wolff et al., 1990). Since then, DNA-based immunization has been explored as a

vaccination strategy against a variety of infectious diseases (Glenting and Wessels, 2005). In spite of the optimistic expectations, DNA vaccination showed some limitations, i.e., the requirement of a large amount of high quality purified DNA to effectively trigger specific immunity (Manoj et al., 2004), and undesirable side effects due to uncontrolled expression. Considerable efforts are now focused on the development of different strategies to improve DNA vaccination. One desirable objective in DNA vaccination is to restrict antigen expression to a specific organ or cellular type and to control the constitutive expression of the vaccine antigen. This could avoid undesirable effects of tolerance or autoimmunity due to extensive in vivo expression of a foreign antigen (Klinman et al., 2000). The present study was originally designed to evaluate the advantage of using a tissue-specific induced promoter that allows the in vivo regulation of the vaccine expression. The protective KETc7 antigen against *Taenia crassiceps* cysticercosis was, therefore, employed. KETc7 as a recombinant antigen (Manoutcharian et al., 1996), as well as expressed for DNA vaccination, elicited an increased humoral and cellular specific response and a high level of protection against experimental murine cysticercosis (Rosas et al., 1998; Cruz-Revilla et al., 2000). Thus, KETc7 was cloned under the control of the inducible promoter-regulatory sequence of phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) into the pGEM 11Zf(+) plasmid. This sequence could strictly control KETc7 expression by fasting as reported by Perales et al. (1994).

Therefore, the immunogenic capacity of in vivo intrahepatic immunization of this construction was evaluated here using the murine model of cysticercosis. BALB/cAnN female mice aged 4-6 wk were used in all the experiments. Three plasmid vectors were employed, i.e., pGEM 11Zf(+), pPc-sp7, and pTc-sp7. The pPc-sp7 was constructed by modifying the plasmid pGEM 11Zf(+) (Promega, Madison, Wisconsin) with the cDNA sequence of KETc7 that corresponds to a 97 amino acid recombinant antigen of *T. crassiceps* cysticerci (Manoutcharian et al., 1996), the previously described signal peptide's sequence of the betaglycan receptor (BG) (Rosas et al., 1998), and the inducible phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) promoter-

regulatory sequences (560 bp, nucleotides -490 to +73). The plasmid pGEM 11Zf (+), which includes CpG sequences with no insert, was used to evaluate the effect of the vector itself. A previously tested immunogenic DNA construction including the KETc7 antigen under the control of the CMV promotor (pTc-sp7) was also used (Rosas et al., 1998; Cruz-Revilla et al., 2000). Mice were intrahepatically injected with 1 dose (200 µg/mouse in 40 µl of ISS) of each of the 3 different plasmids. Northern blot showed that KETc7 was successfully expressed after DNA pPc-sp7 intrahepatic-vaccination (Fig. 1A) in mice starved for 40 hr after DNA vaccination. KETc7 remained expressed in the liver for at least 12 wk later as shown in immunohistochemical analysis (Fig. 1B). Immunodetection was performed using the HISTOMOUSE™SP Kit (Zymed Laboratories Inc., Carlsbad, California), as recommended by the manufacturer.

To determine the protective properties of the different constructs, mice were either DNA-vaccinated with plasmid pPc-sp7, pTc-sp7, pGEM 11Zf(+), or saline-treated (naive) and were kept fasting during 40 hr after injection. Then, mice were challenged with 10 cysticerci each and killed 30 days later following the previously reported procedure (Rosas et al., 1998). Table I shows that 43 to 60% of mice were totally protected when immunized with either the empty vector pGEM 11Zf(+) or each of the 2 constructs, including, or not, the inducible promoter. A significant reduction of the parasite load with respect to naive mice was detected when mice were immunized with pGEM 11Zf(+) or pPc-sp7, both plasmids with the highest CpG content. Unexpectedly, intrahepatic KETc7 DNA vaccination failed to induce specific immunity. No specific IgG or IgA antibodies, splenocyte proliferative response, or lymphoid subpopulation tested by flow cytometry analysis, were detected 8 or 12 wk after DNA vaccination in any of the vaccinated mice with the different constructs using the previously reported procedures (data not shown) (Cruz-Revilla et al., 2000). This result contrasts with the effective specific humoral and cellular immune response induced by intramuscular (i.m.) and intradermal (i.d.) KETc7 DNA vaccination (Rosas et al., 1998; Cruz-Revilla et al., 2000). The absence of a specific immune response in DNA intrahepatically vaccinated mice with an antigen that proved to be

immunogenic when administered i.m. or i.d., implies a tightly controlled mechanism underlying this phenomenon. This can be explained by the presentation of this peptide by liver sinusoidal endothelial cells (LSECs) that have been proved to induce T-cell tolerance to antigens (Knolle and Limmer, 2001). LSECs contribute to the control of the immune response against circulating antigens, and are fundamental to induce antigen tolerance in the liver (Knolle and Limmer, 2001).

In contrast, pGEM 11Zf(+) immunization triggers in vivo lymphocyte proliferation which remains exacerbated a few days after in vitro culture. After being killed, a significantly higher number of spleen cells were recovered immediately from immunized mice with only pGEM 11Zf(+) ($7.2 \times 10^7 \pm 8 \times 10^6$) as compared with naïve mice ($5.2 \times 10^7 \pm 7 \times 10^6$, $P < 0.004$). After 3 days of in vitro culture in supplemented RPMI 1640 media, a low but significant increased proliferative response ($x = 2,560$ cpm) was detected in the spleen of mice immunized with pGEM 11Zf(+) ($P < 0.05$) compared with other groups without any stimuli (< 500 cpm). In addition, in mice immunized with pGEM 11Zf(+) alone, a significant increase of the INF- γ / β -actin ratio (Ulett et al., 2000) was detected in the liver (Fig. 2), pointing to an exacerbated non-specific immune response ($P < 0.05$).

Considering the high CpG content in pGEM 11Zf(+), it is possible that these motifs activate lymphocytes, Kupffer and dendritic cells through TLR9, enhancing an inflammatory response (Knolle and Limmer, 2003). This possibility is sustained by the increased non-specific immunity observed in pGEM 11Zf(+)-immunized mice, in particular, the increased expression of INF- γ that may be related to the CpG content in the plasmid used for intrahepatic injection. Activation of scavenger liver endothelial cells by unmethylated CpG motifs may initiate an inflammatory response that could control cysticercus establishment (Sun et al., 2005). This possibility is also supported by the increased resistance against murine cysticercosis induced by i.d. or i.m. DNA immunization with pcDNA3, possibly also mediated by CpG sequences (Rosas et al., 1998). Another point of special interest is that albeit the recently reported immunotoxic or

hepatotoxic side effects after repeated CpG oligodeoxynucleotide administration (Heikenwalder et al., 2005), no morphological changes compatible with this possibility were distinguished in the liver of mice intrahepatically vaccinated with DNA (data not shown).

The vast protective variation induced by intrahepatic DNA vaccination merits special comments. As Table I shows, some mice were totally protected, while others were partially or not protected at all. To explore the reasons that underlie these differences, immunohistochemical analyses were performed using the liver of mice killed after infection. KETc7 expression was used as gene reporter to determine the efficacy of the in vivo transfection, or transcription after intrahepatic DNA vaccination, or both. The lowest number of cells expressing KETc7 was found to be in livers from mice exhibiting the highest number of parasites. Thus, it seems that higher KETc7 expression level is related with higher protection induced by intrahepatic DNA vaccination. The different levels of protection among mice could be due to variations in the transfection rate. Differences in the efficacy of transfection could also explain the high variability in the protection induced by the plasmid itself.

In conclusion, in this study we show that intrahepatic DNA vaccination can induce high levels of protection mediated by an enhanced non-specific immunity with increased in situ levels of the inflammatory INF- γ cytokine, probably induced by CpG sequences. In addition, results shown herein point to the existence of important differences in the local induction of immune tolerance between non-specific and specific immunity, a finding that could contribute to the scarcely understood immunomodulator role of the liver.

We thank Gerardo Arrellin, Georgina Díaz, Mercedes Baca, Valentin Mendoza and Verónica Rodríguez for technical support. Isabel Pérez Montfort corrected the English version of the manuscript. The authors also thank Dr. R.W. Hanson for providing plasmid p7218R (PEPCK promoter). This study was supported by the Dirección General de Asuntos de Personal Académico DGAPA (IN213102; IN221905), CONACYT (U45377-M) and the Howard Hughes Medical Institute (55000643).

LITERATURE CITED

- Cruz-Revilla, C., G. Rosas, G. Fragoso, F. López-Casillas, A. Toledo, C. Larralde, and E. Sciutto. 2000. *Taenia crassiceps* cysticercosis: protective effect and immune response elicited by DNA immunization. *Journal of Parasitology* **86**: 67-74.
- Glenting, J., and S. Wessels. 2005. Ensuring safety of DNA vaccines. *Microbial Cell Factory* **4**: 26.
- Hanson, R. W., and L. Reshef. 1997. Regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene expression. *Annual Review of Biochemistry* **66**: 581-611.
- Heikenwalder, M., M. Polymenidou, T. Junt, C. Sigurdson, H. Wagner, S. Akira, R. Zinkernagel, and A. Aguzzi. 2004. Lymphoid follicle destruction and immunosuppression after repeated CpG oligodeoxynucleotide administration. *Nature Medicine* **10**: 187-192.
- Klinman, D. M., F. Takeshita, S. Kamstrup, S. Takeshita, K. Ishii, M. Ichino, and H. Yamada. 2000. DNA vaccine: capacity to induce auto-immunity and tolerance. *Developmental Biology* **104**: 45-51.
- Knolle, P. A., and A. Limmer. 2001. Neighborhood politics: the immunoregulatory function of organ-resident liver endothelial cells. *Trends in Immunology* **22**: 241-242.
- _____, and _____. 2003. Control of immune response by scavenger liver endothelial cells. *Swiss Medical Weekly* **133**: 501-506.
- Manoj, S., L. A. Babiuk, and S. Van Drunen Littel-van den Hurk. 2004. Approaches to enhance the efficacy of DNA vaccines. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* **41**: 1-39.
- Manoutcharian, K., G. Rosas, M. Hernandez, 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.
- Perales, J. C., T. Ferkol, H. Beegen, O. D. Ratnoff, and R. W. Hanson. 1994. Gene transfer in vivo: sustained expression and regulation of genes introduced into the liver by receptor-targeted uptake. *Proceedings of National Academy of Sciences USA* **91**: 4086-4090.

Rosas, G., C. Cruz-Revilla, G. Frago, F. López-Casillas, A. Pérez, M. A. Bonilla, R. Rosales, and E. Sciutto. 1998. *Taenia crassiceps* cysticercosis: humoral immune response and protection elicited by DNA immunization. *Journal of Parasitology* **84**: 516-523.

Sun, C. M., E. Deriaud, C. Leclerc, and R. Lo-Man. 2005. Upon TLR9 signaling, CD5+ B cells control the IL-12-dependent Th1-priming capacity of neonatal DCs. *Immunity* **22**: 467-477.

Ulett, G. C., N. Ketheesan, and R. G. Hirst. 2000. Cytokine gene expression in innately susceptible BALB/c mice and relatively resistant C57BL/6 mice during infection with virulent *Burkholderia pseudomallei*. *Infection and Immunity* **68**: 2034-2042.

Wolff, J. A., R. W. Malone, P. Williams, W. Chong, G. Acsadi, A. Jani, and P. A. Felgner. 1990. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* **247**: 1465-1466.

FIGURE 1. BALB/cAnN female mice were intrahepatically DNA-vaccinated with pPc-sp7 and pGEM 11Zf (+) killed 1 wk later. **(A)** KETc7 transcription was detected by Northern blot in two pPc-sp7 immunized mice only when starved 40 hr after DNA vaccination. **(B)** The expression of KETc7 in the liver of pGEM 11Zf (+) and pPc-sp7 intrahepatically immunized mice. Sections were incubated with pooled sera from non-infected and *T. crassiceps*-infected mice. Arrows show cells expressing KETc-7.

FIGURE 2. Cytokine mRNA expression in the liver of mice, 8 wk after pGEM 11Zf (+), pPc-sp7, or pTc-sp7 intrahepatic immunization. RNA was subjected to reverse transcription and amplified by PCR using primers specific for each cytokine previously reported (Ulett et al., 2000). The PCR products were visualized by staining the gel with ethidium bromide on 1.5% agarose gel electrophoresis. The relative expression of cytokines is presented as the ratio of each studied gene relative to the expression in the same preparation of the β -actin gene, a constitutively expressed gene used as internal control. The relative amount of each cytokine mRNA in each

sample was calculated as the ratio of cytokine/ β -actin measured by densitometry. *Indicates significant differences between the vaccinated and naïve groups ($P < 0.05$, Kruskal-Wallis Test).

Table 1. Protective immunity against murine cysticercosis by DNA intrahepatic immunization

	# of cysticerci per mouse	Parasite intensity	Mice totally protected (%)	CpG motifs/Kb (%)
Naive	296,299, 370, 483, 571,781 ^a	426.5 (264.4-663.8)*		-
Immunized with:				
pGEM 11Zf(+)	0, 0, 0, 4, 281 ^b	0 (-98.5-212.5)	60	0.94
pPc-sp7	0, 0, 0, 327, 486, 554 ^{ab}	163.5 (-45.3-500.9)	50	0.75
pTc-sp7	0, 0, 0, 2, 4, 331, 429 ^b	2 (-63.5-282.3)	42.8	0.50

*Median (95% confidence interval). The % of CpG motifs/Kb was calculated by percent of motifs GACpGTT or AACpGTT /Kb of each plasmid. Superscript letters indicate significant differences between experimental groups (Mann-Whitney Test). Statistical analyses were performed by the InStat Software Program (GraphPad, San Diego, California).

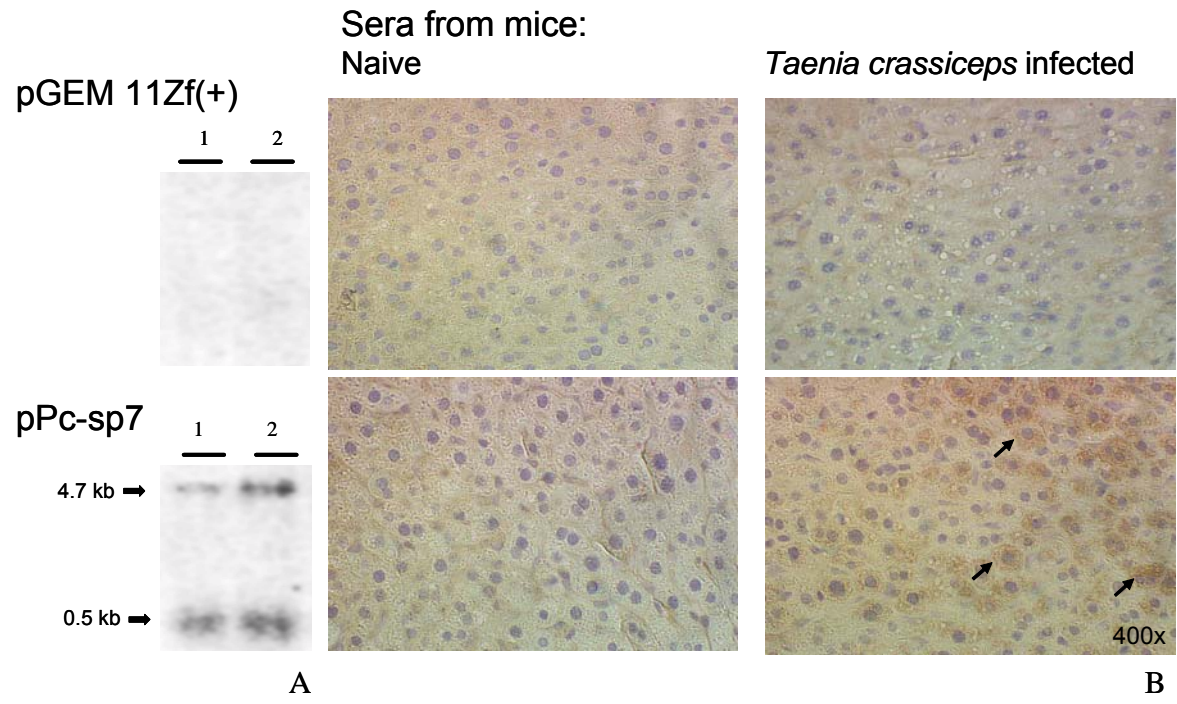


Figure 1

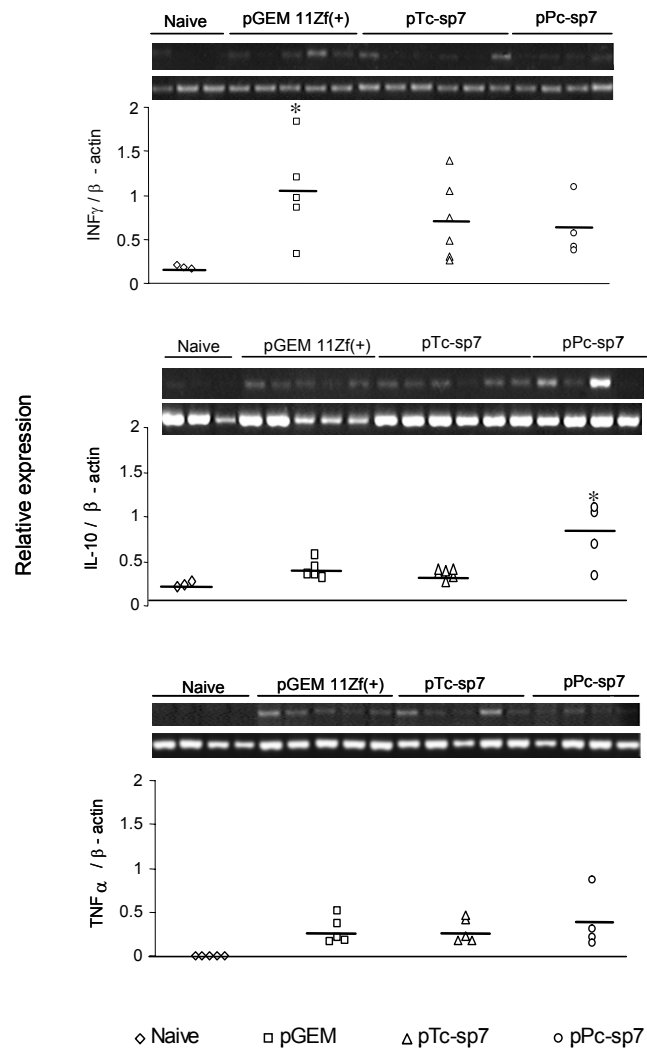


Figure 2

Date: 2006-03-06 15:01:33
Last Sent: 2006-03-06 15:01:33
Triggered By: Vickie Hennings

BCC: Redacted
Subject: ManuscriptGE-779R1 Decision Letter
Message:

Dear Edda,

I am pleased to inform you that your manuscript "EFFECTIVE PROTECTION AGAINST EXPERIMENTAL TAENIA SOLIUM TAPEWORM INFECTION IN HAMSTERS BY PRIMO-INFECTION AND BY VACCINATION WITH RECOMBINANT OR SYNTHETIC HETEROLOGOUS ANTIGENS" has been accepted for publication in the Journal of Parasitology. Your manuscript will appear in the next available issue.

My regards to Carlos.

Please take the time to carefully look at your Article File and make certain that this is the correct version of your manuscript. If you should notice any typographical errors/changes that need to be made then email them to us, and Vickie will try to incorporate them before officially sending to Allen Press for publication.

Thank you for your contribution to our Journal. If you have any questions, feel free to contact me.

Sincerely,

Jerry

Dr. Gerald W. Esch
Editor, Journal of Parasitology
Department of Biology
Wake Forest University
P.O. Box 7629
Winston-Salem, NC 27109
Phone: (336) 758-4487
Fax: (336) 758-6008
E-mail: esch@wfu.edu

Running Head: RESEARCH NOTE

EFFECTIVE PROTECTION AGAINST EXPERIMENTAL TAENIA SOLIUM TAPEWORM INFECTION IN HAMSTERS BY PRIMO-INFECTION AND BY VACCINATION WITH RECOMBINANT OR SYNTHETIC HETEROLOGOUS ANTIGENS

C. Cruz-Revilla, A. Toledo, G. Rosas*, M. Huerta†, I. Flores-Perez‡, N. Peña§, J. Morales§, J. Cisneros-Quiñones, G. Meneses, A. Díaz-Orea||, N. Anciant#, F. A. Goldbaum#, A. Aluja§, C. Larralde, G. Fragoso, and E. Sciutto. Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, A.P. 70228, México D.F. C.P. 04510; México; *Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, Morelos, México; †Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de Puebla, México; ‡Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, México; §Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, México; || Centro de Investigación Biomédica de Oriente, Instituto Mexicano del Seguro Social, Puebla, México; # Fundación Instituto Leloir, CONICET, Buenos Aires, Argentina. e-mail: edda@servidor.unam.mx

ABSTRACT: The disease caused by *Taenia solium* is progressively being recognized as a growing global threat for public human health and pig husbandry that requires the development of effective control measures. A central participant in the taeniasis/cysticercosis transmission network is the human carrier of the adult tapeworm because of his great potential in spreading the infection. Herein, evidence is presented that a primary infection of golden hamsters with orally administered *T. solium* cysticerci improved the host's resistance against a secondary infection. Likewise, previous vaccination increased the hamster's resistance. Similar high levels of protection (>78%) were induced by systemic or oral vaccination with the S3Pvac anticysticercosis synthetic peptide vaccine or the highly immunogenic recombinant chimera based on the protective peptide KETc1 bound to *Brucella* spp lumazine synthase (BLS-KETc1). Increased resistance following primo-infection and vaccination possibly results from changes in the immune conditions prevailing in the host's intestine. The contribution to

protection from the KETc1 and BLS epitopes in a chimeric vaccine is under study. Preventive vaccination of definitive hosts of *T. solium* against the tapeworm, the most relevant step in the taeniasis/cysticercosis transmission, may greatly impact the dynamics of endemic disease and has not been studied or tried before.

The metacestode stage of several cestodes, e.g., *Taenia solium*, *Taenia saginata*, *Taenia multiceps*, *Taenia crassiceps* and *Echinococcus granulosus*, lodges within the tissues (brain, muscle, heart, liver, lungs, etc.) of their intermediate hosts, e.g., pigs, cattle, sheep, rodents and goats, causing a condition called cysticercosis which causes great damage to animal husbandry throughout the world and threatens human health, most importantly in developing countries (Tanowitz et al., 2001). Controlling the transmission of *Taenia solium* is a subject of growing global concern and debate (Pawlowski et al., 2005) and has prompted the development of numerous technologies aimed at their diagnosis, treatment, and prevention (Sciutto et al., 2003). A few vaccines have been developed to protect the intermediate hosts with the aim of interrupting transmission (Huerta et al., 2001; Flisser et al., 2004; Manoutcharian et al., 2004). However, only in one (S3Pvac), has its efficiency and suitability been assessed in the field against natural *T. solium* pigs cysticercosis, and sustained and simultaneous additional control measures were found to be necessary to interrupt established transmission cycles. A key factor in the transmission of *T. solium* cysticercosis is the tapeworm carrier, a single one of which may spread millions of the parasite eggs, each with the potential of developing into a cysticercus upon ingestion by suitable intermediate hosts (Gemmell and Johnstone, 1977).

In spite of the relevance of intestinal taeniasis in the dynamics of transmission, there are few publications related to vaccination against the adult tapeworm stage of several cestodes (Andreassen, 1991), but not a single one for *T. solium*. Although there is no factual evidence for effective immunity against adult tapeworms in humans, hints that it may occur derive from: 1) the scarcity of tapeworm carriers amongst hundreds or thousands of intermediate hosts, in highly endemic conditions may in part result from differential effective immunity favoring tapeworm

cysticerci (Martinez-Maya et al., 2003); 2) the extremely specific host-parasite relationships of *T. solium* and humans is suggestive of the stringency of immune recognition; 3) the breaching of host specificity in the golden hamster-*T. solium* case by pharmacological immunodepression is a more direct sign of immune involvement (Verster et al., 1971); 4) the crippling in vitro effect of antibodies upon the ability of cysticerci to transform into tapeworms in immunodepressed hamsters (Garcia et al., 2001).

Niclosamide, praziquantel, and albendazol are variably effective against several helminths, including *T. solium*, and are the drugs most widely used in mass treatments (Tanowitz et al., 2001; Jeri et al., 2004). However, even if a highly effective treatment against taeniasis is developed, prevention of the establishment of adult tapeworms is the best approach because it may greatly curtail the spreading of millions of eggs, thereby preventing the development of cysticercosis in intermediate hosts.

Thus, we decided to explore the effect of vaccination against the adult tapeworm stage of *T. solium*. We used the golden-hamster model developed by Gnezdilov (1957), which has proved to be useful in a number of laboratories to study the early stages of cysticercus development into adult parasites (Verster, 1971; Merchant et al., 1998). It is important to mention that cysticerci collected from different pigs differ in their ability to develop into tapeworms (Garcia et al., 2001). This problem was minimized by selecting those experiments in which hamsters were infected with cysticerci, for which parallel cysticerci collected from the same pig showed more than 90% in vitro evagination after 24 hr of preincubation in 10% pig bile in RPMI 1640 solution at 37 C. Also, a group of hamsters treated with saline (control group) was included in each infection experiment to verify the cysticercus transformation capacity.

To determine the most convenient time conditions to assess the vaccine's effects against taeniasis, 15 male and 15 female, 6 to 8-wk-old not immuno-suppressed hamsters were orally challenged with 6 cysticerci; all larvae used for the challenge were collected from a single naturally infected pig. Five of these males and 5 females were killed with CO₂ at 2, 3 and 4 wk

post-exposure (P-E), and the number of tapeworms in each hamster's intestine was counted. The intestine was excised in its entirety and longitudinally opened with a pair of blunt-ended dissecting scissors. All recovered parasites were confirmed under a stereoscopic microscope. As shown in Figure 1, similar numbers of tapeworms were recovered from females and males at 14 days P-E. Afterwards, the number of tapeworms significantly declined in male, but not in female, hamsters, i.e., 7 of 10 males had no parasites, while all of the females were infected ($P=0.03$). This is the first evidence of sexual dimorphism in the control of the intestinal *T. solium* tapeworm. Factors involved in this sexual dimorphism are presently under study. In all the following experiments the effect of the vaccine upon parasite load was assessed only in immunocompetent female hamsters.

We then attempted to determine if the acquisition of immunity to experimental taeniasis by a first infection could prevent a second infection. Table I show results obtained after infection of 21 female hamsters. Seven hamsters (group 1) were challenged with cysticerci from a naturally infected pig, killed 16 days later, and the effectiveness of the first infection was confirmed. Thus, only 1 hamster had no tapeworms, while the rest carried 2-6 tapeworms each (3.1 ± 1.9). Of the other 14 hamsters, half of them (group 2) were treated with niclosamide and infected 10 days later with 6 cysticerci each. The remaining 7 hamsters (group 3) were first infected and then orally treated at day 10 P-E and again exposed 10 days later with cysticerci from another naturally infected pig. A significantly lower number of tapeworms than that expected in the absence of primo-infection were recovered ($P=0.05$).

The protective effect of primo-infection shown here in immunocompetent hamsters against subsequent experimental taeniasis points to the possibility of naturally acquired immunity against the intestinal tapeworm of *T. solium*, and raises hopes of developing an effective vaccine.

Along with other factors (i.e., differences in pig and human susceptibility), naturally acquired immunity against taeniasis may contribute to the numeric disparity between the abundance of

cysticercotic pigs and the scarcity of adult tapeworm carriers in highly endemic rural conditions (Fleury et al., 2003). This disparity would result if the transition of egg to cysticercus in the tissues is less vulnerable to the host's immune attacks than the cysticercus to tapeworm transition in intestinal lumen. The long-time residence of tissue cysticerci and their resistance to immune attack after their establishment are well recognized (Sciutto et al., 2003), but much less is known about intestinal immunity in taeniasis. The notion of acquired stage-differential natural immunity in *T. solium* disease is consistent with the 90% antigen-specific cell proliferation response coexisting with 10% of positive CT scans and an extreme rarity of tapeworm carriers in the inhabitants of highly endemic rural areas of Mexico (Chavarria et al., 2003). We are unaware of any evidence in humans suggesting natural immunity to a secondary exposure to viable cysticerci, i.e., decreased likelihood of reinfection in treated and cured human cysticercosis than in the unexposed population, an important but difficult event to ascertain. Studies are under way to determine the role of systemic and local immunity in the protective effect of primo-infection. Two different vaccines were tested in the taeniasis-hamster model. One was the field-trial tested S3Pvac anti-pig-cysticercosis synthetic vaccine (Huerta et al., 2001), which includes 3 peptides (GK-1, KETc1 and KETc12) originally derived from a *Taenia crassiceps* cysticerci cDNA library, which are present in the 3 different stages of the parasite, i.e., adult tapeworm, egg, and cysticercus, and are shared by *T. solium*. The other vaccine was the highly immunogenic recombinant BLS-KETc1 chimera, based on KETc1 expressed as a recombinant protein bound to the polymeric lumazine synthase from *Brucella* spp. (BLS) (Sciutto et al., 2005). These immunogens were evaluated considering that they are present in different structures of the *T. solium* tapeworm, including its tegument, thus making it possible to induce specific immunity against this parasite stage (Sciutto et al., 2003).

Table II (Experiment #1) shows the protection induced by simultaneous immunization with S3Pvac (subcutaneously administered, sc) and/or BLS-KETc1 (orally applied, oral) against experimental tapeworm infection. As a control, a group of identically infected hamsters was

treated 10 days after challenge with niclosamide to compare the relative potency of the vaccines against conventionally effective anti-helminthic drug. The data show that immunization with a combination of both vaccines, BLS-KETc1 oral, and followed by a sc booster of S3Pvac, induced total protection, just as niclosamide did.

To examine the effectiveness of the oral BLS-KETc1 versus the sc S3Pvac, an additional experiment was performed. Table II (Experiment # 2) shows a significant difference in the Odds Ratio (OR=6.2, P=0.015; OR, a statistic that compares differences in the risk of an event between two different groups by their quotient; Bland, 2000) of totally resistant hamsters between the control groups (1/13) and those vaccinated (12/25) in favor of hamsters that were vaccinated. Table II (Experiment #2) also shows that a single dose (groups 3 and 4) of each vaccine, S3Pvac (sc) or BLS-KETc1 (oral), significantly reduced the parasite loads from the numbers observed in the respective controls, as well as with the combined vaccines (group 1 and 2). That there is no significant difference in parasite loads between groups 1 and 2, which differ in time interval between vaccine and challenge, shows that the protective effects of vaccination last for 14 days. Since both vaccines appear to be equally effective, the orally administered needle-free version (BLS-KETc1) would be preferable because it avoids costly logistic problems to make the vaccine suitable for mass immunization and is also more acceptable because it is less invasive.

Our results show that the development of adult *T. solium* may be prevented by vaccination and may lead to the design of a potent tool to add in the control programs against taeniasis/cysticercosis transmission. In addition, successful vaccination against tapeworm infection may be an important contribution in the prevention of other cestodiasis. Indeed, the induction of effective immunity is well documented in rodent experimental hymenolepid infections, but the prospects inducing effective immunity against *Echinococcus* spp seem less promising (Andreassen, 1991). Perhaps the limited and varied success in doing so could be

overcome by using more potent antigens, alternative immunization routes, or new antigen delivery systems.

The authors thank Gerardo Arrellín, Georgina Díaz Herrera, Beatriz Hernández, Marisela Hernández, and Mercedes Baca for technical support. This investigation was partially supported by the International Center for Genetic Engineering and Biotechnology (CRP/Mex02-01), the Howard Hughes Medical Institute (55004134), CONACyT (SALUD-2004-0140), Dirección General de Personal Académico DGAPA, UNAM (IN-221905), PROMEP-UAEMOR-PTC-87 (103.5/03/2530).

LITERATURE CITED

Andreassen, J. 1991. Immunity to adult cestodes: basic knowledge and vaccination problems. *Parassitologia* 33: 45-53.

Chavarria, A., B. Roger, G. Fragoso, G. Tapia, A. Fleury, M. Dumas, A. Dessein, A. Fleury, T. Gomez, I. Alvarez, D. Meza, M. Huerta, A. Chavarria, R.A. Carrillo Mezo, C. Lloyd, A. Dessein, P.M. Preux, M. Dumas, C. Larralde, E. Sciutto, and G. Fragoso. 2003. High prevalence of calcified silent neurocysticercosis in a rural village of Mexico. *Neuroepidemiology* 22: 139-145.

Flisser, A., C. G. Gauci, A. Zoli, J. Martinez-Ocana, A. Garza-Rodriguez, J.L. Dominguez-Alpizar, P. Maravilla, R. Rodriguez-Canul, G. Avila, L. Aguilar-Vega, C. Kyngdon, S. Geerts, and M.W. Lightowlers. 2004. Induction of protection against porcine cysticercosis by vaccination with recombinant oncosphere antigens. *Infection and Immunity* 72: 5292-5297.

Garcia, G., E. Sciutto, G. Fragoso, C. Cruz-Revilla, A. Toledo, N. Villalobos, I. Flores, A. Aluja, M.V. Jose, and C. Larralde. 2001. Inhibitory role of antibodies in the development of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* toward reproductive and pathogenic stages. *Journal of Parasitology* 87: 582-586.

Gemmell, M.A., and P.D. Johnstone. 1977. Experimental epidemiology in hydatidosis and cysticercosis. *Advances in Parasitology* 15: 311-369.

Gnezdilov, V.G. 1957. The golden hamster (*Mesocricetus auratus* Waterhouse) as a potential definitive host of the tapeworm *Taenia solium*. *Zoologicheski Zh* 36: 1770-1773.

Huerta, M., A.S. de Aluja, G. Fragoso, A. Toledo, N. Villalobos, M. Hernandez, G. Gevorkian, G. Acero, A. Diaz, I. Alvarez, R. Avila, C. Beltran, G. Garcia, J.J. Martinez, C. Larralde, and E. Sciutto. 2001. Synthetic peptide vaccine against *Taenia solium* pig cysticercosis: successful vaccination in a controlled field trial in rural Mexico. *Vaccine* 20: 262-266.

Jeri C., R.H. Gilman, A.G. Lescano, H. Mayta, M.E. Ramirez, A.E. Gonzalez, R. Nazerali, and H.H. Garcia. 2004. Species identification after treatment for human taeniasis. *Lancet* 20: 949-950.

Martinez-Maya J.J., A.S. de Aluja, G. Avila-Ramirez, L. Aguilar-Vega, A. Plancarte-Crespo, and C.J. Jaramillo-Arango. 2003. Taeniasis and detection of antibodies against cysticercus among inhabitants of a rural community in Guerrero State, Mexico. *Salud Pública México* 45: 84-89.

Manoutcharian, K., A. Diaz-Orea, G. Gevorkian, G. Fragoso, G. Acero, E. Gonzalez, A. De Aluja, N. Villalobos, E. Gomez-Conde, and E. Sciutto. 2004. Recombinant bacteriophage-based multiepitope vaccine against *Taenia solium* pig cysticercosis. *Veterinary Immunology Immunopathology* 99: 11-24.

Merchant, M.T., L. Aguilar, G. Avila, L. Robert, A. Flisser, and K. Willms. 1998. *Taenia solium*: description of the intestinal implantation sites in experimental hamster infections. *Journal of Parasitology* 84: 681-5.

Pawlowski, Z., J. Allan, and E. Sarti. 2005. Control of *Taenia solium* taeniasis/cysticercosis: From research towards implementation. *International Journal for Parasitology* 35: 1221-1232.

Sciutto, E., G. Fragoso, A. Fleury, A. Chavarría, R. Vega, O. Yáñez, S. A. de Aluja, and C. Larralde. 2003. *Taenia solium* cysticercosis of humans and pigs: A review of our contributions and perspectives in the research of its complexities. In *Recent Research Developments. Infection and Immunity*, Vol 1 part II. Transworld Research Network, Kerala, India, p. 475-497.

Sciutto, E., A. Toledo, C. Cruz, G. Rosas, G. Meneses, D. Laplagne, N. Ainciart, J. Cervantes, G. Fragoso, and F. A. Goldbaum. 2005. Brucella spp. lumazine synthase: a novel antigen delivery system. *Vaccine* 23: 2784-2790.

Tanowitz, H.B., L. M. Weiss, and M. Wittner. 2001. Tapeworms. *Current Infectious Disease Reports* 3: 77-84.

Verster, A. 1971. Preliminary report on the golden hamster as a definitive host of *Taenia solium* Linnaeus, 1758 and *Taenia saginata* Goeze, 1782. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research* 38: 63-64.

FIGURE 1. Individual number of tapeworms recovered from the intestine of golden hamsters at different times after infection with 6 *Taenia solium* cysticerci each. Bars represent the mean number of tapeworms per group.

Table I. Experimental primo-infection by *Taenia solium* tapeworm confers protection against a subsequent challenge

Number of group	Treatment:	Number of tapeworm (mean ± SD)
1	Infection + ISS	[†] 3, 2, 3, 5, 0, 6, 3 3.1 ± 1.9
2	Niclosamide + Infection	2, 0, 4, 6, 2, 1, 3 2.6 ± 1.9
3	1 st infection + Niclosamide + 2 nd Infection	0, 2, 0, 0, 1, 2, 1* 0.8 ± 0.8

[†]Number of tapeworms recovered per hamster 16 days after challenged with 6 cysticerci each.

Hamsters of group 1 were orally infected and sacrificed 16 days afterwards. Hamsters of group 2 were treated with niclosamide (chlorosalicylamide, Overoid, 250 mg/500 µl ISS per hamster) and infected 10 days later. Hamsters of group 3 were first infected, and then treated with niclosamide (as above). Tenth days later they were re-infected and sacrificed 16 days afterward. *Significantly different from group 2 (P=0.05, one-way ANOVA test).

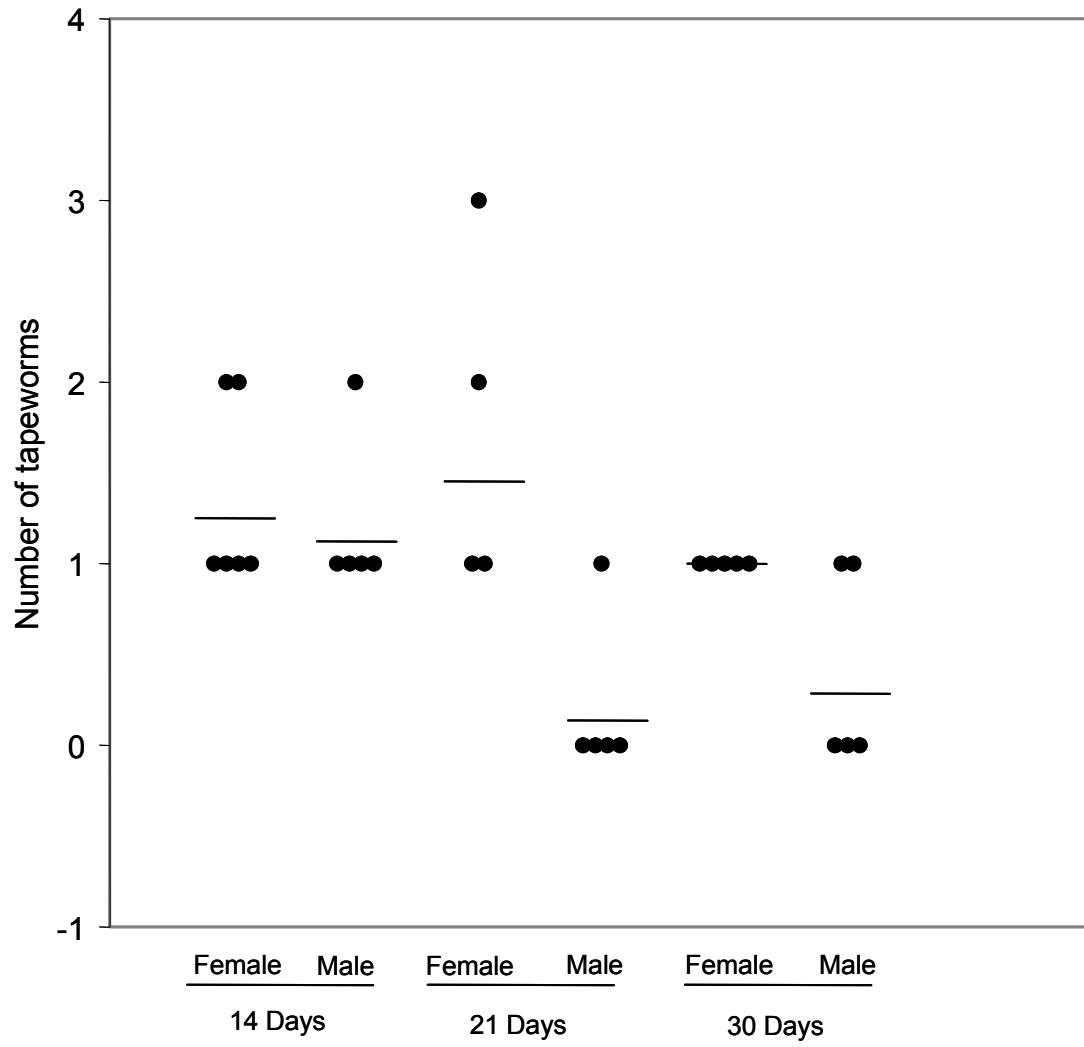
Table II. Vaccination effectively protect against *Taenia solium* tapeworm infection

Experiment #1		
Saline	†6, 6, 5, 1, 2, 2	‡3.7 ± 2.3 ^a
Niclosamide	0, 0, 0, 0, 0, 0, 0	0 ^b
BLS-KETc1/S3Pvac	0, 0, 0, 0, 0, 0, 0	0 ^b
Experiment #2		
Saline	†6, 6, 4, 1, 2, 0, 5	3.4 ± 2.4 ^a
Saponine	5, 3, 4, 6, 3, 6	4.5 ± 1.4 ^a
1: BLS-KETc1/S3Pvac	2, 0, 2, 0, 1, 0, 0	0.7 ± 0.9 ^b
2: BLS-KETc1/S3Pvac	2, 2, 0, 2, 1, 1	1.3 ± 0.8 ^b
3: S3Pvac/Saline	1, 4, 0, 0, 0, 1	1.0 ± 1.5 ^b
4: BLS-KETc1/Saline	0, 0, 0, 2, 0, 1	0.5 ± 0.8 ^b

†Individual number of recovered tapeworms per hamster 2-wk after challenged with 6 cysticerci each. ‡Mean ± SD. Different literals indicate significant differences between groups ($P < 0.05$, Dunn's Multiple Comparison Test).

In Experiment #1, hamsters were orally immunized with BLS-KETc1 (50 ug/200 ul per hamster) and 6 days later received a sc booster of S3Pvac (15 ug/hamster of each peptide plus 50 ug of saponine/100 ul ISS). All hamsters were orally challenged 5 days after the last immunization. A group of hamsters treated 10 days after challenge with niclosamide was included as ways of comparing a conventional effective treatment drug with the effects of the vaccines.

In Experiment #2, the relevance of oral and sc immunization was studied. Group 1 and 2: immunized with BLS-KETc1 plus S3Pvac 6 days later and challenged 4 or 14 days after the last immunization respectively. Groups 3 and 4: sc immunized with S3Pvac once or orally with BLS-KETc1 and challenge 10 days later. Controls were injected with saline or saponine alone at the respective times. All hamsters were challenged with cysticerci from the same naturally infected pig.



14. BIBLIOGRAFÍA

- Allan JC, Velasquez-Tohom M, Fletes C, Torres-Alvarez R, Lopez-Virula G, Yurrita P, Soto de Alfaro H, Rivera A, Garcia-Noval J. Mass chemotherapy for intestinal *Taenia solium* infection: effect on prevalence in humans and pigs. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1997; 91(5):595-8.
- Aluja A. 1982. Frequency of porcine cysticercosis in Mexico. In: *Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives.* Flisser, A., Willms, K., Lacleste, J. P., Larralde, C., Ridaura, C. and F. Beltrán, (eds). Academic Press, New York, p. 53-62.
- 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.
- Anderson R.M. and R.M. May. 1985. Herd immunity to helminth infection and implications for parasite control. *Nature.* 315(6019):493-6.
- Andreassen, J. 1991. Immunity to adult cestodes: basic knowledge and vaccination problems. A review. *Parassitologia.* 33(1):45-53.
- Andreassen J. and C.A. Hopkins. 1980. Immunologically mediated rejection of *Hymenolepis diminuta* by its normal host, the rat. *J Parasitol* 66(6):898-903.
- Avila G., Aguilar L., Benitez S., Yopez-Mulia L., Lavenat I., and A. Flisser. 2002. Inflammatory responses in the intestinal mucosa of gerbils and hamsters experimentally infected with the adult stage of *Taenia solium*. *Int J Parasitol* 32 (10):1301-8.
- Avila G., Benitez M., Aguilar-Vega L. and A. Flisser. 2003. Kinetics of *Taenia solium* antibodies and antigens in experimental taeniosis. *Parasitol Res.* 89(4):284-9.
- Baldi P.C., Velikovsky C.A., Braden B.C., Giambartolomei G.H., Fossati C.A. and F.A. Goldbaum. 2000. Structural, functional and immunological studies on a polymeric bacterial protein. *Braz J Med Biol Res.* 33(7):741-7.
- Barry M. A., Barry M. E. and S. A. Johnston. 1994. Production of monoclonal antibodies by genetic immunization. *BioTechniques* 16(4): 616-620.
- Bertolino P., McCaughan G. W. and D. Bowen. 2002. Role of primary intrahepatic T-cell activation in the liver tolerance effect. *Immunology and Cell Biology* 80: 84-92.

- Broide D., Schwarze J., Tighe H., Gifford T., Nguyen M. D., Malek S., Van Uden J., Martin-Orozco E., Gelfand E. W. and E. Raz. 1998. Immunostimulatory DNA sequences inhibit IL-5, eosinophilic inflammation, and airway hyperresponsiveness in mice. *J Immunol* 161(12): 7054-7062.
- Chavarria A.,P, Villarejos V.M. and R. Zeledon. 1977. Mebendazole in the treatment of *Taeniasis solium* and *Taeniasis saginata*. *Am J Trop Med Hyg.* 26(1):118-20.
- Chavarria A., Roger B., Fragoso G., Tapia G., Fleury A., Dumas M., Dessein A., Larralde C. and E. Sciutto. 2003. TH2 profile in asymptomatic *Taenia solium* human neurocysticercosis. *Microbes Infect.* 5(12):1109-15.
- Cruz M., Davis A., Dixon H., Pawlowski Z.S. and J. Proano. 1989. Operational studies on the control of *Taenia solium* taeniasis/cysticercosis in Ecuador. *Bull World Health Organ.* 67(4):401-7. Erratum in: *Bull World Health Organ* 67(6):757.
- Cruz-Revilla C., Rosas G., Fragoso G., López-Casillas F., Toledo A., Larralde C. and A. Sciutto. 2000. *Taenia crassiceps* cysticercosis: protective effect and immune response elicited by DNA immunization. *J. Parasitol.* 86(1): 67-74.
- Cruz-Revilla C. Toledo A., Rosas G., Huerta M., Flores-Perez I., Peña N., Morales J., Cisneros-Quiñones J., Meneses G., Díaz-Orea A, Anciant N., Goldbaum F. A., Aluja A., Larralde C., Fragoso G. and E. Sciutto. 2006. Effective protection against experimental *Taenia solium* tapeworm infection in hamsters by primo-infection and by vaccination with recombinant or synthetic heterologous antigens. *Journal of Parasitology.* En prensa.
- Coil, W. H. 1991. *Microscopic Anatomy of Invertebrates, Vol 3: Platyhelminthes and Nemertinea.* Frederick W. Harrison Editors, p 211-283.
- Dorais F. J. and G. W. Esch. 1969. Growth rates of two *Taenia crassiceps* strains. *Experimental Parasitology,* 25: 395-398.
- Davis H. L., Michel M. L. and R. G. Whalen. 1993. DNA-based immunization induces continuous secretion of hepatitis B surface antigen and high level of circulating antibody. *Hum Mol Genet* 2: 1847-1851.
- Davis H. L., Michel M. L. and R. G. Whalen. 1995. Use of plasmid DNA for direct gene transfer and immunization. *Ann N Y Acad Sci* 772: 21-29.
- Davis H. L., Mancini M., Michel M. L. and R. G. Whalen. 1996. DNA-mediated

immunization to hepatitis B surface antigen: longevity of primary response and effect of boost. *Vaccine* 14(5): 910-915.

- Deck R. R., DeWitt C. M., Donnelly J. J., Liu M. A. and J. B. Ulmer. 1997. Characterization of humoral immune responses induced by influenza hemagglutinin DNA vaccine. *Vaccine* 15(1): 71-78.
- Del Brutto O. H. and J. Sotelo. 1988. Neurocysticercosis: an update. *Rev Infect Dis* 10: 1075-1087.
- Del Brutto O.H. 2000. Cysticercosis of the cerebellopontine angle: treatment with single-dose praziquantel. *Rev Neurol*. Nov 1-15; 31(9):835-7.
- Del Brutto, O.H., Rajshekhar, V., White, A.C., Tsang, V.C., Nash TE, Takayanagui OM, Schantz PM, Evans CA, Flisser A, Correa D, Botero D, Allan JC, Sarti E, Gonzalez AE, Gilman RH, Garcia HH. 2001. Proposed diagnostic criteria for neurocysticercosis. *Neurology*. 24; 57(2):177-83.
- Diaz Camacho S. P., Candil Ruiz A., Suate Peraza V., Zazueta Ramos M.L., Felix Medina M., Lozano R. and K. Willms. 1991. Epidemiologic study and control of *Taenia solium* infections with praziquantel in a rural village of Mexico. *Am J Trop Med Hyg*. 45(4):522-31.
- Diaz M.A., Villalobos N., de Aluja A., Rosas G., Gomez-Conde E., Hernandez P., Larralde C., Sciutto E. and G. Fragosos. 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*. 20; 93(3-4):81-90.
- Dixon H. B. F. and F.M. Lipscomb. 1961. Cysticercosis, an analysis and follow up of 450 cases. Privy Council, Med. Res. Council, Special Report series No. 299. Her Majesty's Stationary Office, London.
- Donnelly J., Ulmer J. B., and M. A. Liu. 1994. Immunization with DNA. *J Immunol Meth* 176: 145-152.
- Donnelly J. J., Ulmer J. B., Shiver J. W. and M. A. Liu. 1997. DNA vaccines. *Annu Rev Immunol* 15: 617-648.
- Doolan D. L., Sedegah M., Hedstrom R. C., Hobart P., Charoenvit Y. and S. L. Hoffman. 1996. Circumventing genetic restriction of protection against malaria with

multigene DNA immunization: CD8⁺ cell-, interferon gamma- and nitric oxide- depend immunity. J Exp Med 183(4): 1739-1746.

- Eisenbraun, M. D., Fuller, D. H. and J. R. Haynes. 1993. Examination of parameters affecting the elicitation of humoral immune responses by particle bombardment-mediated genetic immunization. DNA Cell Biol 12: 791-797.
- Ertl H. C. J., Verma P. He Z. and Z. Q. Xiang. 1995. Plasmid vectors as anti-viral vaccines. Ann New York Acad Sci 772: 77-87.
- Evans C. A., Gonzalez A. E., Gilman R. H., Verasteghi M., García H. H., Chavera A., Pilcher J. B. and V. C. Tsang. 1997. Immunotherapy for porcine cysticercosis: implications for prevention of human disease. Am J Trop Med Hyg 56(1): 33- 37.
- Feltquate D. M., Heaney S., Webster R. G. and H. L. Robinson. 1997. Different T helper cell types and antibody isotypes generated by saline and gene gun DNA immunization. J Immunol 158(5): 2278-2284.
- Fleury A., Gomez T., Alvarez I., Meza D., Huerta M., Chavarria A., Carrillo Mezo R.A., Lloyd C., Dessein A, Preux P.M., Dumas M., Larralde C., Sciutto E. and G. Fragoso. 2003. High prevalence of calcified silent neurocysticercosis in a rural village of México. Neuroepidemiology. 22(2): 139-45.
- Flisser A.1988. Neurocysticercosis in Mexico. Parasitol Today. 4(5):131-7.
- Flisser A., Gonzalez D., Rodriguez-Carbajal J., Shkurovich M., Cohen S., Fernandez B., Fernandez E., Collado M. A., Madrazo I and A. Plancarte. 1989 Swine cysticercosis treated with praziquantel, a short report. Acta Leiden. 57(2):255-8.
- Flisser A. and M.W. Lightowers. 2001. Vaccination against *Taenia solium* cysticercosis. Mem Inst Oswaldo Cruz. 96(3):353-6.
- Flisser A., Sarti E., Lightowers M. and P. Schantz. 2003. Neurocysticercosis: regional status, epidemiology, impact and control measures in the Americas. Acta Trop. 87(1):43-51.
- Flisser A., Gauci C.G., Zoli A., Martinez-Ocana J., Garza-Rodriguez A., Dominguez-Alpizar J.L., Maravilla P., Rodriguez-Canul R., Avila G., Aguilar-Vega L., Kyngdon C., Geerts S. and M.W. Lightowers. 2004. Induction of protection against porcine cysticercosis by vaccination with recombinant oncosphere antigens. Infect Immun 72(9): 5292-7.

- Flisser A., Rodriguez-Canul R. and A. L. Willingham. 2006. Control of the taeniosis/cysticercosis complex: Future developments. *Vet Parasitol.* 23.
- Fornasari M.S., Laplagne D.A., Frankel N., Cauerhff A.A., Goldbaum F.A., Echave J. 2004. Sequence determinants of quaternary structure in lumazine synthase. *Mol Biol Evol.* 21(1):97-107.
- Fragoso G., Lamoyi L., Mellor A., Lomelí C., Hernández M. and E. Sciutto. 1998. Increased resistance to *Taenia crassiceps* murine cysticercosis in Qa-2 transgenic mice. *Infection and Immunity* 66(2): 760-764.
- Fynan E. F., Robinson H. L. and R. G. Webster. 1993a. Use of DNA encoding influenza hemagglutinin as an avian influenza vaccine. *DNA Cell Biol.* 12: 785-789.
- Fynan E. F., Webster R. G., Fuller D. H., Haynes J. R., Santoro J. C. and H. L. Robinson. 1993b. DNA vaccines: protective immunizations by parental, mucosal, and gene-gun inoculations. *Proc Natl Acad Sci USA* 90(24): 11478-11482.
- Freeman R.S. 1962. Studies on the biology of *Taenia crassiceps* (Zeder, 1800), (Rudolphi, 1810). *Canadian Journal of zoology.* 40: 969-990.
- García H. H. and O. H. Del Brutto. 2000. *Taenia solium* cysticercosis. *Infect Dis Clin North Am.* 14(1):97-119, ix.
- García H.H., Evans C., Nash T., Takayanagui O., White A., Botero D., Rajshekhar V., Tsang V., Schantz P., Allan J., Flisser A., Correa D., Sarti E., Friedland J., Martinez S., Gonzales A., Gilman R. and Del Brutto O. 2002. Current consensus guidelines for treatment of neurocysticercosis. *Clin Microbiol Rev* 15(4): 747-56.
- Gardner M. J., Doolan D. L., Hedstrom R. C., Wang R., Sedegah M., Gramzinski R. A., Aguiar J. C., Wang H., Margalith M., Hobart P. and S. L. Hoffman. 1996. DNA vaccines against malaria: immunogenicity and protection in a rodent model. *J Pharm Sci* 85(12): 1294-1300.
- Gemmell M.A. Hydatidosis and cysticercosis. 1969. Acquired resistance to the larval phase. *Aust Vet J.* 45(11):521-4.
- Gemmell M. and J.R. Lawson. 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.* Flisser, A., Willms, K.,

- Laclette, J.P., Larralde, C., Ridaura, C. and Beltrán, F. (Eds.). 1982. Academic Press, New York. 700 pp.
- Gemmell M., Matyas Z., Pawlowski Z., Soulsby E. J. L., Larralde C., Nelson G. S. and B. Rosicky, (eds.) 1985. Guidelines for Surveillance, Prevention and Control of Teniasis/Cysticercosis, WHO Document VPH/83. 49, pp.1-207.
 - Gevorkian G., Manoutcharian K., Larralde C., Hernández M., Almagro J. C., Viveros M., Sotelo J., García E. and E. Sciutto. 1996. Immunodominant synthetic peptides of *Taenia crassiceps* in murine and human cysticercosis. Immunol Letters 49: 185-189.
 - Gnezdilov, V. G. 1957. The golden hamster (*Mesocricetus auratus* Waterhouse) as a potential definitive host of the tapeworm *Taenia solium*. Zool. Zb. 36, 1770-1773.
 - Grisolia, J. S. and W. C. Wiederholt. 1982. CNS cysticercosis. Arch Neurol 39(9): 540-544.
 - Gonzalez A.E., Falcon N., Gavidia C., Garcia H.H., Tsang V.C., Bernal T., Romero M. and R.H. Gilman. 1998. Time-response curve of oxfendazole in the treatment of swine cysticercosis. Am J Trop Med Hyg. 59(5):832-6.
 - Gonzalez L.M., Montero E., Puente S., Lopez-Velez R., Hernandez M., Sciutto E., Harrison L.J., Parkhouse R.M. and T. Garate. 2002. PCR tools for the differential diagnosis of *Taenia saginata* and *Taenia solium* taeniasis/cysticercosis from different geographical locations. Diagn Microbiol Infect Dis. 42(4):243-9.
 - Guo Y.J., Sun S.H., Zhang Y., Chen Z.H., Wang K.Y., Huang L., Zhang S., Zhang H.Y., Wang Q.M., Wu D. and W.J. Zhu 2004. Protection of pigs against *Taenia solium* cysticercosis using recombinant antigen or in combination with DNA vaccine. Vaccine. 28; 22(29-30):3841-7.
 - Handman E. 2001. Leishmaniasis: current status of vaccine development. Clin Microbiol Rev 14(2): 229-43.
 - Hoffman S. L., Doolan D. L., Sedegah M., Gramzinski R., Wang H., Gowda K. Hobart P., Margalith M., Norman J. and R. C. Hedstrom. 1995. Nucleic acid malaria vaccines: current status and potencial. Ann New York Acad Sci 772: 88-94.
 - Hanson R.W. and L. Reshef. 1997. Regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene expression. Annu Rev Biochem. 66:581-611.

- Hatzoglou M., Lamers W., Bosch F., Wynshaw-Boris A., Clapp D.W. and R.W. Hanson. 1990. Hepatic gene transfer in animals using retroviruses containing the promoter from the gene for phosphoenolpyruvate carboxykinase. *J Biol Chem.* 5; 265(28):17285-93.
- Heath D.D., Parmeter S.N. and P.J. Osborn. 1980. An attempt to immunise dogs against *Taenia hydatigena*. *Res Vet Sci.* 29(3):388-9.
- Hemmi H., Kaisho T., Takeda K. and S. Akira. 2003. The roles of Toll-like receptor 9, MyD88, and DNA-dependent protein kinase catalytic subunit in the effects of two distinct CpG DNAs on dendritic cell subsets. *J Immunol.* 170(6):3059-64.
- Hengge U. R., Walker P. S. and J. C. Vogel. 1996. Expression of naked DNA in human, pig, and mouse skin. *J Clin Invest* 97(12): 2911-2916.
- Herrera L.A., Benita-Bordes A., Sotelo J., Chavez L., Olvera J., Rascon A., Lopez M. and P. Ostrosky-Wegman. 1999. Possible relationship between neurocysticercosis and hematological malignancies. *Arch Med Res.* 30(2):154-8.
- Herrera L.A., Ramirez T., Rodriguez U., Corona T., Sotelo J., Lorenzo M., Ramos F., Verdorfer I., Gebhart E. and P. Ostrosky-Wegman. 2000. Possible association between *Taenia solium* cysticercosis and cancer: increased frequency of DNA damage in peripheral lymphocytes from neurocysticercosis patients. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 94(1):61-5.
- Hernández M., Beltrán C., García E., Fragoso G., Gevorkian G., Fleury A., Parkhouse M., Harrison L., Sotelo J. and E. Sciotto. 2000. Cysticercosis: towards the design of a diagnostic kit based on synthetic peptides. *Immunol Letters.* 71: 13-17.
- Herd R.P., Chappel R.J. and D. Biddell. 1975 Immunization of dogs against *Echinococcus granulosus* using worm secretory antigens. *Int J Parasitol.*5(4):395-9.
- Hopkins C.A. 1982 Immunological memory in mice to adult *Hymenolepis diminuta* (Cestoda). *J Parasitol.* 68(1):32-8.
- Huerta M., de Aluja A.S., Fragoso G., Toledo A., Villalobos N., Hernandez M., Gevorkian G., Acero G., Diaz A., Alvarez I., Avila R., Beltran C., Garcia G., Martinez J.J., Larralde C. and E. Sciotto. 2001. Synthetic peptide vaccine against *Taenia solium* pig cysticercosis: successful vaccination in a controlled field trial in rural Mexico. *Vaccine.* 12; 20(1-2):262-6.

- Ito A., Plancarte A., Ma L., Kong Y., Flisser A., Cho S.Y., Liu Y.H., Kamhawi S., Lightowers M.W. and P.M Schantz. 1998. Novel antigens for neurocysticercosis: simple method for preparation and evaluation for serodiagnosis. *Am J Trop Med Hyg.* 59(2):291-4.
- Jeri C., Gilman R.H., Lescano A.G., Mayta H., Ramirez M.E., Gonzalez A. E., Nazerali R. and H. H. García. 2004. Species identification after treatment for human taeniasis. *Lancet.* 20; 363(9413):949-50.
- Morita A., Ariizumi K., Ritter R. 3rd, Jester J.V., Kumamoto T., Johnston S. A. and A. Takashima. 2001. Development of a Langerhans cell-targeted gene therapy format using a dendritic cell-specific promoter. *Gene Ther.* 8(22):1729-37.
- Keilbach N. M., de Aluja, A. S. and E. Sarti-Gutierrez. 1989. A programme to control taeniasis-cysticercosis (*Taenia solium*): experiences in a Mexican Village. *Acta Leiden* 57(2): 181-189.
- Kayes S. G., Shaneyfelt R. C., Monteiro C. and J. J. O'Brien. 1998. Overproduction of SM28GST in a baculovirus expression vector and its use to evaluate the in vivo immune responses of mice vaccinated against *Schistosoma mansoni* with naked DNA encoding the SM28GST gene. *J Parasitol* 84(4): 764-770
- Kim J.J., Yang J.S. Nottingham L.K., Lee D.J., Lee M., Manson K.H., Wyand M.S., Boyer J.D., Ugen K.E. and D.B. Weiner. 2001. Protection from immunodeficiency virus challenges in rhesus macaques by multicomponent DNA immunization. *Virology* 285:204-217.
- Kline J. N., Waldschmidt I. J., Busingra J. R. , Lemish J. E., Weinstoch J. V., Thorne P. S. and A. M. Krieg. 1998. Modulation of airway inflammation by CpG oligodeoxynucleotides in a murine model of asthma. *J Immunol* 160(6): 2555-2559.
- Klinman D. M., Yi A. K., Beaucage S. L., Conover J. and A. M. Krieg. 1996. CpG motifs present in bacteria DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12, and interferon gamma. *Proc Natl Acad Sci USA* 93 (7): 2879-2883.
- Klinman D. M., Yamshchikov G. and Y. Ishigatsubo. 1997. Contribution of CpG motifs to the immunogenicity of DNA vaccines. *J Immunol* 158(8): 3635-3639.
- Kojic E. and C. White. 2003. A positive Enzyme-Linked Immunoelctrotransfer Blot Assay result for a patient without Evidence of Cysticercosis. *Clin Inf Dis.* 36:7-9.

- Limmer A. and P.A. Knolle. 2001 Liver sinusoidal endothelial cells: a new type of organ-resident antigen-presenting cell. Arch Immunol Ther Exp (Warsz).; 49 Suppl 1:S7-11.
- Limmer A., Ohl J., Wingender G., Berg M., Jungerkes F., Schumak B., Djandji D., Scholz K., Klevenz A., Hegenbarth S., Momburg F., Hammerling G.J., Arnold B. and P.A. Knolle. 2005. Cross-presentation of oral antigens by liver sinusoidal endothelial cells leads to CD8 T cell tolerance. Eur J Immunol. 35(10):2970-81.
- Limmer A., Ohl J., Kurts C., Ljunggren H.G., Reiss Y., Groettrup M., Momburg F., Arnold B. and P.A. Knolle. 2000. Efficient presentation of exogenous antigen by liver endothelial cells to CD8+ T cells results in antigen-specific T-cell tolerance. Nat Med. 6(12):1348-54.
- Knolle P.A. and A. Limmer. 2003. Control of immune responses by scavenger liver endothelial cells. Swiss Med Wkly. 26; 133(37-38):501-6.
- Krieg A. M., Yi A. K., Matson S., Waldschmidt T. J., Bishop G. A., Teasdale R., Koretzky G. A. and D. M. Klinman. 1995. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. Nature 374(6522): 546-549.
- Krieg A. M., Yi A. K., Schorr J. and H. L. Davis. 1998. The role of CpG dinucleotides in DNA vaccines. Trends microbiol 6(1): 23-27.
- Malagon-Valdez J. 1999. Neurocysticercosis in pediatrics. Prognosis, treatment and prevention. Rev Neurol. 16-31;29(4):337-9.
- Moorman A.F., de Boer P.A., Charles R. and W. H. Lamers. 1990. Diet- and hormone-induced reversal of the carbamoylphosphate synthetase mRNA gradient in the rat liver lobulus. FEBS Lett. 10; 276(1-2):9-13.
- Laplagne DA, Zylberman V, Ainciart N, Steward MW, Sciutto E, Fossati CA, Goldbaum FA. 2004. Engineering of a polymeric bacterial protein as a scaffold for the multiple display of peptides. Proteins. 1; 57(4):820-8.
- Larralde C., Lacleste J. P., Owen C. S., Madrazo I., Sandoval M., Bojalil R., Sciutto L., Contreras J., Arzate M., Díaz M. L., Govezensky T., Montoya R. M. and F. Goodsaid. 1986. 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.

- Larralde C., Montoya R. M., Sciutto E., Díaz M. V., Govezensky T. 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. *Am J Trop Med Hyg* 40(3): 282-290.
- Larralde. C., Montoya R. M., Sotelo J., Hayunga J., Sciutto E., Palencia G., Padilla A., Govezensky T. and L. Díaz. 1990. Murine *T. crassiceps* antigens in immunodiagnosis of *T. solium* human neurocysticercosis, *T. saginata* bovine cysticercosis and human *E. granulosus* hydatidosis. *Bull Soc Fr Parasitol* 8:S 8B.
- Larralde C., Padilla A., Hernández M., Govezensky T., Sciutto E., Gutiérrez G., Tapia-Conver R., Salvatierra B. and J, Sepúlveda. 1992. Seroepidemiología de la cisticercosis en México. *Salud Pública de México*, 345 p.
- Liu S., Gallo D.J., Green A.M., Williams D.L., Gong X., Shapiro R.A., Gambotto A.A., Humphris E. L., Vodovotz Y. and R.B. Billiar. 2002. Role of Toll-Like Receptors in changes in gene expresion and NF-kB activation in mouse hepatocytes stimulated with lipopolysaccharide. *Infection and immunity* Jul: 3433-3442.
- López-Casillas F., Cheifetz S., Doody J., Andres L., Lane W. S. and J. Massagué. 1991. Structure and expression of the membrane proteoglycane betaglycane, a component of the TGF- β receptor system. *Cell* 67: 785-795.
- Loo L. and A. Braude. 1982. Cerebral cysticercosis in San Diego. Areport of 23 cases and a review of the literature. *Medicine (Baltimore)* 61(6): 1537-1540.
- Lu S., Arthos J., Montefiori D. C., Yasutomi Y., Manson K., Mustafa F., Johnson E., Santoro J. C. Wissink J., Mullins J. L. Haynes J. R., Letvin N. L. Wynand M. and H. L. J. Robinson. 1996. Simian Immunodeficiency virus DNA vaccine trial in macaques. *J Virol* 70(6): 3978-3991.
- Manickan E., Rouse R., Yu Z. Y., Wire W. S. and B. T. Rouse. 1995. Genetic immunization against herpes-simplex-virus protection is mediated by CD4(+) T-lymphocytes. *J immunol* 155: 259-265.
- Magnusson, M., Johansson, E., Berg., M., Eloranta, M.L., Fuxler, L, and C. Fusson. 2001. The plasmid pcDNA3 differentially induces production of interferon- α and

interleukin-6 in cultures of porcine leukocytes. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 78: 45-56.

- Manoutcharian K., Larralde C., Fragoso G., Rosas G., Hernández M., Govezensky T., Baca M., Aluja A., Villalobos N., Rodarte L. and E. Sciutto. 1995. Advances in the development of a recombinant vaccine against *Taenia solium* pig cisticercosis. In: *Vaccine* 95. Cold Spring Harbord. pp 63-68.
- Manoutcharian K., Rosas G., Hernandez M., Fragoso G., Aluja A., Villalobos N., Rodarte, L.F. and E. Sciutto. 1996. Cysticercosis: Identification and cloning of protective recombinant antigens. *J. Parasitol.* 82(2): 250-254.
- Maravilla P., Avila G., Cabrera V., Aguilar L. and A. Flisser. 1998. Comparative development of *Taenia solium* in experimental models. *J Parasitol.* 84(5):882-6.
- McCormick G. F., Zee C. S. and J. Heiden. 1982. Cysticercosis cerebri: review of 127 cases. *Arch Neurol* 39(9): 534-539.
- McCormick, G. F. 1985. Cysticercosis, review of 230 patients. *Bull Clin Neurosci* 50: 76-101.
- Merchant M.T., Aguilar L., Avila G., Robert L., Flisser A. and K. Willms. 1998. *Taenia solium*: description of the intestinal implantation sites in experimental hamster infections. *J Parasitol.* 84(4):681-5.
- Molinari J. L., Meza R. and P. Tato 1983. *Taenia solium*: cell reactions to the larva (*cysticercosis cellulosae*) in naturally parasitized, immunized hogs. *Exp Parasitol* 56(3): 327-338.
- Molinari J. L., Soto R., Tato P., Rodriguez D., Retana A., Sepulveda J. and A. Palet. 1993. Immunization against porcine cysticercosis in an endemic area in Mexico: a field and laboratory study. *Am J Trop Med Hyg* 49(4): 502-512.
- Molinari J. L., Rodriguez D., Tato P., Soto R., Arechavaleta F. 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.
- Morales N., Agapejev S., Morales R., Padula N., and N. Lima. 2000. Clinical aspects of neurocysticercosis in children. *Pediatr Neurol.* 22(4):287-91.

- Nascimento E., Costa, J. O., Guimaraes M. P. and C. A. Tavares. 1995. Effective immune protection of pigs against cysticercosis. *Vet Immunol Immunopathol* 45(1-2): 127-137.
- Nichols W. W., Ledwith B. J., Manam S. V. and P. J. Troi. 1995. Potential DNA vaccine integration into host cell genome. *Ann NY Acad Sci* 772: 30-39.
- Patel Y.M., Yun J.S., Liu J., McGrane M.M. and R.W. Hanson, 1994. An analysis of regulatory elements in the phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene which are responsible for its tissue-specific expression and metabolic control in transgenic mice. *J Biol Chem.* 25; 269(8):5619-28.
- Pawlowski Z., Allan J. and E. Sarti. 2005. Control of *Taenia solium* taeniasis/cysticercosis: from research towards implementation. *Int J Parasitol.* 35(11-12):1221-32.
- Pawlowski Z.S. 2006. Role of chemotherapy of taeniasis in prevention of neurocysticercosis. *Parasitol Int.* 55 Suppl: S105-9.
- **Ping-Chin 2004 RI vs cestodos**
- Proaño-Narvaez J., Meza-Lucas A., Mata-Ruiz O., García-Jeronimo R. and D. Correa. 2002. Laboratory diagnosis of human Neurocysticercosis: Double-blind comparison of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Electroimmunotransfer Blot Assay. *J Clin Microbiol* 40(6):2115-2118.
- Plancarte A., Flisser A., Gauci C.G. and M.W. Lightowers. 1999. Vaccination against *Taenia solium* cysticercosis in pigs using native and recombinant oncosphere antigens. *Int J Parasitol.* 29(4):643-7.
- Quintana F.J., Rotem A., Carmi P. and I.R. Cohen. 2000. Vaccination with empty plasmid DNA or CpG oligonucleotide inhibits diabetes in nonbese diabetic mice: modulation of spontaneous 60-kDa Heat shock protein autoimmunity. *The Journal of immunology* 165: 6148-6155.
- Raz E., Carson D. A., Parker S. E., Parr T. B., Abai A. M., Aichinger G., Gromkowski S. H., Singh M., Lew D., Yankauckas M. A., Baird S. M. and G. H. Rhodes. 1994. Intradermal gene immunization: the possible role of DNA uptake in the induction of cellular immunity to viruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 91(20): 9519-9523.

- Rabiela-Cervantes M. T., Rivas-Hernández A., Rodriguez-Ibarra J., Castillo-Medina S. and F. de M. Cancino. 1982. Anatomopathological aspects of human brain cysticercosis. In: Cysticercosi: Present State of Knowledge and Perspectives (Flisser, A., Willms, K., Laclette, J. P., Larralde, C., Ridaura, C. and F. Beltran, eds) pp 179-200, Academic Press, New York.
- Restrepo B.I., Llaguno P., Sandoval M.A., Enciso J.A., and J.M. Teale. 1998. Analysis of immune lesions in neurocysticercosis patients: central nervous system response to helminth appears Th1-like instead of Th2. *J Neuroimmunol.* Aug 14;89(1-2):64-72.
- Richards F. Jr. and P. M. Shantz. 1991. Laboratory diagnosis of cysticercosis. *Clin Lab Med* 11(4): 1011-1028.
- Rickard M.D., Boddington E.B. and N. McQuade. 1977. Vaccination of lambs against *Taenia ovis* infection using antigens collected during in vitro cultivation of larvae: passive protection via colostrum from vaccinated ewes and the duration of immunity from a single vaccination. *Res Vet Sci.* Nov; 23(3):368-71.
- Rickard M.D. and A.J. Adolph. 1977. Vaccination of lambs against infection with *Taenia ovis* using antigens collected during short-term in vitro incubation of activated *T. ovis* oncospheres. *Parasitology.* 75(2):183-8.
- Rosas G., Cruz-Revilla C., Fragosos G., López-Casillas F., Pérez A., Bonilla M. A, Rosales R. and E. Sciutto. 1998. *Taenia crassiceps* cysticercosis: humoral immune response and protection elicited by DNA immunization. *Journal of parasitology* 84(3): 516-523.
- Roy K., Mao H.Q., Huang S.K. and K.W. Leong. 1999. Oral gene delivery with chitosan-DNA nanoparticles generates immunologic protection in a murine model of peanut allergy. *Nature Medicine* 5: 387-91.
- Rhodes G. H., Abai A. M., Margalith M., Kuwahora-Rundell A., Marrow J., Parker S. E. and V. J. Dwarki. 1994. Characterization of humoral immunity after DNA injection. *Dev Biol Stand* 82: 229-236.
- Robinson H. L., Hunt L. A. and R. G. Webster. 1993. Protection against a lethal influenza virus challenge by immunization with haemagglutinin-expressing plasmid DNA. *Vaccine* 11: 957-960.
- Robinson A. 1995. DNA-based vaccines: new possibilities for disease prevention and

treatment. CMAJ 152(10): 1629-1632.

- Roman M., Martin-Orozco E., Goodman J. S., Nguyen M. D., Sato Y., Ronaghy A., Kornbloth R. S., Richman D. D., Carson D. A. and E. Raz. 1997. Immunostimulatory DNA sequences functions as T helper promoting adjuvants. Nat Med 3(8): 849-854.
- 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.
- Rothel J. S., Waterkeyn J. G., Strugnell R. A., Wood P. R., Seow H. F., Vadolas J. and M. W. Lightowlers. 1997. Nucleic acid vaccination of sheep: use in combination with a conventional adjuvant vaccine against *Taenia ovis*. Immunol Cell Biol 75(1): 41-46.
- Sanjay G., Wu C., Freidag B.L. and N. A Seder. 2000. DNA vaccines: a key for inducing long term cellular immunity. Current opinion in Immunology 12: 442-447.
- Sarti E., Flisser A., Schantz P. M., Gleizer M., Loya M., Plancarte A., Avila G., Allan J., Craig P., Bronfman M. and P. Wijeyaratne. 1997 Development and evaluation of a health education intervention against *Taenia solium* in a rural community in Mexico. Am J Trop Med Hyg. 56(2):127-32.
- Sato Y., Roman M., Tighe H., Lee D., Curr M., Nguyen M. D., Silverman G. J., Lutz M., Carson D. A. and E. Raz. 1996. Immunostimulatory DNA sequences necessary for effective intradermal gene immunization. Science 273(5273): 352-354.
- Sedegah M., Hedstrom R., Hobart P. and S. L. Hoffman. 1994. Protection against malaria by immunization with plasmid DNA encoding circumsporozoite protein. Proc Natl Acad Sci USA 91(21): 9866-9870.
- Sambrook J., Fritsch E. and T. Maniatis. Molecular cloning. 1989. A Laboratory Manual, second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sciutto E, Martinez J.J., Villalobos N.M., Hernandez M., Jose M.V., Beltran C., Rodarte F., Flores I., Bobadilla J.R., Fragoso G., Parkhouse M.E., Harrison L.J. and A.S. de Aluja. 1998. Limitations of current diagnostic procedures for the diagnosis of *Taenia solium* cysticercosis in rural pigs. Vet Parasitol. 27; 79 (4):299-313.
- Sciutto E., Fragoso G., Trueba L., Lemus D., Montoya R. M., Díaz M. L., Govezensky T., Lomelí C., Tapia G. and C. Larralde. 1990. Cisticercosis vaccine:

- cross protecting immunity with *Taenia solium* antigens against experimental murine *Taenia crassiceps* cysticercosis. *Parasite Immunol* 12(6): 687-696.
- Sciutto E., Fragoso G., Baca M., De la Cruz V., Lemus L. and E. Lamoyi. 1995a. Depressed T-cell proliferation associated with susceptibility to experimental infection with *Taenia crassiceps* infection. *Infect Immun* 63: 2277-2281.
 - Sciutto E., Aluja A., Fragoso G., Rodarte L. F., Hernandez M., Villalobos M. N., Padilla A., Keilbach N., Baca M., Govezensky T. and C. Larralde. 1995b. Immunization of pigs against *Taenia solium* cysticercosis: factors related to effective protection. *Vet Parasitol* 60(1-2): 53-67.
 - Sciutto E., Fragoso G., Fleury A., Chavarría A., Vega R, Yáñez O, de Aluja S. A, Larralde C. 2003. *Taenia solium* cysticercosis of humans and pigs: A review of our contributions and perspectives in the research of its complexities. Recent Res. Devel. Infection & Immunity. Transworld Research Network, India.
 - Schantz P.M., Sarti E., Plancarte A., Wilson M., Criales J.L., Roberts J. and A. Flisser. 1994. Community-based epidemiological investigations of cysticercosis due to *Taenia solium*: comparison of serological screening tests and clinical findings in two populations in Mexico. *Clin Infect Dis.* 18(6):879-85.
 - Smooker, P.M., Kennedy, N. J., Steeper, K.R., Christopoulos, H. and T.W. Spithill. 2001. Fasciola: kinetics and quality of humoral response to fatty acid binding protein and cathepsin I following delivery as DNA vaccines in mice. *Exp. Parasitol.* 97(3): 154-60.
 - Sotelo J.O., Del Brutto O. H and G. Roman. 1996. Cysticercosis. *Curr. Clin. Top. Infect. Dis.* 16: 240-159.
 - Sotelo J., Torres B., Rubio-Donnadieu F., Escobedo F. and J. Rodriguez-Carbajal. 1985. Praziquantel in the treatment of neurocysticercosis: long-term follow-up. *Neurology.* 35(5):752-5.
 - Swain W. F. Macklin M. D., Newmann G., McCabe D. E., Drape R., Fuller J. T., Widera G., Mcgregor M., Callan R. J. and V. Hinshaw. 1997. Manipulation of immune responses via particle-mediated polynucleotide vaccines. *Behring Inst Mitt* 98: 73-78.
 - Tang D., Devit M. and S. A. Johnson. 1992. Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature* 356: 125-155.

- Tanowitz H.B., Weiss L.M. and M. Wittner. 2001. Tapeworms. *Curr Infect Dis Rep.* 3(1):77-84.
- Toledo A., Larralde C., Fragoso G., Gevorkian G., Manoutcharian K., Hernández M., Acero G., Rosas G., López-Casillas F., Kubli-Garfias C., Vazquez R., Terrazas I. 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(5): 2522-2530.
- Toledo A., Fragoso G., Rosas G., Hernandez M., Gevorkian G., Lopez-Casillas F., Hernandez B., Acero G., Huerta M., Larralde C. and E. Sciutto. 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.* Mar; 69(3):1766-73.
- Torres A., Plancarte A., Villalobos A. N., de Aluja A..S., Navarro R. and A. Flisser 1992. Praziquantel treatment of porcine brain and muscle *Taenia solium* cysticercosis. 3. Effect of 1-day treatment. *Parasitol Res.*78(2):161-4.
- Torres C. A., Iwasaki A., Barber B. H. and H. L. Robinson. 1997. Differential dependence on target site tissue for gene gun and intramuscular DNA immunizations. *J Immunol* 158(10): 4529-4532.
- Tsang V.C., Brand J.A. and A.E. Boyer. 1989. An enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay and glycoprotein antigens for diagnosing human cysticercosis (*Taenia solium*). *J Infect Dis.* 159(1):50-9.
- Ulmer J. B., Donnelly J. J., Parker S. E., Rhodes G. H., Felgner P. L., Dwarki V. J., Gromkowski S. H., Deck R. R., DeWitt C. M., Friedman A., Howe L. A., Leander K. R., Martínez D., Perry H. C., Shiver J. W., Montgomery D. L. and M. A. Liu. 1993. Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding viral protein. *Science* 259(5102): 1745-1749.
- Valdez F., Hernández M., Govezensky T., Fragoso G. and E. Sciutto. 1994. Immunization against *Taenia crassiceps* cysticercosis. Identification of the most promising antigens in the induction of protective immunity. *Journal of Parasitology* 80: 931-936.

- Verster A. 1971. Preliminary report on the golden hamster as a definitive host of *Taenia solium* Linnaeus, 1758 and *Taenia saginata* Goeze, 1782. Onderstepoort J Vet Res. 38(1):63-4.
- Wang Q.M., Sun S.H., Hu Z.L., Wu D. and Z.C.. Wang. 2003. Immune response and protection elicited by DNA immunization against *Taenia cysticercosis*. Vaccine. 2; 21(15):1672-80.
- Webster R. G., Fynan E. F., Santoro J. C. and H. Robinson. 1994. Protection of ferrets against influenza challenge with a DNA vaccine to the haemagglutinin. Vaccine 12(6): 1495-1498.
- Weiner G. J., Liu H. M., Wooldridge J. E., Dahle C. E. and A. M. Krieg. 1997. Immunostimulatory oligodeoxynucleotides containing the CpG motif are effective as immune adjuvant in tumor antigen immunization. Proc Natl Acad Sci USA 94(29): 10833-10837.
- White A.C. Jr. 2000. Neurocysticercosis: updates on epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and management. Annu Rev Med. 51:187-206.
- Williams R. S., Johnston, S. A., Riedy M., DeVit M. J., McElligott S. G. and J. C. Sanford. 1991. Introduction of foreign genes into tissues of living mice by DNA-coated microprojectiles. Proc Natl Acad Sci USA 88(7): 2726-2730.
- Wolff J. A., Malone R. W., Williams P., Chong W., Acsadi G., Jani A. and P. A. Felgner 1990. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. Science 247: 1465-1466.
- Wolff J. A., Williams P., Acsadi G., Jiao S., Jani A. and W. Chong. 1991. Conditions affecting direct gene transfer into rodent muscle in vivo. Biotechniques 11(4): 474-485.
- Wilson J. M., Groosman M., Cabrera J. M., Wu C. H. and G. Y. Wu. 1992. A novel mechanism for achieving transgene persistence in vivo after somatic gene transfer into hepatocytes 267(16):11483-11489.
- Willms K. and M.T. Merchant. 1980. The inflammatory reaction surrounding *Taenia solium* larvae in pig muscle: ultrastructural and light microscopic observations. Parasite Immunol. 2(4):261-75.
- Willms K., Merchant M.T., Gomez M. and L. Robert. 2001. *Taenia solium*: germinal cell precursors in tapeworms grown in hamster intestine. Arch Med Res 32(1):1-7.

- Willms K., Robert L. and J.A. 2003. Ultrastructure of smooth muscle, gap junctions and glycogen distribution in *Taenia solium* tapeworms from experimentally infected hamsters. Parasitol Res. 89(4):308-16. Epub 2002 Nov 14.
- Wolff J. A., Malone R. W., Williams P., Chong W., Acsadi G., Jani A. and P. A. Felgner 1990. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. Science 247: 1465-1466.
- Xu, D. and F. Y. Liew. 1994. Genetic vaccination against leishmaniasis. Vaccine 12(16): 1534-1536.
- Xu, D. and F. Y. Liew. 1995. Protection against leishmaniasis by injection of DNA encoding a major surface glycoprotein, gp63, of *Leishmania major*. 1995. 84(2): 173-176.
- Yoshida Y., Kobayashi E., Endo H., Hamamoto T., Yamanaka T., Fujimura A. and Y. Kagawa. 1997. Introduction of DNA into rat liver with a Hand-Held Gene gun: distribution of the expressed enzyme [³² P] DNA, and Ca²⁺ flux. Biochemical and biophysical research communications 234: 695-700.
- Yoshida S., Kashiwamura S., Hosoya Y., Lou E., Matsuoka H., Ishii A., Fujimura A. and E. Kobayashi. 2000. Direct immunization of malaria DNA vaccine into the liver by gene gun protects against lethal challenge of *Plasmodium berghei* sporozoite. Biochemical of Biophysical Research Communications 271: 107-115.
- Yankauckas M. A., Morrow J. E., Parker S. E., Abai A., Rhodes G. H., Dwarki V. J. and S. H. Gromkowski. 1993. Long-term anti-nucleoprotein cellular and humoral immunity is induced by intramuscular injection of plasmid DNA containing NP gene. DNA Cell Biol 12(9): 771-776.
- Yang W., Waine G. J. and D. P. McManus. 1995. Antibodies to *Schistosoma japonicum* (Asian blood fluke) paramyosin induced by nucleic acid vaccination. Biochem Biophys Res Commun 212(3): 1029-1039.
- Yi A. K., Chace J. H., Cowdery J. S. and A. M. Krieg. 1996a. IFN-gamma promotes IL-6 and IgM secretion in response to CpG motifs in bacterial DNA and oligodeoxynucleotides. J Immunol 156(2): 558-564.
- Yi A. K., Klinman D. M., Martin T. L., Matson S. and A. M. Krieg. 1996b. Rapid immune activation by CpG motifs in bacterial DNA systemic induction of IL-6 transcription through an antioxidant sensitive pathway. J Immunol. 15; 157(12):5394-402.

- Yi A. K., Chang M., Peckman D. W., Krieg A. M. and R. F. Ashman. 1998a. CpG oligodeoxyribonucleotides rescue mature spleen B cells from spontaneous apoptosis and promote cell cycle entry. *J Immunol* 160(12): 5898-5906.
- Yi A. R., Tuetken R., Redford T., Waldschmidt M., Kirsch J. and A. M. Krieg. 1998b. CpG motifs in bacterial DNA activate leukocytes through the pH-dependent generation of reactive oxygen species. *J Immunol* 160(10): 4755-4761.
- Zhao H., Hemmi H., Akira S., Cheng S.H., Scheule R.K. and N.S. Yew. 2004. Contribution of Toll-like receptor 9 signaling to the acute inflammatory response to nonviral vectors. *Mol Ther.* 2004. 9(2):241-8.
- Zhu F.G., Reich C.F. and D.S. Pisetsky. 2001 The role of the macrophage scavenger receptor in immune stimulation by bacterial DNA and synthetic oligonucleotides. *Immunology.* 103(2):226-34.
- Zylberman V., Craig P.O., Klinke S., Braden B.C., Cauerhff A. and F.A. Goldbaum. 2004. High order quaternary arrangement confers increased structural stability to *Brucella* spp. lumazine synthase. *J Biol Chem.* 27; 279(9):8093-101.