

T  
1207

 XOCHIMILCO SERVICIOS DE INFORMACION  
ARCHIVO HISTORICO

124333

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD XOCHIMILCO



EXPRESIÓN DE PÉPTIDOS RECOMBINANTES DEL CISTICERCO DE

*Taenia crassiceps* EN PLANTAS TRANSGÉNICAS

TESIS

Que para obtener el grado de

**Doctor en Ciencias Biológicas**

PRESENTA

**M. en C. Rutilia Marisela Hernández González**

Comité tutorial:

Cotutor: Dra. Edda Sciutto Conde

Cotutor: Dr. Rafael Bojalil Parra

Asesor: Dr. José Luis Cabrera Ponce

Mayo de 2010

ÍNDICE	Página
I. RESUMEN .....	1
II. SUMMARY.....	3
III. INTRODUCCIÓN .....	5
IV. JUSTIFICACIÓN .....	8
V. HIPÓTESIS .....	9
VI. OBJETIVOS .....	9
VII. ANTECEDENTES .....	11
a) Taxonomía y descripción de <i>T. solium</i>	
b) Ciclo de vida de <i>T. solium</i>	
c) Epidemiología de la cisticercosis	
d) Modelo de cisticercosis experimental murina por <i>Taenia crassiceps</i>	
e) Vacunas contra la cisticercosis	
f) Plantas transgénicas para la producción de antígenos recombinantes de interés para vacunación	
g) Especies vegetales para la producción de clones transgénicas que expresen los péptidos recombinantes KETc1, KETc12 y KETc7 del cisticerco de <i>T. crassiceps</i>	
h) Selección de la especie vegetal transgénica para la producción de una vacuna contra la cisticercosis	
i) Generalidades del cultivo de la papaya ( <i>Carica papaya L.</i> )	
j) Producción de plantas transgénicas de papaya ( <i>Carica papaya L.</i> )	


“El Doctorado en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACYT y además cuenta con apoyo del mismo Consejo, con el convenio PFP-20-93.”

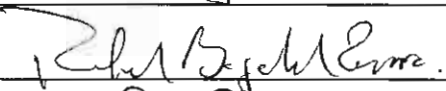
El jurado designado por las Divisiones de Ciencias Biológicas y de la Salud de las  
Unidades Iztapalapa y Xochimilco aprobó la tesis que presentó

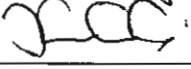
M. en C. Rutlia Marisela Hernández González

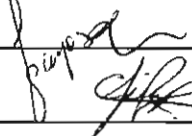
El día 21 de mayo del año 2010


Jurado:


Cotutor: Dra. Edda Sciutto Conde  \_\_\_\_\_

Cotutor: Dr. Rafel Bojalil Parra  \_\_\_\_\_

Asesor: Dr. José Luis Cabrera Ponce  \_\_\_\_\_

Sinodal: Dra. Gladis del Carmen Fragoso González  \_\_\_\_\_

Sinodal: Dra. Reyna Fierro Pastrana  \_\_\_\_\_

Sinodal: Dr. Ángel Arturo Guevara García  \_\_\_\_\_

## DEDICATORIA

Con mucho cariño:

Para mi mamá, mi papá y toda mi familia!

Para mi sobrino Daniel y el pequeño Jared Yeram.

A mis compañeros y amigos, investigadores, técnicos académicos y estudiantes.

¡Gracias!



“Con tus movimientos a tiempo del  
sonido, transmitiendo un arcoiris de  
emociones creas una de las más  
hermosas expresiones del ser  
humano para el mundo”

La danza!

## **AGRADECIMIENTOS**

- ❖ A la Dra. Edda Sciutto por la dirección de esta tesis, por darme el apoyo para continuar superándome y la libertad para realizar mi trabajo.
- ❖ Al Dr. Luis Herrera Estrella, por haber aceptado colaborar y habernos brindado la orientación y el apoyo necesario para la realización de este proyecto.
- ❖ Al Dr. José Luis Cabrera Ponce por haberme asesorado en el área de transformación genética de plantas, su ayuda incondicional y motivación para continuar en el área de la producción de plantas transgénicas.
- ❖ Al Dr. Arturo Guevara García por la asesoría brindada para la realización de las construcciones genéticas, la revisión detallada a este trabajo de tesis y por su ayuda incondicional.
- ❖ Al Dr. Fernando López Casillas por la asesoría y estancia brindada en su laboratorio para la realización de las construcciones genéticas.
- ❖ Al Dr. Rafael Bojalil por su apoyo incondicional y sus observaciones para la realización de este trabajo.
- ❖ A los miembros del jurado por enriquecer este trabajo con sus observaciones, sugerencias y por la revisión de esta tesis.
- ❖ A la Q.F.B. Claudia Geraldine León y a Guadalupe Sánchez por el apoyo técnico brindado durante mi estancia en el laboratorio de transformación genética de plantas del Dr. José Luis Cabrera. CINVESTAV-IPN, Unidad Irapuato.

- ❖ Al Q.F.B. Valentín Mendoza por su apoyo técnico durante mi estancia en el laboratorio del Dr. Fernando López Casillas. Instituto de Fisiología Celular. UNAM.
- ❖ A los Coordinadores del Posgrado en Ciencias Biológicas, en especial a la Dra. Reyna Fierro Pastrana por toda la ayuda brindada.
- ❖ Al Lic. Ernesto Olivares toda la orientación, paciencia y ayuda que nos brinda a todos los estudiantes del Posgrado.
- ❖ A Juan Francisco Rodríguez por la revisión del manuscrito final.
- ❖ A las Instituciones donde me he formado como estudiante: a la UAM Iztapalapa y Xochimilco y la Facultad de Ciencias de la UNAM, así como profesionalista al Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.



Este trabajo se realizó en el Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas y el Departamento de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México, y en el Departamento de Transformación Genética de Plantas del CINVESTAV-IPN, Unidad Irapuato.

VIII. MATERIALES Y MÉTODOS..... 39

a) Construcciones genéticas

a.1) Preparación de las construcciones KETc1, KETc12 y KETc7 para su clonación en el vector pUI235-5.1

a.2) Clonación y secuenciación de las construcciones KETc1.6His-pSK Bluescript y KETc12.6 His-pSK Bluescript

a.3) Subclonación, transformación y secuenciación de las construcciones KETc1.6His-pUI 235-5.1, KETc 12.His-pUI 235-5.1 y KETc7-pUI 235-5.1

b) Transformación genética de callos embriogénicos de maíz, sorgo, zanahoria y papaya

b.1) Inducción de callos embriogénicos

b.2) Transformación por Biobalística o Sistema de Helio de alta presión

b.3) Tratamiento posterior al bombardeo

c) Selección de clonas transgénicas.

c.1) Detección de la expresión del gen reportero ( $\beta$ -glucuronidasa)

d) Propagación de clonas transgénicas

e) Caracterización molecular de clonas transgénicas de papaya (*Carica papaya* L.)

e.1) Identificación del ADN y ARNm del transgén

e.1.1) Purificación de ADN genómico

e.1.2) PCR, "Polimerase Chain Reaction"

e.1.3) RT-PCR "Reverse Transcription" acoplada a PCR

e.1.3.1) Purificación de ARN total

## ÍNDICE

Página

e.1.3.2) RT-PCR

e.1.4) RT-PCR en tiempo real

e.2) Caracterización bioquímica

e.2.1) Preparación de extracto total soluble de callos embriogénicos

e.2.2) Identificación de los péptidos recombinantes

e.2.3.) Evaluación de la capacidad inmunogénica de las clonas transgénicas de papaya contra la cisticercosis experimental murina por *T. crassiceps*.

e.2.4) Inmunohistoquímica para la identificación de péptidos nativos del cisticerco de *T. crassiceps*.

IX. RESULTADOS ..... 53

X. DISCUSIÓN..... 64

XI. CONCLUSIONES..... 73

XII. PERSPECTIVAS..... 76

XIII. BIBLIOGRAFÍA ..... 78

XIV. ARTÍCULO PUBLICADO DERIVADO DEL TRABAJO DE TESIS ..... 101

- ◆ **Hernández M**, Cabrera-Ponce, J. L., Fragoso, G., López-Casillas, F., Guevara-García, A., Rosas, G., León-Ramírez, C., Juárez, P., Sánchez-García, G., Cervantes, J., Acero, G., Toledo, A., Cruz, C., Bojalil, R., Herrera-Estrella, L., Sciotto, E. 2007. A new highly effective anticysticercosis vaccine expressed in transgenic papaya. *Vaccine*. 25:4252-4260.

XV. CONTRIBUCIÓN DERIVADA DEL DESARROLLO DEL TRABAJO DE TESIS.

Registro de la Patente “Método para la producción de antígenos recombinantes para uso como vacuna contra la cisticercosis-teniasis” ante el IMPI.....111

XVI. ARTÍCULOS PUBLICADOS EN COLABORACIÓN DURANTE EL DESARROLLO DE LA TESIS .....113

- ◆ Sciutto, E., Rosas, G., **Hernández, M.**, Morales, J., Cruz-Revilla, C., Toledo, A., Manoutcharian, K., Gevorkian, G., Blancas, A., Acero, G., Hernández, B., Cervantes, J., Bobes, R. J., Goldbaum, F. A., Huerta, M., Diaz-Orea, A., Fleury, A., de Aluja, A. S., Cabrera-Ponce, J. L., Herrera-Estrella, L., Fragoso, G., Larralde, C. 2007. Improvement of the synthetic tri-peptide vaccine (S3Pvac) against porcine *Taenia solium* cysticercosis in search of a more effective, inexpensive and manageable vaccine. *Vaccine*. 25:1368-1378.
- ◆ Sciutto, E., Morales, J., Martínez, J. J., Toledo, A., Villalobos, M. N., Cruz-Revilla, C., Meneses, G., **Hernández, M.**, Díaz, A., Rodarte, L. F., Acero, G., Gevorkian, G., Manoutcharian, K., Paniagua, J., Fragoso, G., Fleury, A., Larralde, R., De Aluja, A. S., Larralde., C. 2007. Further evaluation of the synthetic peptide vaccine S3Pvac against *Taenia solium* cysticercosis in pigs in an endemic town of Mexico. *Parasitology*. 134:129-133.

## ÍNDICE

Página

- ◆ Morales, J., Martínez, J. J, Manoutcharian, K., **Hernández, M.**, Fleury, A., Gevorkian, G., Acero, G., Blancas, A., Toledo, A., Cervantes, J., Maza, V., Quet, F., Bonnabau, H., de Aluja, A. S., Fragoso, G., Larralde, C., Sciutto, E. 2008. Inexpensive anti-cysticercosis vaccine: S3Pvac expressed in heat inactivated M13 filamentous phage proves effective against naturally acquired *Taenia solium* porcine cysticercosis. *Vaccine*. 26: 2899-2905.
  - ◆ Sciutto, E., Fragoso, G., de Aluja, A. S., **Hernández, M.**, Rosas, G., Larralde, C. 2008. Vaccines against cysticercosis. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 8:415-423.
- XVII. APÉNDICE I .....149  
Actividad antihelmíntica, inmunomoduladora y anti-inflamatoria del látex y el extracto de la papaya (*Carica papaya* L.).
- XVIII. APÉNDICE II.....156  
Citocinas humanas: expresión en plantas transgénicas y aplicación terapéutica.
- XIX. GLOSARIO DE TÉRMINOS..... 178

## I. RESUMEN

El uso de plantas transgénicas ofrece un novedoso sistema de expresión genética, capaz de generar nuevas vacunas contra enfermedades infecciosas y parasitarias. En particular resulta un sistema accesible para la producción masiva de proteínas vacunales a bajo costo.

Estas consideraciones sustentaron la decisión de expresar la vacuna contra la cisticercosis constituida por los péptidos KETc1, KETc7 y KETc12, denominada S3Pvac, en clonas transgénicas de cuatro especies vegetales. Los ADNc que codifican para los péptidos KETc1 y KETc12 fueron modificados adicionando en el extremo 3' COOH-terminal, una secuencia que codifica para seis residuos de histidina, dando origen a los péptidos KETc1.6His y KETc12.6His.

Dichos ADNc y la secuencia que codifica para el péptido KETc7 fueron clonados en el vector de transformación pUI235-5.1, que dirige la expresión constitutiva de transgenes en plantas. Cada una de estas construcciones genéticas se utilizaron para transformar por biobalística callos embriogénicos de zanahoria (*Daucus carota* vr. nantes), papaya (*Carica papaya* vr. maradol), maíz (*Zea mays* de la línea LPC-13) y sorgo (*Sorghum bicolor*). Para facilitar la detección y selección de los tejidos transgénicos, las construcciones en el vector pUI235-5.1 se cotransformaron con los vectores pWRG1515 (zanahoria y papaya) y pBARGUS (maíz y sorgo), que además de contener el gen reportero *GUS*, respectivamente portan el gen de resistencia a higromicina y el gen de resistencia al herbicida basta. Los callos embriogénicos transgénicos fueron seleccionados en medio de cultivo suplementado con higromicina y kanamicina (papaya y

zanahoria) y fosfotricina y kanamicina (maíz y sorgo). Todas las clonas transgénicas obtenidas fueron propagadas por subcultivo *in vitro*; sin embargo, considerando el elevado número de clonas obtenidas, así como las ventajas y limitantes que presenta cada especie vegetal para la producción de la vacuna, se seleccionó el sistema de papaya como el más adecuado para estos fines. De tal manera, se procedió a la caracterización molecular e inmunológica de 53 clonas transgénicas de papaya, de las cuales 38 codifican para el péptido KETc1.6His, 11 para el KETc12.6 His y 4 para el KETc7.

El extracto soluble de cada clona fue evaluado en su capacidad protectora contra la cisticercosis experimental murina. Diez clonas evaluadas que expresan el péptido KETc1.6His, dos clonas para el KETc12.6His y una para el KETc7 que indujeron altos niveles de protección fueron seleccionadas con el propósito de realizar análisis ulteriores para el diseño de una nueva vacuna recombinante contra la cisticercosis.

## II. SUMMARY

The use of transgenic plants provides a novel system of gene expression, offering the ability to produce new vaccines against infectious and parasitic diseases. Particularly, it is an amenable system for the massive production of vaccine proteins at low costs.

These considerations supported the idea of developing a vaccine against cysticercosis constituted by peptides KETc1, KETc7, and KETc12, denominated S3Pvac, in four plant species. The cDNAs which codify for KETc1 and KETc12 peptides were modified adding in their 3'-COOH-terminal a sequence codifying for six histidine residues, resulting in the sequences KETc1.6His and KETc12.6His, respectively.

These cDNAs, and the sequence that codifies for the KETc7 peptide, were cloned into the pUI235-5.1 plant expression vector, which directs the constitutive expression of transgenes in plant tissues. Embryogenic calli of carrot (*Daucus carota* var. nantes), papaya (*Carica papaya* var. maradol), maize (*Zea mays* inbred line LPC-13), and sorghum (*Sorghum bicolor*), were cotransformed by bioballistics with each genetic construct in pUI235-5.1 and pWRG1515 (carrot and papaya) or pBARGUS (maize and sorghum) vectors, containing the reporter *GUS* gene besides hygromycin resistance gene and basta herbicide resistance genes, respectively, as selectable markers. In order to make easy the detection and selection of transgenic tissues.

Transgenic embryogenic calli were selected in culture medium supplemented with hygromycin and kanamycin (carrot and papaya), and phosphinothricin and kanamycin (maize and sorghum). All transgenic clones



obtained were propagated by *in vitro* subculture. However, considering the high number of transgenic clones produced, as well as advantages and limitations of each plant system for vaccine production, papaya was chosen as the best candidate to do that. Thus, we focused on the genetic and immunological characterization of 53 papaya transgenic clones, 38 of which codified for the peptide KETc1.6His, 11 for KETc12.6 His, and 4 for KETc7.

Finally, soluble protein-extracts from each transgenic clone were evaluated for its protective capacity against experimental murine cysticercosis. Ten clones expressing KETc1.6His peptide, two clones for KETc12.6His, and one for KETc7 driving higher protection levels were selected for further studies aimed to the constitution of a new recombinant vaccine against cysticercosis.

### III. INTRODUCCIÓN

La neurocisticercosis (NC), una enfermedad causada por el establecimiento en el sistema nervioso central (SNC) del estadio larvario (cisticerco) de la *Taenia solium*, es una de las principales causas de enfermedad neurológica en humanos en los naciones subdesarrollados como México y otros países de América Latina, Asia y África (Aluja, A. 1982; Del Brutto, O. H and Sotelo, J. 1988; Larralde, et. al., 1992), en donde se ha convertido en un grave problema de salud pública.

En México, registros de autopsias realizados en diferentes instituciones hospitalarias indican que la NC afecta de 0.8% a 3.5% de la población adulta, causando gastos para su diagnóstico y tratamiento e incapacitación del paciente. Por lo tanto, debido a los costos que representa para la salud pública y la economía se justifican plenamente los esfuerzos por prevenirla.

El requerimiento indispensable del cerdo como hospedero intermediario permite, por vacunación, interrumpir el ciclo de transmisión de esta parasitosis, y por consecuencia reducir la enfermedad en el humano. Desde 1986, nuestro grupo ha desarrollado un proyecto de investigación que tiene como objetivo la identificación de antígenos del cisticerco de *Taenia crassiceps* que induzcan protección contra la cisticercosis porcina por *Taenia solium*. Hasta el momento se han identificado tres péptidos del cisticerco de *T. crassiceps*, denominados KETc1, KETc12 y KETc7, que constituyen la vacuna anti-cisticercosis S3Pvac. Su evaluación en forma sintética en experimentos de vacunación ha mostrado altos niveles de protección contra la cisticercosis experimental murina y porcina; en esta última, en condiciones naturales de transmisión (Huerta, et al., 2000; 2001; Sciutto, et al., 1990). Los resultados mostraron que la vacunación redujo en 50%

el número de cerdos infectados, en 98% el número de parásitos instalados y un aumento de 20 a 80% en el número de cisticercos no viables, por examen histológico. Estos resultados señalan el potencial de la vacuna S3Pvac para la prevención de la cisticercosis porcina. Sin embargo, su administración de forma sintética implica altos costos de producción, lo que limita su uso en la población de cerdos de traspatio. Por lo tanto, nos hemos concentrado en la búsqueda de alternativas para que su producción sea económicamente más accesible. Adicionalmente, se han considerado las dificultades logísticas que conlleva la aplicación de una vacuna por vía parenteral; por lo tanto, se intenta generar una vacuna de administración oral.

Para este propósito consideramos la expresión de la vacuna S3Pvac en plantas transgénicas, un sistema que ofrece las ventajas de: a) producción de proteínas a gran escala y bajos costos; b) expresión de antígenos tejido-específicos o de forma constitutiva; c) expresión de uno o múltiples transgenes; d) administración en forma purificada y no purificada; e) no requiere el mantenimiento de una cadena fría para su conservación; f) capacidad para la inducción de una respuesta inmune específica, aplicada por vía sistémica u oral; g) no requiere de personal capacitado para su administración por vía oral (Streatfield, *et al.*, 2003).

Entre las proteínas recombinantes que han sido expresadas en plantas transgénicas se encuentran algunas de interés humano como las relacionadas con la hepatitis, el ántrax, el cólera, la rabia, la diabetes, la caries y otras de interés veterinario, como la fiebre aftosa y la gastroenteritis porcina (Featherstone,

*et al.*, 1996; Haq, *et al.*, 1995; Poirier, *et al.*, 1995; Streatfield, *et al.*, 2003; Thanavala, *et al.*, 1995).

En este proyecto realizamos la transformación de callos embriogénicos de maíz (*Zea mays*, línea LPC-13), sorgo (*Sorghum bicolor*), zanahoria (*Daucus carota* vr. nantes) y papaya (*Carica papaya* L) con tres construcciones genéticas para la expresión de los péptidos recombinantes, KETc1.6His, KETc12.6His y KETc7, para el desarrollo de una vacuna contra la cisticercosis. Una vez obtenidas las clonas transgénicas, se consideraron las ventajas y limitantes de las cuatro especies vegetales, observándose que el sistema de papaya presenta las siguientes ventajas: a) las células de papaya poseen propiedades antiparasitarias *per se* (Stepek, *et al.* 2004), lo que ofrecería una mejor efectividad para el diseño de una vacuna contra parásitos intestinales (céstodos) como *Taenia solium*; b) se tiene experiencia en el proceso de transformación por biobalística, así como en la propagación y regeneración *in vitro* de esta especie; c) recientemente se ha reportado la secuenciación de su genoma, lo que indudablemente representa una ventaja experimental sobre los otros sistemas. Por las razones expuestas, sólo se continuó con la caracterización molecular, bioquímica y la evaluación en experimentos de protección con las clonas de papaya transgénicas obtenidas.

#### **IV. JUSTIFICACIÓN**

Para la prevención y control de la cisticercosis se han tratado de implementar diferentes estrategias, como la educación, el mejoramiento de las condiciones sociales y económicas de los sectores afectados, el tratamiento de los cerdos infectados y su prevención por vacunación. Esta última resalta como estrategia promisorio y realista que no implica modificar las condiciones que mantienen y promueven la parasitosis, y que se encuentran arraigadas a las limitaciones económico-sociales de nuestro medio. La elevada frecuencia de la cisticercosis, sus repercusiones en la salud humana y efectos en la porcicultura justifican los esfuerzos por prevenirla.

El requerimiento del cerdo como hospedero intermediario obligatorio ofrece un eslabón susceptible para interrumpir el ciclo de vida del parásito, ya que al morir el cisticerco por acción de la inmunidad inducida por vacunación disminuye la probabilidad de infección del cerdo, y por consecuencia del humano.

Las vacunas y candidatos vacunales actualmente disponibles se han evaluado en su efectividad por administración parenteral. Sin embargo, los altos costos y las dificultades logísticas de esta forma de administración limitan su uso en programas masivos de control como los que se requieren. De tal manera, el disponer de una vacuna de bajo costo y capaz de ser administrada por los propios porcicultores por vía oral representa una nueva alternativa de gran impacto para el control de la cisticercosis.

## **V. HIPÓTESIS**

Los péptidos vacunales KETc1, KETc12 y KETc7 expresados en callos embriogénicos de clonas transgénicas de papaya conservan sus propiedades inmunogénicas e inducen protección contra la cisticercosis.

## **VI. OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

Expresar los péptidos KETc1, KETc 12 y KETc7 en callos embriogénicos de maíz, zanahoria, sorgo y papaya, para el desarrollo de una nueva vacuna contra la cisticercosis.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

- Clonar los ADNc que codifican para los péptidos KETc1, KETc12 y KETc7 en el vector de expresión constitutiva pUI235-5.1.
- Transformar por biobalística callos embriogénicos de las diferentes especies vegetales.
- Identificar, seleccionar, aislar y propagar clonas transgénicas.
- Elegir las clonas transgénicas de una especie vegetal para su caracterización molecular y bioquímica.

- Evaluar la capacidad protectora de las clonas transgénicas de interés en el modelo de cisticercosis por *T. crassiceps*.

## VII. ANTECEDENTES

### a) Taxonomía y descripción de *T. solium*

Reino: Animalia

Phylum: *Platyhelminthes* (gusanos planos con simetría bilateral)

Clase: *Cestoidea* (por la presencia de ventosas y ganchos)

Subclase: *Eucestoda*

Orden: *Cyclophyllidea*

Familia: *Taeniidae*

Género: *Taenia*

Especie: *T. solium*

*T. solium* es un céstodo, que pertenece al grupo de gusanos planos invertebrados con simetría bilateral y segmentados, que se adhiere a la mucosa de la parte proximal del intestino delgado de su hospedero definitivo, el hombre, por medio de cuatro ventosas y una doble corona de ganchos, localizados en su cabeza o róstelo; posee un cuello angosto y un cuerpo constituido por cientos de proglótidos hermafroditas. Los proglótidos adquieren grados progresivos de maduración conforme se alejan de la cabeza del gusano, los distales son los grávidos y cada uno puede llegar a contener hasta 50,000 huevos. Este céstodo puede medir de 3 a 12 metros de largo.

El metacéstodo, forma larvaria o cisticerco es una vesícula llena de líquido que contiene en su interior un escólex invaginado. La pared de la vesícula es una estructura membranosa compuesta de tres capas: cuticular o externa, celular o media y reticular o interna. El escólex presenta una estructura similar a la del estadio adulto.



## **b) Ciclo de vida de *T. solium***

El hombre es el hospedero definitivo de *T. solium*, estadio adulto del parásito, que se aloja en el intestino. Los huevos son eliminados libres o dentro de los proglótidos grávidos en las heces del humano; éstos, al ser ingeridos por los cerdos o accidentalmente por el hombre, en alimentos contaminados o por malos hábitos higiénicos, pasan por el tubo gástrico, y la acción de los jugos digestivos permite la liberación de los embriones hexacantos y su adherencia a la mucosa intestinal. Posteriormente, éstos penetran la pared intestinal hasta alcanzar los vasos sanguíneos, por los cuales pueden llegar a diversos órganos y tejidos y desarrollarse en cisticercos. Los cisticercos pueden localizarse en el tejido muscular, subcutáneo, el sistema ocular y al nivel del sistema nervioso central, causando la neurocisticercosis, que constituye la localización más grave de la infección.

En el cerdo, los cisticercos se alojan principalmente en los músculos maseteros, la lengua, el diafragma, el corazón y el cerebro.

En el hombre, la teniasis se desarrolla cuando se ingiere carne de cerdo infectada con cisticercos y mal cocida. El cisticerco llega al estómago y posteriormente al intestino delgado, en donde por acción de los jugos gástricos y biliares el escólex evagina y se fija en la pared intestinal, donde comienza a desarrollarse hasta alcanzar aproximadamente 12 metros de longitud (Figura 1).

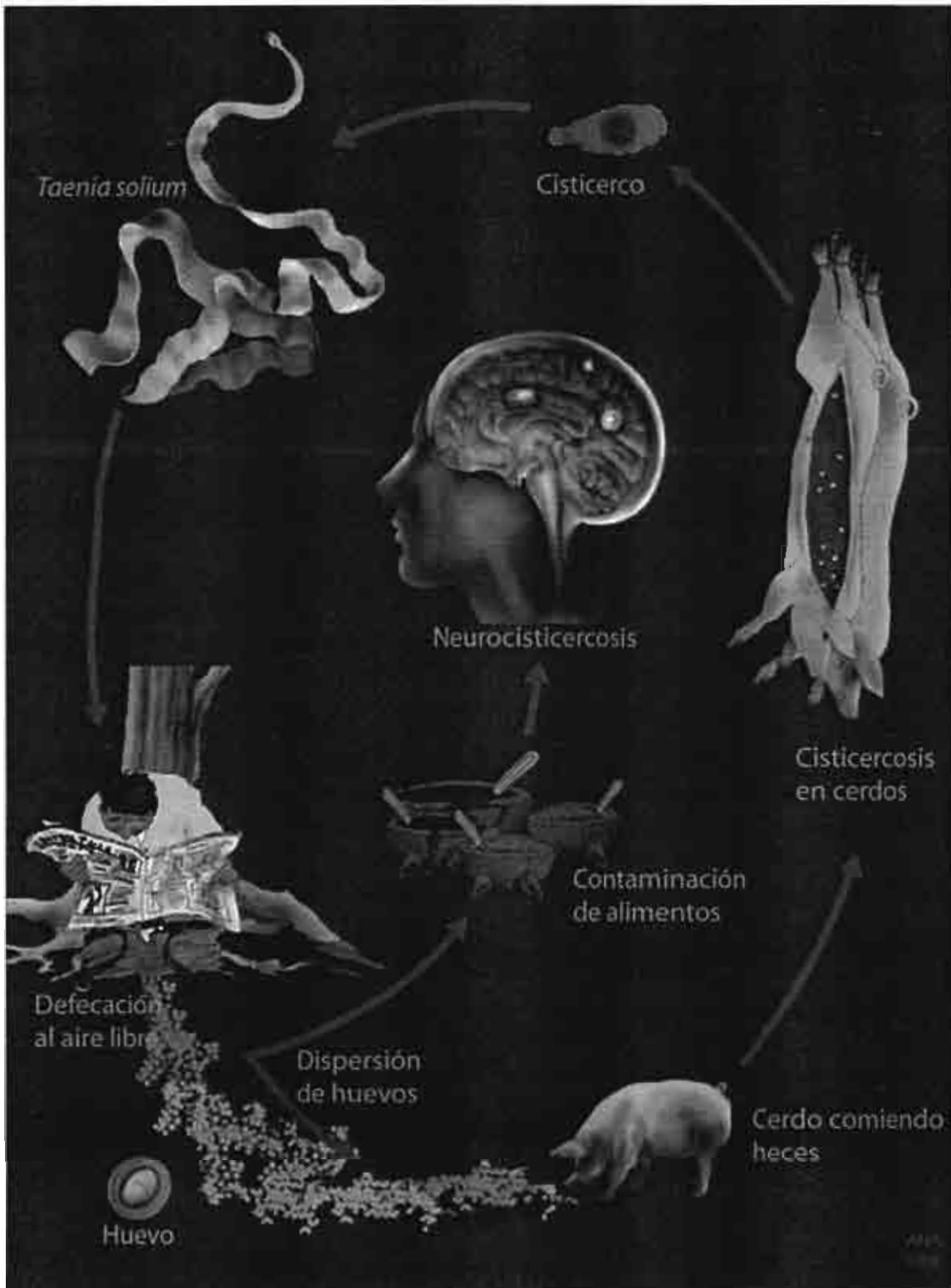


Figura 1. Ciclo de vida de *Taenia solium*.

Tomado de [http://www-lab.biomedicas.unam.mx/cistimex/s5\\_5.html](http://www-lab.biomedicas.unam.mx/cistimex/s5_5.html)

## **c) Epidemiología de la cisticercosis**

### *c.1) Humana*

La cisticercosis es endémica en varios países de América Latina, Asia y África (Figura 2). La prevalencia de cisticercosis es muy variable, ya que depende de factores socioeconómicos y culturales. Las áreas endémicas se localizan principalmente en las comunidades rurales, donde habitan frecuentemente personas de bajos recursos económicos; sin embargo, también puede encontrarse entre las personas de las clases medias y altas urbanas. En México, estudios de autopsia reportan una prevalencia de neurocisticercosis de 2.1% a 3.6% (Márquez y Austria 1969; Villagrán y Olvera 1988) y un índice de morbilidad de 5.6% (Flisser *et al.*, 1980). El último estudio seroepidemiológico realizado en México mostró una seropositividad promedio de 1.2%, lo cual indica que la población presenta un alto contacto con el parásito (Larralde, *et al.*, 1992). Actualmente, estudios epidemiológicos reportan una prevalencia de neurocisticercosis de hasta 9% en comunidades rurales de nuestro país, en donde persisten las condiciones de vida que permiten y mantienen la transmisión de esta parasitosis (Fleury, *et al.*, 2003; 2006).

### *c.2) Porcina*

La cisticercosis porcina se presenta principalmente en cerdos criados en condiciones rurales, que tienen alta probabilidad de entrar en contacto con el excremento del humano teniásico. Los cerdos criados en estas condiciones no son frecuentemente sometidos a inspección sanitaria y son consumidos directamente por su productor o enviados a mercados clandestinos. La falta de

control sanitario de la carne de cerdo favorece el manejo y consumo de carne infectada, insuficientemente cocida o cruda, prácticas que aumentan la probabilidad de adquirir la infección.



Figura 2. Mapa de prevalencia de la cisticercosis en el mundo.

Tomado de Flisser *et al.*, 2006.

Las prevalencias que se reportan con base en el número de cerdos que llegan a los rastros tecnificados no reflejan el número de animales criados en condiciones rústicas y sacrificados de manera clandestina. Reportes por inmunoelctrotransferencia indican una frecuencia que va de 1.4 a 4.0%, y por inspección en la lengua es de 4.1 a 7.0% (Sarti, E. 1997). Esta parasitosis es relevante por las pérdidas económicas que afectan a la porcicultura, debido al

decomiso de las canales infectadas y principalmente porque permite el mantenimiento y la continuidad del ciclo de vida del parásito.

#### **d) Modelo de cisticercosis experimental murina por *Taenia crassiceps***

*Taenia crassiceps* es un metacéstodo que infecta de forma natural a los zorros rojos (*Vulpes vulpes*), lobos (*Canis lupus*) y otros pequeños roedores reportados en Europa y Ontario. La forma larvaria o cisticerco se reproduce por gemación, en la zona opuesta al escólex, cuando el hospedero intermediario es infectado experimentalmente con huevos, éstos son ingeridos y se desarrollan como metacéstodos en la fascia, el tejido muscular, peritoneal, el riñón, pericardio, etc; sin embargo, cuando se infecta por inoculación intraperitoneal, los parásitos quedan confinados en la cavidad abdominal.

El modelo de cisticercosis experimental murina por *T. crassiceps* (Freeman, 1962) tiene un ciclo de vida similar al de *T. solium*, siendo sus hospederos intermediarios un conjunto extenso de roedores y sus hospederos definitivos los cánidos y felinos (Figura 3).

Los cisticercos y las tenias de *Taenia crassiceps* y *Taenia solium* presentan una estructura macroscópica similar; sin embargo, los cisticercos de *T. crassiceps* son más pequeños y se reproducen por gemación polar en la cavidad peritoneal del ratón, ofreciendo una importante fuente de antígenos obtenidos en condiciones experimentales controladas, después de aproximadamente 2-3 meses de infección.

Debido a que los antígenos de *T. crassiceps* y *T. solium* presentan una extensa reactividad cruzada (Larralde, *et al.*, 1989), ha sido posible la utilización

de los antígenos de *T. crassiceps*, para el diseño y la evaluación de una vacuna contra la cisticercosis causada por *T. solium* (Valdez, *et al.*, 1994).

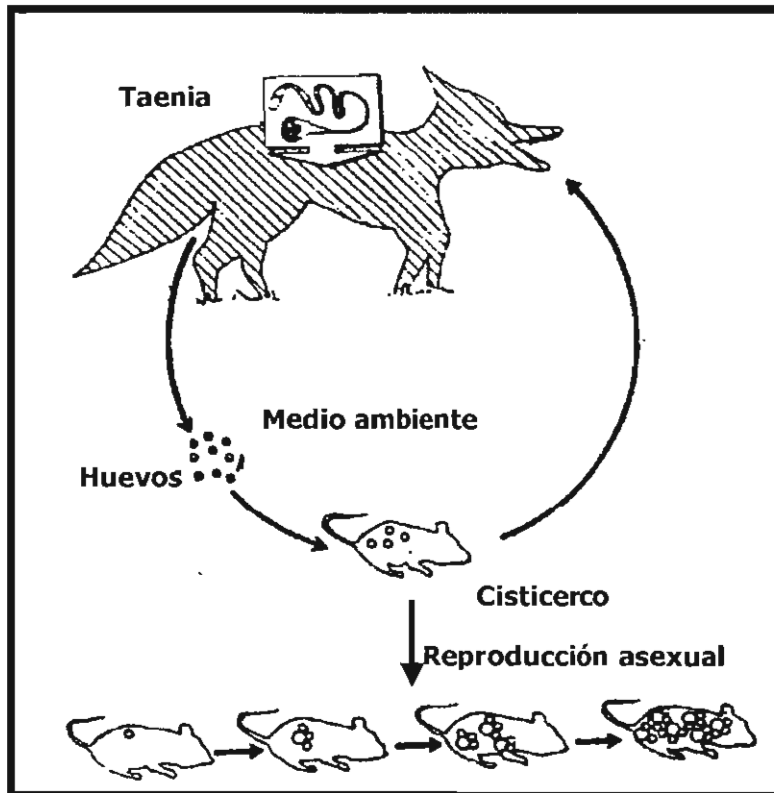


Figura 3. Modelo experimental de cisticercosis murina por *Taenia crassiceps*.

Tomado de Sciutto, *et al.*, 1996.

### e) Vacunas contra la cisticercosis

La teniasis-cisticercosis por *T. solium* constituye una infección parasitaria del humano y el cerdo que afectan la salud humana y la economía en países en desarrollo de América Latina, Asia y África (Boa, *et al.* 2003; Carabin, *et al.* 2006; Sciutto, *et al.* 2000; Phiri, *et al.* 2003), por lo que es necesario el desarrollo de medidas efectivas para su control. Una de éstas es la vacunación contra la cisticercosis porcina, debido a que el cerdo es el hospedero intermediario

indispensable para la continuidad del ciclo de vida de este parásito (Figura 4) (Sciutto, *et al.*, 2000). La vacunación del cerdo podría reducir o eliminar la contaminación del medio ambiente con huevos de *T. solium*, y por consiguiente su transmisión al cerdo (hospedero intermediario) y el humano (hospedero definitivo), causando la cisticercosis o neurocisticercosis, respectivamente (González, *et al.* 2005; Huerta, *et al.* 2001), por lo que ésta sería una medida preventiva y de control contra esta parasitosis.

En México, el primer intento de vacunación reportado consistió en la inmunización de cerdos utilizando un extracto total de cisticercos de *T. solium*. Los resultados mostraron una reducción de la infección de 74% (Molinari, *et al.*, 1983). Estudios posteriores han identificado, aislado y producido antígenos nativos o recombinantes que inducen un nivel de protección de 42-100% en la capacidad de reducción del número esperado de parásitos (Sciutto, *et al.*, 2008).

No se conocen con precisión los antígenos de las diferentes especies de tenias; sin embargo, se sabe que existen antígenos compartidos o de reacción cruzada entre *T. solium*, *T. crassiceps*, *T. saginata* y *T. ovis* en los diferentes estadios de su ciclo de vida, en la oncosfera, cisticerco y tenia (Sciutto *et al.*, 2008). Por lo tanto, se han evaluado diferentes preparaciones antigénicas, como el extracto total, fluido vesicular, antígenos semipurificados, recombinantes o sintéticos en experimentos de vacunación homóloga y heteróloga; la mayoría de éstos se han realizado en condiciones experimentales (Cai, *et al.* 2001; Flisser, *et al.* 2004; Gonzalez, *et al.* 2005; Manoutcharian, *et al.* 2004; Molinari, *et al.* 1997; Nascimento, *et al.* 1995; Plancarte, *et al.* 1999; Wang, *et al.* 2003) y muy pocos en condiciones naturales de infección. Para determinar la eficacia de la vacunación

contra la infección, se requiere evaluar las vacunas propuestas requieren en cerdos rústicos criados naturalmente, mal alimentados y en condiciones de alta exposición a otras parasitosis (Tabla 1) (Sciutto, *et al.*, 2008).

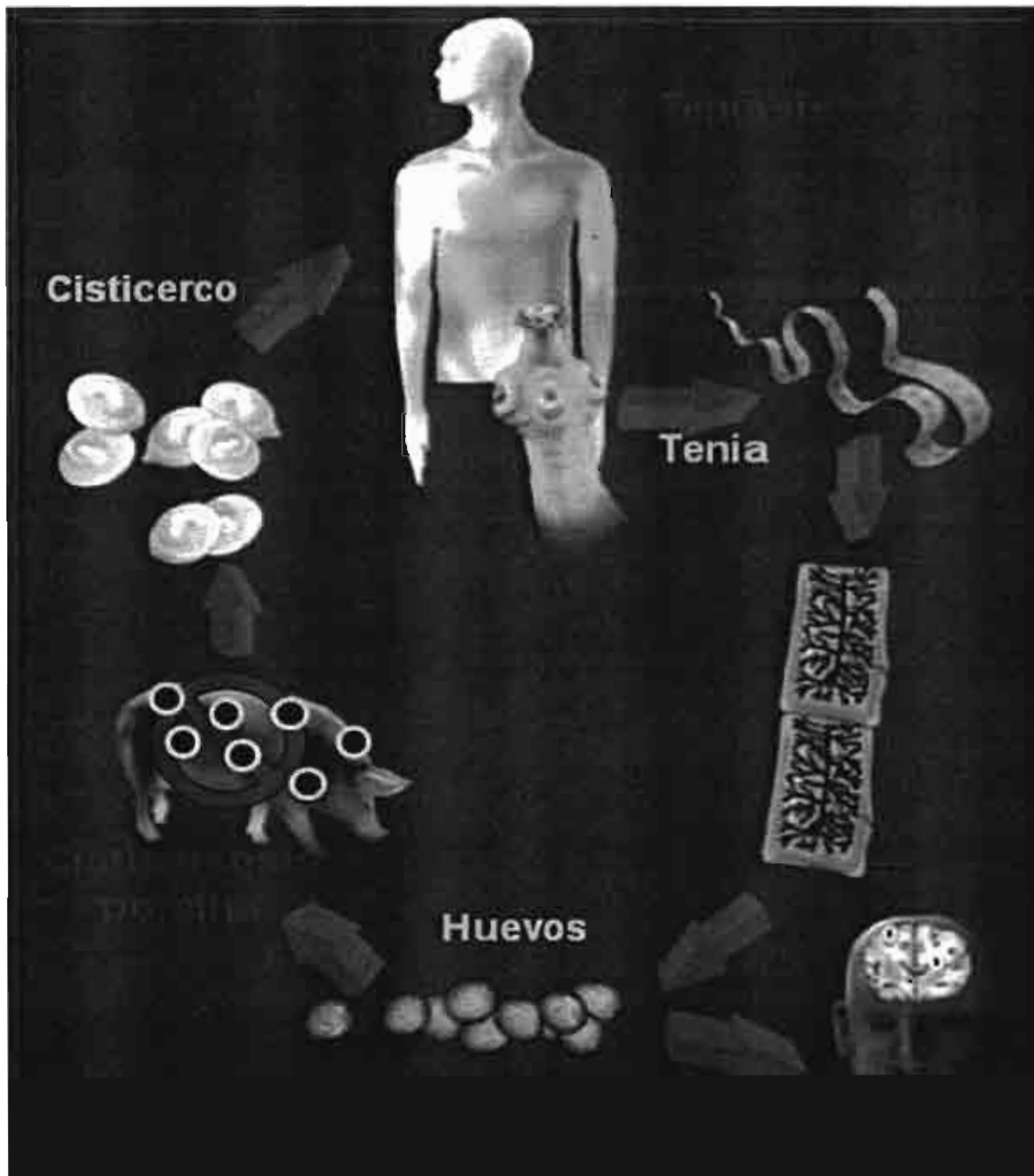


Figura 4. Interrupción del ciclo de vida de *T. solium*.

Tomado de Flisser *et al.*, 2006.



Tabla 1. Experimentos de vacunación contra la cisticercosis porcina. Tomado de Sciutto *et al.*, 2008.

Antígeno + adyuvante	Nivel de protección (% reducción) en el número de parásitos	Evaluación
Antígenos de secreción/ excreción de <i>T. solium</i> + ACF*	95	Experimental
Extracto de cisticercos de <i>T. solium</i>	74	Campo
Oncosferas congeladas de <i>T. saginata asiática</i> (Indonesia) +ACF*	98-99	Experimental
Oncosferas congeladas de <i>T. saginata asiática</i> (Taiwán) +ACF*	99	Experimental
Oncosferas congeladas de <i>T. solium</i> + ACF*	99-100	Experimental
Extracto de cisticerco de <i>T. solium</i>	82-100	Campo
Extracto de escólex de <i>T. solium</i> + AIF**	71	Experimental
Extracto de escólex de <i>T. solium</i> + <i>Corynebacterium parvum</i>	75	Experimental
Tres péptidos sintéticos de <i>T. crassiceps</i> + S <sup>§</sup>	98	Campo
TSO18-GST + Quil A	100 y 99	Experimental
TSOL45-1A-GST + Quil A	0 y 97	Experimental
TSO18-GST + TSOL45-1A-GST + Quil A	95	Experimental
Proteínas de 56, 66 y 74 kDa de <i>T. crassiceps</i> + ACF*	86 y 97	Experimental
Péptidos KETc1 + KETc7 + KETc12 + GK1 de <i>T. crassiceps</i> expresados en fagos filamentosos	42, 89, 95 y 97	Experimental

\*ACF: Adyuvante Completo de Freud; \*\*AIF: Adyuvante Incompleto de Freud; §S: Saponina.

Otra alternativa para inducir protección contra la cisticercosis porcina ha sido la vacunación génica con ADN. En la Tabla 2 se indican los estudios realizados al respecto; como se observa, el antígeno B y la proteína cC1 de *Taenia solium* induce en condiciones experimentales de 73 a 99% de protección.

Tabla 2. Evaluación de la vacunación génica contra la cisticercosis porcina experimental por *T. solium*. Tomado de Sciutto, *et al.*, 2008.

Fuente antigénica	Nivel de protección (%)
Antígeno B /PV93*	85-99
Proteína **cC1 de cisticerco de <i>T. solium</i> / pcDNA3	73
**Cc1/pcDNA3 + (GST-cC1+FIA)	A las 6 semanas después del desafío, 85 A las 12 semanas después del desafío, 77 A las 20 semanas después del desafío, 72-79
Antígeno B de <i>T. solium</i> / pcDNA3	92.6

\* Vector PV93 \*\*Proteína cC1 de 37 kDa, aislada de una biblioteca de expresión de cisticercos de *T. solium*.

La vacuna S3Pvac, constituida por los péptidos sintéticos, KETc1, KETc12 y KETc7, obtenidos de la secuencia de ADN complementario de *T. crassiceps* (Manoutcharian *et al.*, 1996) e identificados en las tres etapas del desarrollo de *T. solium*, oncosfera, cisticerco y tenia, ha sido ampliamente evaluada contra la cisticercosis experimental murina y porcina, esta última en condiciones naturales de infección, y ha inducido altos niveles de protección (Huerta, *et al.*, 2001; Rosas, *et al.* 1998; Sciutto, *et al.*, 2007; Toledo, *et al.*, 1999; 2001). Recientemente, la vacuna S3Pvac expresada en fagos filamentosos (S3Pvac-

Fago) fue evaluada en comunidades del estado de Morelos, y los resultados mostraron una efectividad de 100% en la reducción del número de parásitos esperados (Tabla 3) (Morales, *et al.*, 2008). Una de las principales desventajas de la vacuna S3Pvac sintética es su alto costo; la expresión de la vacuna en fagos filamentos reduce los costos (Diaz, *et al.*, 2003; Morales, *et al.*, 2008), pero tiene los inconvenientes de que debe inactivarse, administrarse por vía parenteral y conservarse en refrigeración.

Tabla 3. Evaluación de la vacuna S3Pvac sintética y S3Pvac-Fago, contra la cisticercosis porcina en condiciones naturales de infección. Tomado de Sciutto, *et al.*, 2008.

Municipio/ Estado	Vacuna	No. Cerdos	% Cerdos protegidos	% Reducción en el número de parásitos
Huatlatlauca Tepezezintla, Puebla	S3Pvac sintética	240	50*	97 (66565/1364)*
Cuentepec, Morelos.	S3Pvac-Fagos	166	70**	100 (29/0)**

\* Porcentaje de cerdos inspeccionados por necropsia con cero parásitos. \*\* Porcentaje de cerdos no cisticercosos por inspección en lengua. \*Número total de cisticercos recuperados de 120 cerdos controles/120 vacunados. \*\* y en 20 cerdos controles/vacunados.

Tabla 4. Proteínas expresadas en plantas transgénicas de interés veterinario. Tomado de Streatfield, *et al.*, 2003.

Patógeno/ hospedero	Antígeno	Planta	Via de inmunización	Especie inmunizada	Referencia
Virus de la rabia/ humano y animal doméstico	Glicoproteína	Jitomate	No publicado	No publicado	McGarvey, <i>et al.</i> , 1995
	Proteína VP60	Papa	sc im	Conejo	Castanon, <i>et al.</i> , 1999
Virus hemorrágico/conejo	Proteína VP6	Papa	ip	Ratón	Matsumura, <i>et al.</i> , 2002
	Proteína VP1	Arabidopsis	ip	Ratón	Carrillo, <i>et al.</i> 1998
Rotavirus Albovino	Proteína VP1	Papa	ip	Ratón	Carrillo, <i>et al.</i> , 2001
Virus de la fiebre aftosa/animal	Péptido VP1- β-glucuronidasa	Alfalfa	ip	Ratón*	DussSantos, <i>et al.</i> , 2002
Virus de la fiebre aftosa/animal	Glicoproteína S	Arabidopsis	im	Ratón	Gómez, <i>et al.</i> , 1998
Virus de la gastroenteritis/cerdo	Glicoproteína S	Papa	Oral	Ratón	Gómez, <i>et al.</i> , 2000
Virus de la gastroenteritis/cerdo	Glicoproteína S	Tabaco	ip	Cerdo	Tuboly, <i>et al.</i> , 2000
Virus de la gastroenteritis/cerdo	Glicoproteína S	Semillas de Maiz	Oral	Cerdo*	Streatfield, <i>et al.</i> , 2001 Lamphear, <i>e. al.</i> , 2002

\*con capacidad protectora ante la infección. sc: subcutáneo; im: intramuscular; ip: intraperitoneal

**f) Plantas transgénicas para la producción de antígenos recombinantes de interés para vacunación.**

La expresión de antígenos para la producción de vacunas en plantas transgénicas se considera un sistema de inmunización seguro y efectivo, que puede evitar algunas de las dificultades asociadas con los métodos tradicionales de vacunación, así como una reducción en los costos de producción, distribución y conservación. Entre las proteínas expresadas en plantas transgénicas para efectos de vacunación contra enfermedades de interés humano se encuentran el ántrax, la diabetes, la caries dental y la hepatitis B (Thanavala, *et al.*, 1995), además de la expresión de un anticuerpo que reconoce a células cancerosas de pulmón, mama y colon para utilizarse en el diagnóstico y la terapia contra el cáncer (Stoger, *et al.*, 2000). Este sistema de expresión también se ha utilizado para producción de vacunas de interés veterinario contra el cólera, la rabia, la fiebre aftosa y la gastroenteritis porcina. Sin embargo, no se tienen reportes sobre la expresión de antígenos de parásitos gastrointestinales (Tabla 4) (Featherstone, C. 1996; Haq, *et al.*, 1995; Poirier, *et al.*, 1995; Streatfield, *et al.*, 2003; Thanavala, *et al.*, 1995).

Las ventajas que presenta la expresión de proteínas recombinantes en plantas transgénicas para la producción de vacunas con respecto a otros sistemas de expresión, como bacterias, levaduras y baculovirus, son las siguientes:

- a) Permiten escalar su producción a muy bajos costos.
- b) La expresión de antígenos puede ser constitutiva o tejido-específica.
- c) La expresión de transgenes únicos o múltiples.

- d) Capacidad para llevar a cabo modificaciones posttraduccionales típicos de células eucariotas.
- e) Expresión de antígenos altamente estables en semillas, en ausencia de refrigeración.
- f) Eliminación de la etapa de purificación y seguridad en su aplicación, debido a la ausencia de toxinas bacterianas.
- g) Administración por vía intraperitoneal, intranasal, sistémica, subcutánea u oral.
- h) Elimina el costo de jeringas.
- i) No requiere de personal capacitado para su aplicación.

Por otra parte, uno de los problemas limitantes que presenta este sistema de expresión ha sido la variabilidad en el nivel de expresión de las proteínas recombinantes (Chargelegue, *et al.*, 2001), que puede variar dependiendo de:

- a) Las propiedades *per se* de la proteína expresada.
- b) El tipo de promotor utilizado: constitutivo, inducible, tejido o etapa-específico.
- c) La especie de planta y tipo de explante a transformar.
- d) El sistema de transformación empleado, *Agrobacterium* o biobalística.
- e) Si la integración es nuclear o dirigida a algún organelo (cloroplasto o mitocondria).
- f) La optimización del sistema de cultivo y regeneración a utilizar.

Además, uno de los principales cuestionamientos de este sistema de expresión ha sido la capacidad que pueda tener el antígeno administrado por vía oral para inducir una respuesta inmune específica, sin llegar a causar una tolerancia inmune. Para controlar este tipo de respuesta es importante considerar algunos factores intrínsecos de cada antígeno, como serían su clase, su estabilidad y la especie vegetal donde se va a dirigir su expresión. En este sentido, el tabaco se ha utilizado como modelo experimental de transformación y expresión; sin embargo, se ha ido ampliado la utilización de otras especies como el jitomate, la lechuga, la papa, el maíz, la soya, la alfalfa, *Arabidopsis*, la papaya y la zanahoria (Floss, *et al.*, 2007; Rosales- Mendoza, *et al.*, 2008; Sala, *et al.*, 2003; Streatfield, *et al.*, 2003; 2006; Tacket, C. O. 2005; Walmsley, A. M. and Arntzen, C. J. 2000). En algunas de estas especies, los antígenos recombinantes

expresados han mostrado eficacia al ser evaluados en grupos experimentales o directamente en la especie afectada. Por ejemplo, el de la hepatitis B y la toxina del cólera (Streatfield, *et al.*, 2003). Otros antígenos han inducido una respuesta inmune con la producción de anticuerpos IgG, IgM o IgA, independientemente de que la vía de administración sea intraperitoneal, subcutánea, intranasal u oral (Streatfield, *et al.*, 2003).

El estudio más relevante de interés veterinario ha sido la expresión de la glicoproteína S del virus de la gastroenteritis porcina en semillas de maíz para la producción de una vacuna oral, la cual ha mostrado capacidad para inducir protección, a través del calostro, en lechones (Lamphear, *et al.*, 2002; Streatfield *et al.*, 2001).

Es importante mencionar que para expresar los antígenos recombinantes de interés en células vegetales para la producción de vacunas será necesario:

- 1) Caracterizar la variabilidad en la producción del antígeno recombinante, como se realiza para los sistemas de expresión en bacterias, levaduras o cultivos celulares.
- 2) Caracterizar y determinar la estabilidad de los antígenos recombinantes.
- 3) Confirmar la ausencia de toxicidad.
- 4) Demostrar que su administración presenta seguridad y eficacia.



**g) Especies vegetales para la producción de clonas transgénicas que expresen los péptidos recombinantes KETc1, KETc12 y KETc7 del cisticerco de *T. crassiceps*.**

Para llevar a cabo la producción de clonas transgénicas que expresaran los péptidos recombinantes KETc1, KETc12 y KETc7 del cisticerco de *T. crassiceps* se utilizaron las siguientes especies vegetales; maíz (*Zea mays* de la línea LPC-13), sorgo (*Sorghum bicolor*), zanahoria (*Daucus carota* vr. nantes) y papaya (*Carica papaya* L). Las propiedades de cada una se indican en la Tabla 5.

En la expresión de antígenos para vacunación en semillas de maíz transgénico se reporta la expresión de la subunidad B de la enterotoxina lábil al calor de *Escherichia coli* y la toxina del cólera, que en ratones mostraron una respuesta inmune específica por vía sistémica y a nivel de las mucosas (Chikwamba, *et al.*, 2002); la proteína de la punta del virus de la gastroenteritis, que induce una respuesta inmune protectora (Lamphear, *et al.*, 2002), y la glicoproteína G del virus de la rabia, que al ser administrada por vía oral en ratones ha estimulado la producción de anticuerpos neutralizantes que protegieron 100% ante el desafío (Loza-Rubio, *et al.*, 2008). Por otra parte, la proteína F del virus de Newcastle en semillas de maíz, al ser administrada a pollos, estimuló la producción de anticuerpos protectores ante el desafío viral, y dicha protección fue comparable a la que confiere la vacuna comercial (Guerrero-Andrade, *et al.*, 2006).

Tabla 5. Características de las especies vegetales a transformar para la producción de una vacuna contra la cisticercosis.

Características/planta	Maíz	Sorgo	Zanahoria	Papaya
Tipo de consumo humano/animal	Si	Si	Si	Si
Capacidad embriogénica	Media	Media	Alta	Media
Eficiencia de transformación	Media	Media	Alta	Media
Expresión de transgenes	Baja	Baja	Baja	Alta
Tiempo de propagación	2 meses	2 meses	1 mes	2 meses
Tiempo de regeneración	1 año	1 año	6 meses	1 año
Tipo de regeneración	Definitiva	Definitiva	Reversible	Definitiva
Expresión de antígenos para vacunación	Si (3)*	No	Si (4*)	No



\*Número de reportes en la literatura

Por otra parte, la producción de plantas transgénicas de zanahoria ha sido de interés para el desarrollo de una vacuna para la prevención y el tratamiento contra la infección por *Helicobacter pylori*, a través de la expresión de la proteína codificada por el gen UreB. Dicha proteína mostró inducir una respuesta inmune en ratones (Zhang, *et al.*, 2010). Asimismo, la administración por vía oral de zanahorias transgénicas que expresan la subunidad B de la toxina lábil al calor de *E. coli* estimuló en ratones una respuesta inmune específica, sistémica y a nivel de las mucosas (Rosales-Mendoza, *et al.* 2008). La expresión de dos poliepítopos: el primero que combina repeticiones del epítipo de células B (H386-400) de la hemaglutinina y un epítipo no relacionado de células T del virus del sarampión (tt830-400), al ser administrados a ratones por vía intraperitoneal indujo un alto título de anticuerpos que neutralizaron aislados de diferentes genotipos y orígenes geográficos (Bouche, *et al.*, 2003), y el segundo, el poliepítipo recombinante (L4T4) de células T estimuladas por el toxoide tetánico ("T", tt830-844), se utilizó para inmunizar ratones por vía intraperitoneal e indujo la producción de anticuerpos neutralizantes contra el virus (Bouche, *et al.*, 2005).

Con respecto a la producción de vacunas en plantas transgénicas de sorgo no existen reportes previos, mientras que para la papaya los primeros resultados publicados fueron los obtenidos durante el desarrollo de este trabajo de tesis (Hernández, *et al.*, 2007).

## **h) Selección de la especie vegetal transgénica para la producción de una vacuna contra la cisticercosis**

Aunque los cuatro sistemas vegetales descritos resultan de interés para el desarrollo de una vacuna contra la cisticercosis, considerando las ventajas, desventajas, experiencia en el área de transformación y producción de plantas transgénicas, se decidió seleccionar la papaya para continuar el desarrollo de este trabajo, haciendo un estudio más amplio a través de la caracterización molecular y bioquímica de las clonas transgénicas obtenidas, así como la evaluación de su capacidad protectora contra la cisticercosis.

## **i) Generalidades del cultivo de la papaya (*Carica papaya L.*)**

Reino: Vegetal

División: Embryophyta Sifónogama

Subdivisión: Angiosperma

Clase: Dicotiledónea

Subclase: Arquiclamidea

Orden: Parietales

Familia: Caricáceas

Género: *Carica*

Especie: *C. papaya L.*

Tipo Morfológico: Arbóreo

Clima: Tropical ecuatorial

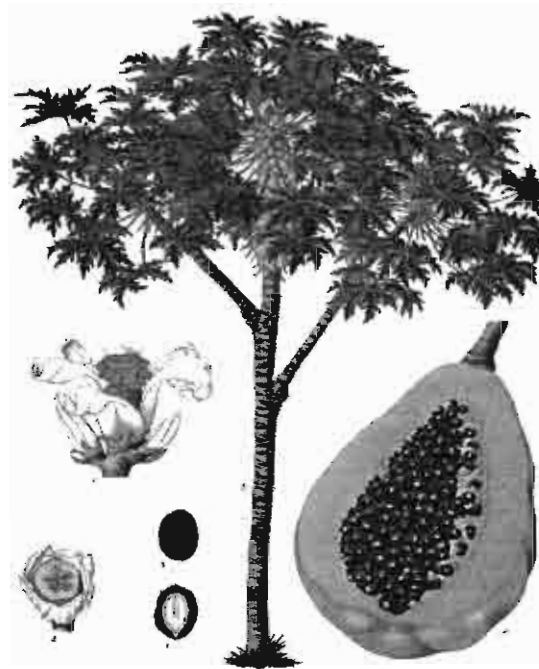


Figura 5. Árbol de papaya (*Carica papaya* L).

Tomado de: <http://www.agronet.com.mx>

La papaya es una especie pantropical que en la actualidad se cultiva en todas las regiones tropicales de América (desde México hasta Argentina), África y Asia. La planta es originaria de Mesoamérica (sur de México, Centroamérica, Costa Rica, Brasil. Cerca de 64% de la producción se concentra en Brasil, Nigeria, la India y México, y los principales importadores son: Estados Unidos, Japón, Hong Kong y la Unión Europea ([www.angelfire.com/planet/agribolivar/papaya](http://www.angelfire.com/planet/agribolivar/papaya)).

A la papaya se le conoce con diferentes nombres comunes como son: capaidso (Culima), naimi (Amahuaca), nampucha (Pano), paque (Amuesha), pucha (Shipibo-Conibo), fruta bomba (Cuba), lechosa (Puerto Rico), mamac (Caribe), melón zapote, papaya de mico, pawpaw (inglés). La papaya es una planta arborecente de crecimiento rápido, de tallo sencillo o algunas veces ramificado, puede tener de 2-10 m de altura, su tronco es recto, cilíndrico, suave,

esponjoso-fibroso, jugoso, hueco, de color gris o café grisáceo, de 10-30 cm de diámetro y endurecido por la presencia de cicatrices grandes y prominentes causadas por la caída de sus hojas e inflorescencias (Figura 5). La papaya es una planta semipermanente que crece en zonas con una pluviometría media de 1800 mm anuales y una temperatura media anual de 20-22 °C, si no tiene la cantidad suficiente de calor, se desarrolla mal y los frutos no llegan a madurar. Las noches frescas y húmedas ocasionan que la fruta madure lentamente y resulte de mala calidad. Debido a que la papaya se reproduce por semilla, se ha logrado desarrollar un gran número de variedades, empleándose las mejor adaptadas a sus condiciones climatológicas. Las variedades mestizas son poco estables y se recomienda tener cuidado en obtener semillas de progenitores que pertenezcan a la misma variedad.

La fructificación de la papaya se produce a los 10 a 12 meses después del trasplante y se mantiene durante diez años, anualmente produce aproximadamente unos cincuenta frutos, de los cuales se consumen treinta y se dejan veinte para la próxima cosecha, siendo ésta la forma más común del cultivo de la papaya, que dependiendo del tipo de semillas que se utilicen para sembrar, si proceden de árboles femeninos fecundados con papayos masculinos o hermafroditas, se obtendrán distintos frutos ([www.infoagro.com/frutas/frutas\\_tropicales/papaya.htm](http://www.infoagro.com/frutas/frutas_tropicales/papaya.htm)).

La papaya es un fruto conocido por sus beneficios nutricionales y aplicaciones medicinales, contiene vitamina A, C, complejo B, potasio, magnesio, fibra, ácido fólico, niacina, tiamina, riboflavina, pequeñas cantidades de calcio y hierro, su coloración anaranjada, se debe a su alto contenido en beta carotenos

(Tabla 6). El fruto, las hojas y la raíz, son utilizadas para diversas aplicaciones medicinales.

La papaya contiene diversas enzimas con actividad proteolítica, como la papaína que posee capacidad para neutralizar los ácidos gástrico, similar a la actividad de la pepsina que es otra enzima que se encuentra en el jugo gástrico. También contiene la carpaína, alcaloide que actúa sobre el líquido biliar y que junto con la papaína, ayudan a mejorar y facilitar el proceso de digestión y la quema de grasas, produciendo un efecto adelgazante, desintoxicante y depurativo de forma natural. Ambas enzima, la papaína y pepsina, también digieren las pectinas, ciertos azúcares y lípidos. En terapias digestivas, se les utiliza para compensar la falta de secreciones gastroduodenales y pancreáticas.

Tabla 6. Composición por cada 100 g de fruta comestible.

Calorías	26.5
Hidratos de carbono	6.3 g
Fibra	1.9 g
Potasio	211 mg
Magnesio	8 mg
Provitamina A	97.5 mcg*
Vitamina C	82 mcg*
Acido fólico	1 mcg*

\*microgramos. Tomado de: [http://www.reddelcampo.net/redcampo/index.php?option=com\\_content&view=article&id=156](http://www.reddelcampo.net/redcampo/index.php?option=com_content&view=article&id=156)

Otro compuesto importante de la papaya es el látex, que está constituido por 4 enzimas cistein proteinasas: la papaína, quimopapaína, caricaína y glicil endopeptidasas, las cuales se reporta que proporcionan un mecanismo de defensa del árbol de papaya contra diferentes insectos herbívoros (Moussaoui, *et al.*, 2001; Kohno, *et al.*, 2004) y en menor cantidad contiene las enzimas quitinasa clase II y III, un inhibidor de serin proteasas, una glutamil ciclotransferasa, beta-1,3-glucanasa y una cistatina que aún no ha sido posible aislar (Azarkan, *et al.*, 2003).

Entre las propiedades terapéuticas que se le han atribuido se encuentran las siguientes:

- Digestiva: Combate el estreñimiento ya que actúa como un laxante suave.
- Cicatrizante: Agiliza cicatrizaciones externas e internas (por ejemplo; las úlceras gástricas).
- Facilita el bronceado debido a su alto contenido de retinina, que facilita la acción de la melanina.
- Refuerza la inmunidad gracias a su alto contenido en vitamina C.
- Activadora de jugos pancreáticos, como la lipasa pancreática (Abdelkafi, *et al.*, 2009).
- Anticonceptiva a grandes dosis.
- Las semillas presentan actividad occitócica y vermífuga, que permite la eliminación de parásitos intestinales, actividad que se le atribuye específicamente a la actividad de la carpasemina (Okeniyi, *et al.*, 2007)
- Acción de analgésico, antibiótico, antibacterial, cardiotónico, digestivo, emenágogo, febrífugo, hipotensivo.



- Contienen un alcaloide llamado "carpaína" al que se le atribuyen propiedades cardiotónicas.
- La papaína ayuda a diluir tumores cancerosos y linfáticos, [http://www.huldaclarkzappers.com/papaya\\_cancer\\_cure.html](http://www.huldaclarkzappers.com/papaya_cancer_cure.html).
- El contenido de acetogeninas ha mostrado tener actividad contra parásitos, algunos virus, hongos y varias líneas celulares cancerosas [http://www.huldaclarkzappers.com/papaya\\_cancer\\_cure.html](http://www.huldaclarkzappers.com/papaya_cancer_cure.html).
- Desinflamatorio en casos de infecciones y traumatismos.
- Elimina materias proteicas causadas por derrames (hematomas y líquidos extravasados por golpes y contusiones).
- Espermaticida, las semillas del fruto maduro contienen principios activos que inhiben la producción espermática.

Por otra parte, también es importante mencionar que se ha sugerido que el consumo excesivo de la papaya puede inducir cáncer de próstata ([http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info\\_especies/arboles/doctos/23caric1m.pdf](http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/arboles/doctos/23caric1m.pdf)).

#### **j) Producción de plantas transgénicas de papaya (*Carica papaya L.*)**

El sistema de producción de plantas transgénicas de papaya presenta ventajas que favorecerían su utilización para la producción de vacunas, como es el contar con la optimización de su cultivo *in vitro*, propagación, transformación y regeneración. Además, la papaya es un sistema alternativo para la exploración de genomas de árboles tropicales, ya que contiene un genoma de 372 megabases (Mb), de herencia diploide con 9 pares de cromosomas y presenta el número de

genes más pequeño, 24,746 genes, comparada con los 4 genomas de plantas secuenciados hasta el momento, inclusive el de *Arabidopsis* que cuenta con 31,114 genes (Ming, *et al.*, 2008) (Tabla 7). El número de genes es 11-20 %, menos que el de *Arabidopsis*, 34 % menos que el arroz, 46 % menos que el alamo y 19 % menos que la uva (Wei, F., Wing, R. A., 2008).

Tabla 7. Genoma de plantas que ya han sido completamente secuenciados.

Genoma	<i>Carica papaya</i> SunUp	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Populus trichocarpa</i>	<i>Oryza sativa</i> (japonica)	<i>Vitis vinífera</i>
Tamaño en Mpb*	372	125	485	389	487
No. de cromosomas	9	5	19	12	19
No. de genes	24,746	31,114	45,555	37,544	30,434

\* Megapares de bases. \*\* El número de genes de *Arabidopsis* es basado en 27,873 proteínas codificadas y genes de ARN del website. The *Arabidopsis* Information Resource. ([http://arabidopsis.org/portals/genAnnotation/genome\\_snapshot.jsp](http://arabidopsis.org/portals/genAnnotation/genome_snapshot.jsp)) y recientemente la publicación de 3,241 nuevos genes ( Arumuganathan, K, and Earle, E. D. 1991) Tomado de Ming, *et al.*, 2008.

El sistema de producción de papaya transgénica se ha empleado principalmente para la expresión de proteínas recombinantes como marcadores de selección, con tolerancia a suelos ácidos, con un aumento en la prolongación de la vida de anaquel, en la evaluación de promotores inducidos por ABA (ácido absísico) e inducción de embriones somáticos en ausencia de hormonas, entre otros (Cabrera-Ponce, *et al.*, 1995; 1996; De la Fuente, *et al.*, 1997; López-Gómez, *et al.*, 2008; Rossi *et al.*, 1998). Otros grupos de investigación se han

concentrado principalmente, en la producción de plantas transgénicas de papaya resistentes a la infección por el virus de la mancha anular (Chiang, et al. 2001; Fuchs, M. and Gonsalves, D. 2007; Gonsalves, et al., 2002; Sakuanrungrasirikul, et al. 2005; Tripathi, et al. 2007; Ye, et al., 2003), debido a las pérdidas de cosechas y económicas que ocasiona dicho virus. Sin embargo, no ha sido utilizado para la expresión y producción de proteínas recombinantes para vacunación o con fines terapéuticos, aun considerando las propiedades biológicas y antiparasitarias que posee la papaya *per se*, principalmente de gran relevancia e interés para la prevención de enfermedades parasitarias intestinales causadas por céstodos. Por las características mencionadas, es de nuestro interés hacer uso de esta metodología como una alternativa novedosa para la producción de la vacuna S3Pvac para la prevención de la cisticercosis en clones transgénicos de papaya.

## VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

### a) Construcciones genéticas

#### a.1) Preparación de las construcciones KETc1, KETc12 y KETc7 para su clonación en el vector pUI235-5.2

El plásmido pUI 235-5.1 fue utilizado como vector de expresión constitutiva en tejidos vegetales. Este vector contiene el promotor CaMV 35S del virus del mosaico de la coliflor, la región de terminación del fago T7, sitios de clonación múltiple, el gen de resistencia a kanamicina y los bordes derecho e izquierdo del T-DNA (Hernández *et al.*, 2007). El vector fue proporcionado por el Dr. Luis Herrera Estrella del CINVESTAV, IPN, Unidad Irapuato.

Los ADNc que codifican para los péptidos KETc1, KETc12 y KETc7 fueron secuenciados para verificar que el codón de inicio (ATG) se encontraba en el contexto ANN ATG GCU NN, donde N es cualquier nucleótido requerido para optimizar el sitio de inicio de la transcripción para su expresión en células vegetales. Para los ADNc KETc1 y KETc12, fue necesario modificar la secuencia de nucleótidos, pero conservando la secuencia de aminoácidos. Por lo tanto, para cada péptido se sintetizaron dos oligonucleótidos para introducir por PCR las modificaciones necesarias en la región del codón de inicio (ATG). Además, en el extremo COOH-terminal se adicionó la secuencia de nucleótidos que codifican para seis residuos de histidina y los sitios de restricción *Bam*HI y *Eco*RI, necesarios para su clonación y subclonación en el plásmido pSK Bluescript y el vector de expresión pUI 235-5.1, respectivamente. No fue necesario modificar la secuencia del inserto KETc7, y el ADNc fue recuperado del vector pTc-sp7 por digestión *Bam* HI / *Xho* I (Rosas *et al.*, 1998).

*a.2) Clonación y secuenciación de las construcciones KETc1.6His-pSK Bluescript y KETc12.6 His-pSK Bluescript.*

Las construcciones KETc1.6His-pSKBluescript y KETc12.6His-pSK Bluescript fueron transformadas en células competentes *E. coli* DH-5 $\alpha$  y seleccionadas por resistencia a la ampicilina, aislándose 24 y 44 colonias transformantes, respectivamente. El plásmido de cada uno de los candidatos se purificó, y por digestión *Eco* RI / *Bam* HI, se confirmó el tamaño de los insertos; cinco plásmidos de cada construcción que contenían el inserto del tamaño esperado fueron secuenciados con la reacción de Termosecuensasa Versión 2.0.

*a.3) Subclonación, transformación y secuenciación de las construcciones KETc1.6His-pUI 235-5.1, KETc 12.His-pUI 235-5.1 y KETc7-pUI 235-5.1*

Una de cada una de las construcciones KETc1.6His-pSKBluescript y KETc12.6His-pSKBluescript verificadas por secuenciación se utilizaron para subclonar por digestión *Eco* RI/*Bam* HI en el vector pUI 235-5.1. El fragmento que codifica para KETc7 fue clonado empleando una reacción de rellenado para crear un sitio romo en el inserto. Las construcciones obtenidas se recuperaron de células competentes *E. coli* DH-5 $\alpha$ . Se aislaron 9, 15 y 10 colonias de las construcciones KETc1.6His, KETc12.6 His y KETc 7, respectivamente, las cuales fueron confirmadas por digestión. Los plásmidos que liberaron el inserto del tamaño esperado fueron secuenciados con Termosecuensasa Versión 2.0, para confirmar que cada uno de los péptidos estuviera en el marco de lectura correcto (Figura 6).

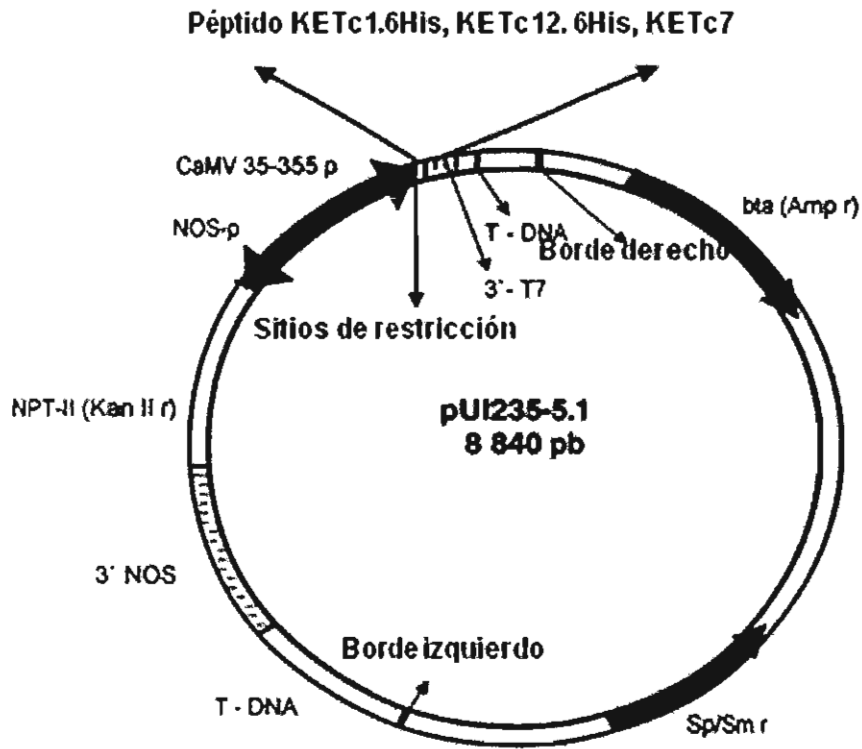


Figura 6. Mapa del vector de expresión pUI 235-5.1.

Se indica el sitio de clonación de cada uno de los péptidos en estudio.

**b) Transformación genética de callos embriogénicos de maíz, sorgo, zanahoria y papaya.**

Considerando la experiencia en el área de transformación y producción de plantas transgénicas de los Dres. José Luis Cabrera y Luis Herrera Estrella, inicialmente se evaluó la factibilidad de transformar maíz, sorgo, zanahoria y papaya para la recuperación de clones transgénicas que expresen los péptidos de interés.

*b.1) Inducción de callos embriogénicos.*

Maíz (*Zea mays* L.) y Sorgo (*Sorghum bicolor* L. (Moench))

La inducción de callos embriogénicos de maíz y de sorgo se llevó a cabo a partir de semillas maduras de la línea LPC-13 y semillas maduras de la variedad

esmeralda de la compañía Asgrow, respectivamente. Ambos tipos de semillas se germinaron en el medio MPC (O Connor-Sanchez *et al.*, 2002). La inducción de callos se derivó del meristemo apical en condiciones de luz, y después de dos meses de cultivo (fase de callos organogénicos) se procedió a inducir su transformación morfológica mediante un mes de cultivo en condiciones de oscuridad. Una vez establecida la condición embriogénica, los callos se propagaron por subcultivo en el mismo medio MPC por un mes más. Para llevar a cabo su transformación genética se utilizaron callos embriogénicos en fase globular.

#### Zanahoria (*Daucus carota L.*)

La inducción de callos embriogénicos se llevó a cabo con el uso de semillas de la variedad Nantes de la compañía Westar Seeds International. Las semillas se germinaron en el medio CARM (Fujimura, T. and Komamine, A. 1979), la inducción de callos se hizo sobre explantes de epicótilo, hipocótilo y ápice en condiciones de luz. Después de un mes de cultivo, los callos se propagaron en el medio CARM en condiciones de oscuridad a 25 °C, subcultivándose cada dos meses hasta obtener callos embriogénicos, de donde se seleccionaron embriones en fase globular.

#### Papaya (*Carica papaya L.*)

De un fruto hermafrodita de la variedad Maradol proporcionada por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) de Tabasco se obtuvieron las semillas, de las que en condiciones de esterilidad se

eliminó la sarcotesta para colocar los embriones en el medio de cultivo M10, que contiene las sales del medio Murashige and Skoog adicionado con el regulador de crecimiento ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) a una concentración de 10 mg/L de medio (Murashige, T. and Skoog, F. 1962). Este material se conservó en condiciones de oscuridad a 25 °C, subcultivándose cada dos meses hasta obtener callos embriogénicos, de donde se seleccionaron embriones en fase globular (Figura 7).



Figura 7. Callos embriogénicos de papaya

*b.2) Transformación por Biobalística o Sistema de Helio de alta presión.*

Para todas las especies, los callos embriogénicos en estadio globular se colocaron en el centro de una caja de Petri con medio osmótico, formando un círculo de aproximadamente 20 mm de diámetro; para el maíz y el sorgo se utilizó el medio MPC; para la zanahoria el medio CARM, y para la papaya el medio M10, adicionados con 2, 4-D a 10 mg/ L de medio, y sacarosa al 12%. En todos los casos se prepararon cuatro placas para transformar con cada una de las tres construcciones genéticas.



La transformación genética se realizó con el sistema de bombardeo de alta presión PDS-1000/He de la marca BioRAD (Figura 8), de acuerdo con el protocolo establecido por Sanford *et al.* (Sanford *et al.*, 1991; Tomes *et al.*, 1995) y modificado por Cabrera-Ponce *et al.* (Cabrera-Ponce *et al.*, 1995; 1997). Para la preparación las micropartículas de tungsteno se mezclaron 50  $\mu$ L de micropartículas resuspendidas a 15 mg/mL, 10  $\mu$ g del plásmido pBARGUS, que posee el gen BAR que confiere resistencia al herbicida Basta (Fromm *et al.*, 1990) o el plásmido pWRG1515, que confiere resistencia a la higromicina (Christou *et al.*, 1992), y ambos contienen el gen reportero para  $\beta$ -glucuronidasa, y 10  $\mu$ g de alguna de las construcciones, KETc1.6His-pUI 235-5.1, KETc12.6His -pUI 235-5.1 o KETc7-pUI 235-5.1, para transformar los callos de maíz y sorgo o zanahoria y papaya, respectivamente.

Por otra parte, las membranas acarreadoras se sumergieron en etanol absoluto durante 5 min, se colocaron sobre un papel absorbente, y cuando se encontraban secas a cada una se le colocó 10  $\mu$ L de la mezcla de micropartículas. Una vez secas, se colocaron en el equipo de transformación, con el que se realizó un disparo por placa. Para el maíz y el sorgo se utilizó una presión de 1200 psi, y para la zanahoria y la papaya una presión de 800 psi (Cabrera-Ponce *et al.*, 1995). A 12 mm de la membrana de ruptura y 70 mm de la muestra se colocó una malla de retención de 1000  $\mu$ m de diámetro, con el propósito de evitar que los explantes se desplazaran durante y después del impacto con las micropartículas (Figura 9).

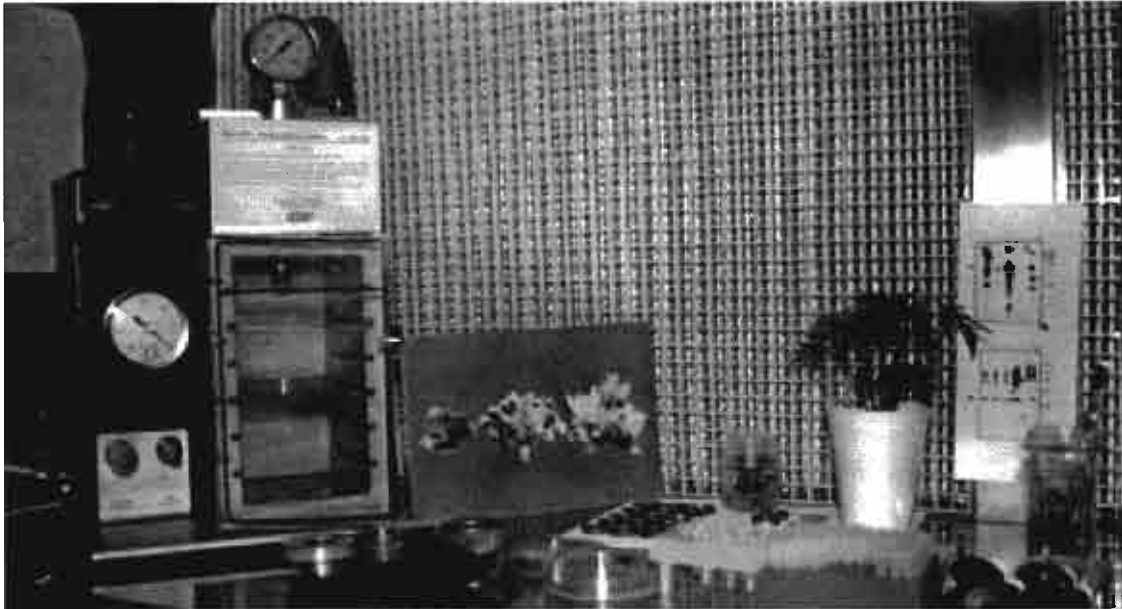


Figura 8. Sistema de bombardeo de alta presión PDS-1000/He de BioRad.

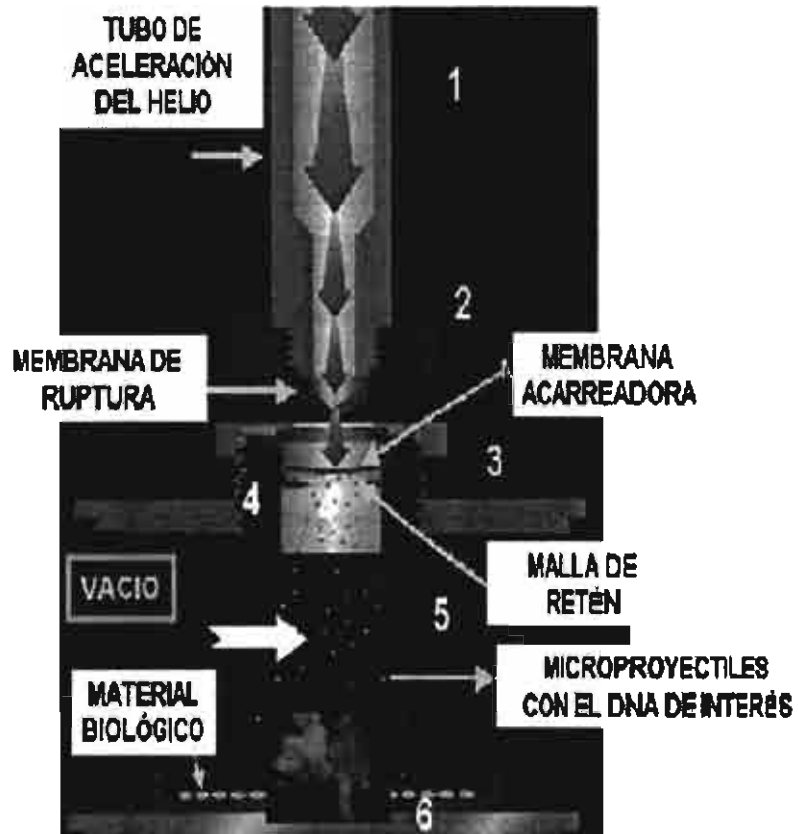


Figura 9. Sistema de transformación por biobalística.

### b.3) Tratamiento posterior al bombardeo

Los callos bombardeados se incubaron a 25 °C en oscuridad durante toda la noche. Posteriormente se colocaron en los medios MPC (maíz y sorgo), CARM (zanahoria) o M10 (papaya), en donde se conservaron durante tres semanas para su recuperación, en condiciones de oscuridad y a temperatura ambiente.

### c) Selección de clonas transgénicas

Los callos embriogénicos transformantes fueron seleccionados como se indica en la Tabla 8.

Tabla 8. Condiciones de selección de callos embriogénicos transformados.

Maíz	MPC*	25 °C oscuridad	4 /1
Sorgo	MPC*	25 °C oscuridad	4 /1
Zanahoria	CARM**	25 °C oscuridad	4 /1
Papaya	M10**	25 °C oscuridad	4 /2

\*Fosfotricina 3 mg/L, paromomicina o kanamicina 100 mg/L.

\*\* Higromicina 25 mg/L, paromomicina o kanamicina 100 mg/L.

#### c.1) Detección de la expresión del gen reportero ( $\beta$ -glucuronidasa)

En condiciones de esterilidad, en una placa de cultivo de 96 pozos (Nunc, Dynatech) se adicionaron 100  $\mu$ L/pozo del sustrato X-GLUC (ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil  $\beta$ -D-glucurónico) y se colocaron 5 embriones/pozo, incubándose a

25 °C en oscuridad durante 1-12 horas (Wakui *et al.*, 2004), hasta la aparición del color azul índigo que caracteriza la actividad del gen reportero de  $\beta$ -glucuronidasa.

#### **d) Propagación de clonas transgénicas**

El tejido embriogénico resistente al marcador de selección durante cuatro subcultivos fue aislado e identificado como clona transgénica, asignándosele un número consecutivo y propagado por subcultivos en medio selectivo a fin de aumentar su biomasa.

#### **e) Caracterización molecular de clonas transgénicas de papaya (*Carica papaya* L.)**

La caracterización molecular y bioquímica, así como la valoración inmunogénica, se continuó solamente con las clonas transgénicas de papaya, que de acuerdo con nuestra experiencia e interés resultó la especie vegetal más adecuada para los fines de esta investigación.

##### *e.1) Identificación del ADN y ARNm del transgén*

###### **e.1.1) Purificación de ADN genómico**

En un mortero congelado en nitrógeno líquido se pulverizan aprox. 100 mg de callos embriogénicos, de donde el ADN se purifica de acuerdo con el protocolo del sistema "DNeasy Plant Mini Kit" (Qiagen, Valencia, CA). El ADN obtenido se cuantificó espectrofotométricamente y se verificó su integridad en geles de agarosa al 0.8% con bromuro de etidio.

### e.1.2) PCR, "Polimerase Chain Reaction"

De acuerdo con su secuencia de ADN, se diseñaron oligonucleótidos específicos para KETc1.6His y KETc12.6His. Adicionalmente, se diseñaron el iniciador p1700 (GGATGACGCACAATCCCCTAT), localizado en la región 5', en la posición -84 pb del promotor CaMV 35S, y el iniciador LHE-178 (GATCCTCAATGGTGATGGTGATG), ubicado en la región 3' que codifica para la cola de seis residuos de histidina (Figura 1 de la publicación anexa, Hernández *et al.*, 2007). La reacción de amplificación se llevó a cabo con la enzima Platinum Taq DNA polimerasa (Invitrogen, Carlsband, CA) usando las siguientes condiciones de amplificación: 95 °C 5 min, 43 ciclos con una etapa de desnaturalización a 94 °C durante 1 min, alineamiento/síntesis a 65 °C por 1 min y una etapa de síntesis final a 60 °C durante 10 min. Para la detección de transgén KETc7 se utilizó el iniciador 5' p1700 y el iniciador A05 (CTAAAGATTCTTCTTATCTTCTGGTTCCAT) en el extremo 3' del péptido; las condiciones de amplificación consistieron en: 95 °C por 5 min y 43 ciclos con una etapa de desnaturalización a 94 °C por 1 min., alineamiento a 55 °C por 1 min, síntesis a 72 °C por 1 min y una etapa final de síntesis a 72 °C durante 10 min. Las construcciones genéticas KETc1.6His-pUI 235-5.1, KETc12.6His-pUI 235-5.1 y KETc7-pUI 235-5.1 fueron utilizadas como controles positivos de las reacciones de amplificación.

### e.1.3) RT-PCR "Reverse Transcription" acoplada a PCR

#### e.1.3.1) Purificación de ARN total

En un mortero congelado con nitrógeno líquido se pulverizaron aprox. 100 mg de callos embriogénicos no transformados, como control negativo, así como de cada

clona transgénica a analizar. Al pulverizado se agregó 1.0 ml de Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA), para proceder con la purificación de ARN total de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ARN obtenido se cuantificó por su absorbancia a 260/280 nm, y se determinó su calidad en geles desnaturalizantes de agarosa al 0.8%.

#### e.1.3.2) RT-PCR

Para la reacción de síntesis de ADNc se utilizaron los siguientes pares de oligonucleótidos (todos escritos en dirección 5'-3'): 1) para KETc1.6His, los oligonucleótidos 5' ATG GCT CCA ATG TAC AC y 3' GGA TCC TCA ATG GTG; 2) para KETc12.6His, el oligonucleótido 5' ATG GCT GGC AAC CTC TT y el mismo 3' descrito para KETc1.6His, y 3) para KETc7 se utilizó el 5' AGA TCA CCC GGG AAT TC y el 3' A05. La síntesis de ADNc se realizó en un volumen de 50 µL conteniendo 5 µg de ARN total, 20 ng de cada oligonucleótido específico, 10 nM de dNTPs, 10 nM de DTT (Ditiotreitol) y 200 unidades de transcriptasa reversa M-MLV (Invitrogen, Carlsbad, CA). La reacción se incubó durante 1 h a 50 °C. Como control negativo se amplificó el ADNc de callos embriogénicos no transgénicos. La reacción de PCR consistió en una etapa de desnaturalización inicial a 94 °C por 5 min, 30 ciclos de amplificación con una etapa de desnaturalización a 94 °C por 1 min, alineamiento a 50 °C por 1 min, síntesis a 72 °C durante 1 min y una etapa final de síntesis a 72 °C durante 7 min.

#### e.1.4) RT-PCR en tiempo real

Para estos ensayos se utilizaron las mismas muestras de ADNc obtenido de las clonas transgénicas y callos embriogénicos no transformados de la reacción de RT-PCR convencional. Para KETc7 se emplearon los oligonucleótidos (todos escritos en dirección 5'-3') 5' CTT ATC CGA CCG GTG GTC y 3' GGT GCT GAA GCC TGG CTG TA, mientras que para KETc1.6His y KETc12.6His se emplearon los mismos oligonucleótidos utilizados para el RT-PCR convencional. La reacción de RT-PCR en tiempo real se llevó a cabo con el sistema Quantitec SYBR Green PCR Kit (Qiagen, Valencia, CA), en una reacción de 25  $\mu$ L que contenía 1  $\mu$ L de ADNc y 20 pmol de cada uno de los *primers* específicos. Las curvas estándar necesarias para normalizar los resultados se realizaron utilizando diluciones seriadas del ARN ribosomal 18S de papaya, con los iniciadores 5' CCA CGG GTC GTG AAC TTC TT y 3' TCC TCT GTA TTA CCG CGG CT. Los niveles de expresión de los transgenes fueron expresados como unidades arbitrarias (a.u.) en relación con la transcripción del transgén/ribosomal.

#### e.2) Caracterización bioquímica

##### e.2.1) Preparación de extracto total soluble de callos embriogénicos

En un mortero congelado con nitrógeno líquido se pulverizaron aproximadamente 800 mg de callos embriogénicos no transgénicos y de cada clona transgénica bajo análisis; el pulverizado se vertió en un vaso de precipitados mantenido en hielo, conteniendo 2.0 mL de PBS pH = 7.4, 1 mM de EDTA, 50 mM de ascorbato de sodio, 0.2% Tritón X-100 y 10  $\mu$ L/mL del inhibidor de proteasas (Sigma St. Louis, MO). Estas muestras se centrifugaron a 10,000 rpm durante 30 min a 4° C; se

colectó el sobrenadante y se determinó la concentración de proteínas por el método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951).

#### e.2.2) Identificación de los péptidos recombinantes

50 µg de cada uno de los extractos totales solubles se mezclaron en una proporción volumen a volumen con el buffer de carga para geles desnaturizantes (Invitrogen, Carlsbad, CA), se hirvieron durante 5 min y se separaron en geles de acrilamida NUPAGE-MES 4-12% (Invitrogen, Carlsbad, CA), durante 1 h a 200 volts, con voltaje constante y a temperatura ambiente. Al término de la electroforesis el gel fue teñido con azul de coomasie.

#### e.2.3.) Evaluación de la capacidad inmunogénica de las clonas transgénicas de papaya contra la cisticercosis experimental murina por *T. crassiceps*

El extracto total soluble de las clonas 21p y 23p que expresan el péptido KETc7 a la concentración de 200 µg y 1 mg, respectivamente, fueron utilizados para inmunizar ratones BALB/cAnN de 8-10 semanas de edad (mantenidos en condiciones libres de patógenos en las instalaciones del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM) por vía subcutánea, realizándose dos inmunizaciones a intervalos de 15 días, y 10 días después de la última inmunización cada ratón fue desafiado con 10 cisticercos por vía intraperitoneal; 45 días después de la infección los ratones fueron sacrificados en una cámara de CO<sub>2</sub>. El porcentaje de protección se determinó de acuerdo con el número de parásitos recuperados de cada ratón. El extracto soluble de las clonas



transgénicas que expresan los péptidos KETc1.6His y KETc12.6His sólo fueron evaluadas en la concentración de 200 µg bajo el mismo protocolo de inmunización e infección.

e.2.4) Inmunohistoquímica para la identificación de péptidos nativos del cisticerco de *T. crassiceps*

Cisticercos de *T. crassiceps* se fijaron durante 10 min en una solución de PBS en 4% de paraformaldehído y 3% de peróxido de hidrógeno. La inmunodetección se realizó con el sistema HISTOMOUSE™ SP (Zymed, Carlot Court, CA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante, utilizando sueros de ratones no inmunizados (control negativo), infectados con cisticercos de *T. crassiceps* (control positivo), de ratones inmunizados con extracto de callos embriogénicos no transgénicos (doble control negativo) e inmunizados con los callos embriogénicos de cada una de las clonas transgénicas (muestra experimental). La reacción fue revelada con estreptoavidina peroxidasa y DAB (3'3'-diaminobencidina, Zymed, Carlot Court, CA) y posteriormente teñida con hematoxilina. Las laminillas fueron visualizadas en un microscopio óptico usando el software MetaMorph Imaging System 4.5.

## IX. RESULTADOS

- Los resultados más importantes derivados de este trabajo están descritos en la publicación anexa (Hernández *et al.*, 2007).
- Considerando que hasta antes del artículo publicado en este trabajo de tesis el sistema de expresión en papaya no se había empleado para la producción de antígenos para vacunación ni como inmunógeno contra la cisticercosis, se decidió llevar a cabo los trámites pertinentes para el registro de los resultados del trabajo ante el Instituto Mexicano de la Propiedad Intelectual (IMPI).
- **Resultados no publicados**

Los resultados no incluidos o no descritos detalladamente en la publicación anexa (Hernández *et al.*, 2007) se resumen brevemente a continuación.

### a) Construcciones genéticas.

Se realizaron tres construcciones en el vector pUI 235-5-1.

- 1) pUI 235-5-1. KETc 1. 6 His/ 8, 919 pb.
- 2) pUI 235-5-1. KETc 12. 6/ 8, 940 pb.
- 3) pUI 235-5-1. KETc 7/ 9, 310 pb.

**b) Transformación genética, c) selección y d) propagación de clonas transgénicas.**

En la Figura 10 se muestra la identificación de clonas transgénicas de papaya en medio selectivo, y en la Tabla 9 se muestra la eficiencia de transformación por biobalística de los callos embriogénicos de maíz, sorgo, zanahoria y papaya con las tres construcciones genéticas referidas, así como el número de clonas transgénicas obtenidas en cada caso.

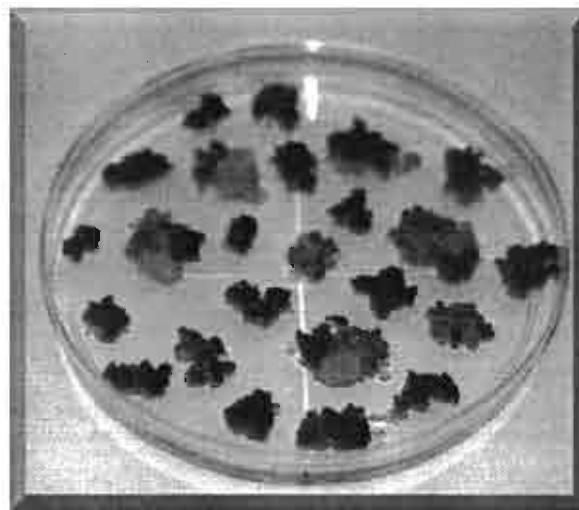


Figura 10. Identificación de clonas transgénicas de papaya en medio selectivo.

*c.1) Detección de la expresión del gen reportero de  $\beta$ -glucuronidasa*

Las clonas transgénicas presentaron diferentes niveles de expresión de  $\beta$ -glucuronidasa. En la Figura 11 se muestra la actividad del gen reportero sobre callos embriogénicos de papaya.

Tabla 9. Eficiencia de transformación por biobalística de callos embriogénicos de las especies vegetales de interés.

Planta	Construcción en pUI235-5.1	No. de callos transformados	No. total de clones	% eficiencia de transformación	% contaminación
Maiz**	KETc1.6His	315	16	5.0	11.1
Sorgo**		280	39	13.9	0
Zanahoria*		315	80	<b>25.3</b>	0
Papaya*		280	38	13.5	<b>12.5</b>
<b>Total</b>			<b>173</b>		
Maiz**	KETc12.6His	315	11	3.49	11.1
Sorgo**		280	43	<b>15.3</b>	0
Zanahoria*		350	8	2.28	20
Papaya*		175	12	6.8	<b>40</b>
<b>Total</b>			<b>74</b>		
Maiz**	KETc7	315	16	5.0	11.1
Sorgo**		280	11	3.9	0
Zanahoria*		385	133	<b>34.5</b>	9.0
Papaya*		210	11	5.2	<b>50</b>
<b>Total</b>			<b>171</b>		

Transformación a 800 psi\* o 1200\*\* psi.

En la Tabla 10 se muestran los resultados de la detección de la actividad del gen reportero de  $\beta$ -glucuronidasa, así como las características observadas sobre el mantenimiento y la propagación de las clonas transgénicas obtenidas después de cuatro subcultivos para las diferentes especies vegetales transformadas. Como se mencionó, los análisis subsecuentes solamente se realizaron sobre las clonas transgénicas de papaya, principalmente por así convenir a nuestro interés del desarrollo de una vacuna novedosa contra la cisticercosis.

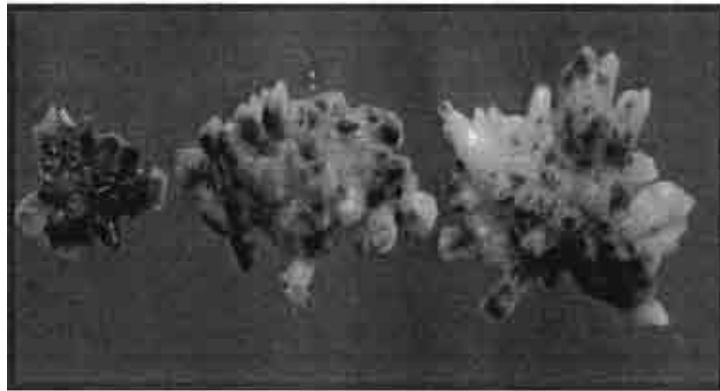


Figura 11. Expresión el gen reportero para  $\beta$ -glucuronidasa en embriones de clonas transgénicas de papaya. El color azul indigo es producido por la actividad enzimática de la  $\beta$ -glucuronidasa sobre su sustrato, X-GLUC.

#### **e) Propagación de clonas transgénicas de papaya**

Las 53 clonas transgénicas de papaya obtenidas se mantuvieron y propagaron *in vitro* por subcultivo cada dos meses en medio selectivo (higromicina/paromomisinina) M10, adicionado con 2,4-D a una concentración de 10 mg/Lm (Figura 12), para obtener la cantidad de biomasa necesaria para su caracterización.

Tabla 10. Detección del gen reportero, mantenimiento y propagación de las clonas transgénicas obtenidas.

<b>Especie</b>	<b>No. clonas totales</b>	<b>Expresión de <math>\beta</math>-glucuronidasa</b>	<b>Observaciones después de 4 subcultivos de propagación <i>in vitro</i></b>
<i>Z. mays</i> L.	43	Negativa	Imposible de mantener en estado embriogénico. Regeneración obligatoria.
<i>S. bicolor</i> L. (Moench)	93	Negativa	Reducción en el número de clonas por contaminación con ácaros.
<i>D. carota</i> L.	221	Positiva	Elevado número de clonas. Propagación acelerada (1 mes) Dificultades para su caracterización rápida.
<i>C. papaya</i> L.	61	Positiva	Permanencia en estado embriogénico. Propagación de tiempo intermedio (2 meses). Facilidades para su caracterización.

**e) Caracterización molecular de clonas transgénicas de papaya (*Carica papaya* L.)**

*e.1) Identificación de ADN y ARNm del transgén*

*e.1.1) Purificación de ADN genómico*

Se llevó a cabo la purificación de ADN genómico de 18 clonas transgénicas. El rendimiento de ADN obtenido para cada una de ellas se muestra en la Tabla 11.



Figura 12. Propagación de clonas transgénicas de papaya por subcultivo *in vitro*.

*e.1.2) PCR, "Polimerase Chain Reaction"*

En la Tabla 12 se muestran los resultados de PCR obtenido del análisis de las 53 clonas transgénicas de papaya analizadas

Tabla 11. Rendimiento de recuperación de ADN de callos embriogénicos de clonas transgénicas de papaya

Muestra	[ADN] ng/ $\mu$ L	Rendimiento ng ADN/ $\mu$ g de tejido
Tejido no transgénico	160	48
Clona transgénica:		
pKETc1 <sub>1</sub>	220	66
pKETc1 <sub>2</sub>	210	63
pKETc1 <sub>3</sub>	270	81
p <sub>1</sub> KETc1 <sub>9</sub>	82.12	24
p <sub>2</sub> KETc1 <sub>9</sub>	39.79	11
pKETc1 <sub>11</sub>	170	51
pKETc1 <sub>12</sub>	320	96
pKETc1 <sub>13</sub>	220	66
pKETc1 <sub>16</sub>	150	45
pKETc1 <sub>20</sub>	120	36
pKETc1 <sub>21</sub>	260	78
pKETc1 <sub>25</sub>	510	153
pKETc1 <sub>40</sub>	300	90
pKETc1 <sub>41</sub>	420	126
pKETc12 <sub>6</sub>	570	171
pKETc12 <sub>7</sub>	550	165
pKETc7 <sub>21</sub>	101	30
pKETc7 <sub>23</sub>	57	170



Tabla 12. Análisis por PCR de clonas transgénicas

Construcción	Tamaño del Producto de PCR	No. de clonas + /totales	% de clonas positivas
KETc 1.6H	163 pb	15 / 38	39.47
KETc 12.6H	154 pb	6 / 11	54.5
KETc7	544 pb	4 / 4	100

## e.2) Caracterización bioquímica

### e.2.1) Preparación de extracto total soluble de callos embriogénicos

Como se muestra en la Tabla 13, la concentración de proteína total soluble obtenida de las diferentes clonas transgénicas varió entre de 4-10 mg/mL

### e.2.2) Identificación de los péptidos recombinantes

En geles de poliacrilamida no se logró confirmar la expresión de los péptidos recombinantes. Para el caso de los péptidos KETc12.6His y KETc1.6His, con un peso molecular esperado de aproximadamente 1.0 y 1.2 KDa, respectivamente, porque se encontraban ligeramente abajo del límite de resolución del gel (1.5 KDa). En el caso del péptido KETc7 se visualizó una banda de aproximadamente 8.0 KDa, siendo menor al peso molecular esperado (14.5 kDa) (Figura 13).

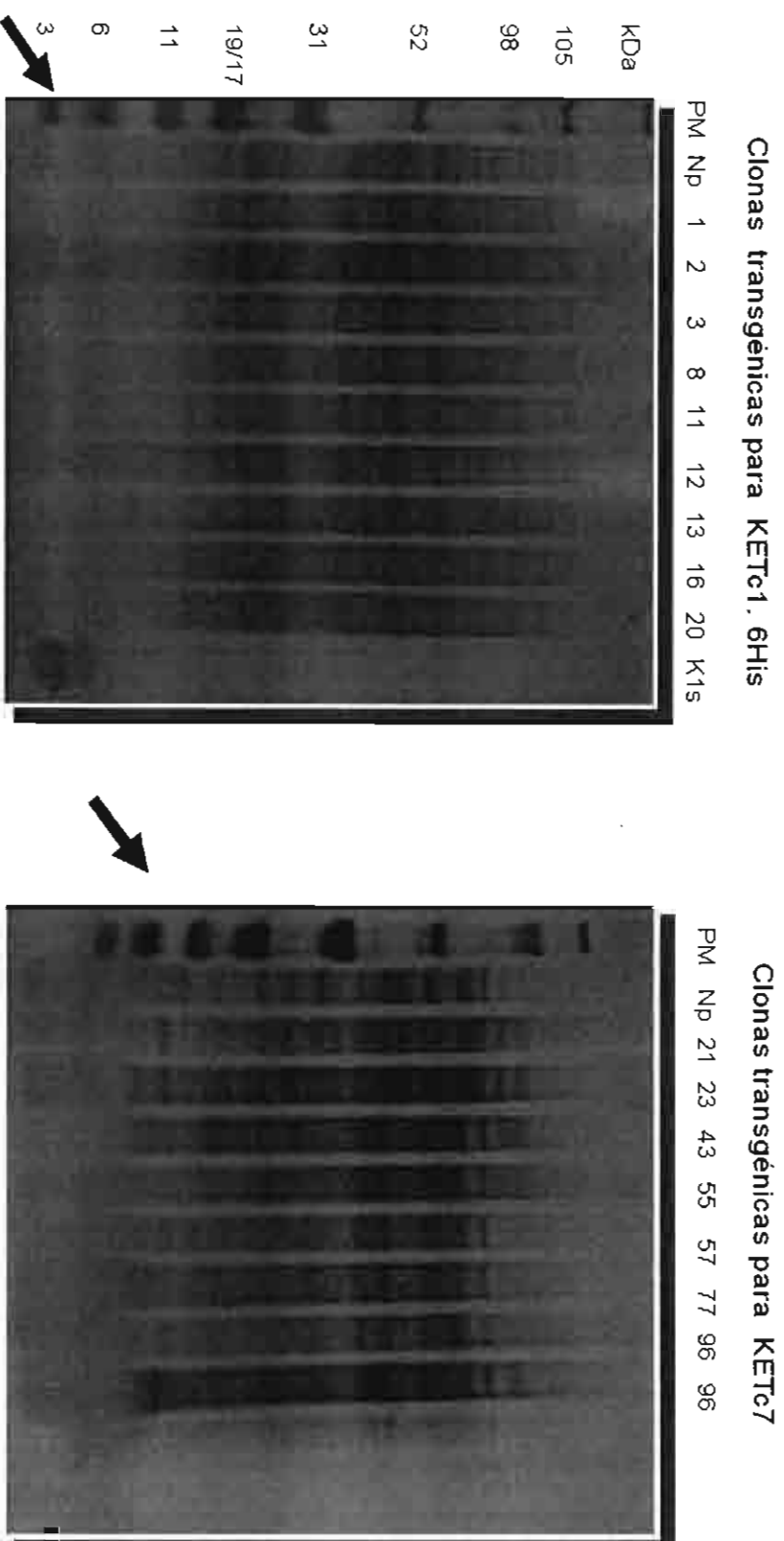


Figura 13. SDS-PAGE 4-12% con 50 µg/ pozo del extracto total soluble de clonas transgénicas de papaya. PM: Peso molecular para polipéptidos (BioRAD); Np: extracto de callos embriogénicos no transgénicos; clonas transgénicas para el péptido KETc1.6His: 1,2, 3, 8, 11, 12, 13, 16, 20; clonas transgénicas para el péptido KETc7: 21, 23, 43, 55, 57, 77, 95, 95; K1s: péptido sintético KETc1.6His.

Tabla 13. Rendimiento de la recuperación de proteínas solubles de callos embriogénicos de clonas transgénicas de papaya

<b>Muestra</b>	<b>[Proteína] mg/mL</b>	<b>Rendimiento µg proteína/mg de tejido</b>
Tejido no transgénico	5.5	13.7
Clona transgénica:		
pKETc1 <sub>1</sub>	9.1	22.0
pKETc1 <sub>2</sub>	3.8	9.5
pKETc1 <sub>3</sub>	6.8	17.0
p <sub>1</sub> KETc1 <sub>9</sub>	3.2	8.0
p <sub>2</sub> KETc1 <sub>9</sub>	4.4	11.0
pKETc1 <sub>11</sub>	5.4	13.5
pKETc1 <sub>12</sub>	5.4	13.5
pKETc1 <sub>13</sub>	8.0	20.0
pKETc1 <sub>16</sub>	6.0	15.0
pKETc1 <sub>20</sub>	6.0	15.0
pKETc1 <sub>21</sub>	8.0	20.0
pKETc1 <sub>25</sub>	7.3	18.3
pKETc1 <sub>40</sub>	7.3	18.3
pKETc1 <sub>41</sub>	7.3	18.3
pKETc1 <sub>26</sub>	6.0	15.0
pKETc1 <sub>27</sub>	6.0	15.0
pKETc7 <sub>21</sub>	9.8	24.5
pKETc7 <sub>23</sub>	4.8	12.0

e.2.3.) Evaluación de la capacidad inmunológica de las clonas transgénicas de papaya contra la cisticercosis experimental murina por *T. crassiceps*

En la Tabla 14 se indica el número de clonas transgénicas que fueron evaluadas en los experimentos de vacunación contra la infección.

Tabla 14. Clonas transgénicas evaluadas en experimentos de vacunación.

Clona transgénica	No. de clonas evaluadas/totales
KETc 1.6H	15 / 38
KETc 12.6H	2 / 11
KETc7	2 / 4

Los resultados de los experimentos de inmunización y de inmunohistoquímica están descritos en las Tablas 1, 2 y la Figura 3, respectivamente, de la publicación anexa (Hernández *et al.*, 2007).

## X. DISCUSIÓN

En este trabajo se reporta la producción de clonas transgénicas de maíz, sorgo, zanahoria y papaya, así como la caracterización molecular y bioquímica de las clonas transgénicas de papaya para la expresión de tres péptidos del cisticerco de *T. crassiceps*, KETc1.6His, KETc12.6His y KETc7, de interés para efectos de vacunación contra la cisticercosis.

Inicialmente se evaluó la factibilidad de transformar diferentes especies vegetales para la expresión de los péptidos de interés, a fin de seleccionar aquella que resultara más adecuada para el desarrollo de una vacuna contra la cisticercosis. Se transformaron callos embriogénicos de maíz, sorgo, zanahoria y papaya. Como se observa en la Tabla 9, se obtuvo un número considerable de clonas transgénicas de cada especie vegetal; sin embargo, la eficiencia de transformación varió de acuerdo con la planta y la construcción genética. Dado que en las clonas transgénicas de sorgo y maíz no fue posible la detección del gen reportero para  $\beta$ -glucuronidasa, que las clonas de sorgo fueron contaminadas por ácaros y las clonas de maíz no lograron mantenerse en estado embriogénico por tiempo indefinido, se decidió no continuar con la caracterización de estas clonas transgénicas.

Respecto a las clonas transgénicas de zanahoria y papaya, en ambas se detectó la actividad de  $\beta$ -glucuronidasa; sin embargo, en la zanahoria, la gran cantidad de clonas obtenidas y la necesidad de propagarlas en corto tiempo impidió su mantenimiento y caracterización de manera eficiente, por lo que se decidió no dar continuidad al trabajo con esta especie. En el caso de la papaya, aunque el número de clonas transgénicas recuperadas no fue muy elevado e

inicialmente el porcentaje de contaminación fue elevado (12.5 - 50%), se consideraron las propiedades antiparasitarias inherentes a esta planta (Hammond *et al.*, 1997; Lans *et al.*, 2000; Stepek *et al.*, 2004). El sistema de expresión en papaya era innovador para la producción de antígenos vacunales, puesto que previamente sólo se había utilizado para la expresión de marcadores de selección y producción de plantas resistentes al virus de la mancha anular, enfermedad que causa grandes pérdidas económicas en los países productores de esta fruta (Chiang *et al.*, 2001; Fuchs *et al.*, 2007; Gonsalves *et al.*, 2002; Sakuanrungririkul *et al.*, 2005; Tripathi *et al.*, 2007; Ye *et al.*, 2003). La producción de antígenos de origen parasitario en plantas transgénicas también resultó de interés, ya que previamente sólo existían reportes sobre la expresión de antígenos contra virus y bacterias como hepatitis, ántrax, cólera, rabia y caries (Feartherstone, C. 1996; Haq *et al.*, 1995; Poirier *et al.*, 1995; Streatfield *et al.*, 2003; Thanavala *et al.*, 1995). Por lo tanto, se decidió enfocar y continuar el desarrollo de esta investigación hacia la caracterización de las clonas transgénicas, con el objetivo de lograr la producción de una vacuna contra la cisticercosis.

Por otra parte, la reciente publicación de la secuencia del genoma de la papaya amplía las posibilidades de utilizar esta planta como modelo para estudios a escala genómica (Wei *et al.*, 2008).

Para la expresión de los péptidos KETc1.6His, KETc12.6His y KETc7 se hicieron tres construcciones genéticas en el vector de pUI 235-5.1, el cual contiene el doble promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV 35S-35S), que es capaz de dirigir la expresión fuerte y constitutiva de los genes bajo su regulación en prácticamente cualquier especie vegetal. La utilización de este

promotor ha sido tema de controversia, principalmente ante la preocupación de que pueda ser transferido a las células de individuos consumidores y active genes indiscriminadamente. Sin embargo, conviene mencionar que para que un suceso de este tipo ocurriera habrían de producirse múltiples eventos consecutivos de recombinación de muy baja probabilidad. Además, se sabe que la respuesta inmune del organismo receptor (por ejemplo, el ratón) tiene la capacidad de eliminar fragmentos de ADN extraño que eventualmente llegan a pasar del tubo digestivo al torrente sanguíneo, y se ha reportado que personas que han ingerido hortalizas infectadas con el virus del mosaico de la coliflor no han manifestado efectos nocivos, por lo que hasta el momento el virus representa un riesgo bajo para la salud humana o animal (<http://agronomia.uchile.cl/webcursos/cmd/22005/fdiaz/Inquietudes1.html>). Sin embargo, debe estudiarse ampliamente en lo que respecta a sus implicaciones sobre bioseguridad, sobre todo porque dicho promotor se ha utilizado en la mayoría de los cultivos transgénicos comerciales, inclusive aquellos que se encuentran en etapas de evaluación en el campo (<http://www.ecoportal.net/content/view/full/23707>).

La utilización como explante de los callos embriogénicos de papaya en estadio globular, acoplada al sistema de transformación por biobalística, permitió la obtención de un considerable número de clonas transgénicas en comparación con explantes difíciles de transformar (por ejemplo, el plátano y algunas plantas recalcitrantes; además, producen un número reducido de clonas transgénicas, ocasionando problemas para su caracterización y regeneración, y por consecuencia limitan el desarrollo de los trabajos de investigación y su potencial

de aplicación). Por otro lado, el sistema de propagación *in vitro* de papaya implica costos muy bajos, debido a que el medio de cultivo solamente contiene sacarosa, sales minerales, reguladores de crecimiento y agar. Además, se mantienen a temperatura ambiente y en condiciones de oscuridad, eliminando la necesidad de equipo sofisticado. Sin embargo, una desventaja que presenta es su crecimiento lento, ya que su propagación se realiza cada dos meses, en comparación con otras plantas de crecimiento rápido, como *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh, zanahoria (*Daucus carota* L.) y tabaco (*Nicotiana tabacum* L.), que se pueden subcultivar a intervalos de un mes, aproximadamente.

Para la caracterización molecular de las clonas transgénicas a través de la identificación del transgén por PCR se llevó a cabo la purificación de ADN, y como puede observarse en la Tabla 11, se observó una considerable variabilidad en los rendimientos, de 30 a 171 ng/ $\mu$ g de tejido. Dicha variación podría deberse a que las muestras no fueron correctamente lisadas, y por consiguiente se obtuvo una menor cantidad de ADN purificado. Sin embargo, la cantidad obtenida fue suficiente para realizar los ensayos de PCR necesarios para la estandarización e identificación del transgén en cada clona transgénica.

Como puede observarse en la Tabla 12, no todas las clonas mostraron amplificación. En este sentido, las clonas negativas posiblemente integraron un bajo número de copias del transgén o la reacción de PCR no fue lo suficientemente sensible para su detección. Esta hipótesis no puede confirmarse, porque no se realizó un análisis por Southern Blot para determinar el número de copias del transgén integradas en cada clona transgénica. Por lo tanto, sólo en aquellas que presentaron amplificación del transgén se determinó el nivel de



expresión del transcrito, mediante RT-PCR y RT-PCR en tiempo real, observándose que cada clona presentó diferente nivel de expresión del transcrito, lo que también podría estar influido por el número de copias integrado, el sitio de integración o la naturaleza *per se* de cada transgén (Hernández *et al.*, 2007).

Para la caracterización bioquímica de las clonas transgénicas se prepararon extractos de proteínas solubles de cada una. Como puede observarse en la Tabla 13, al igual que en el caso del ADN, se obtuvo una considerable variabilidad en la cantidad de proteína total soluble obtenida, que va de 8.0 a 24.5  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de tejido. Esta variación podría deberse a diferencias durante el proceso de preparación de las muestras. En cualquier caso, la cantidad de proteína obtenida fue suficiente para realizar los análisis en geles de acrilamida y los experimentos de inmunización y protección en el modelo murino de cisticercosis por *Taenia crassiceps*.

La identificación y cuantificación de los péptidos KETc1.6His, KETc12.6His y KETc7 en geles de poliacrilamida fue imposible de realizar. Dos razones podrían explicar las dificultades para su detección: 1) el bajo peso molecular de los péptidos recombinantes KETc1.6His y KETc12.6His, de 1.2 y 1.0 kDa, respectivamente, y 2) en la identificación del péptido KETc7, la banda observada en los geles de acrilamida, siendo menor al peso molecular esperado (14.5 kDa) (Figura 13), no pudo confirmarse por Western Blot, debido a la falta del anticuerpo específico anti-KETc7. La detección de los péptidos recombinantes mediante un ensayo de ELISA, utilizando un anticuerpo monoclonal anti-6His (Invitrogen, Carlsbad, CA), mostró que sólo la clona transgénica p<sub>2</sub>KETc1<sub>9</sub> (KETc1.6His) dio una densidad óptica significativamente superior al extracto de callos

embriogénicos no transgénicos o a las demás clonas transgénicas. En este caso, la falta de reconocimiento podría asociarse con un bajo nivel de expresión de los péptidos recombinantes, de manera que un método alternativo para su detección fue el análisis de los extractos solubles por HPLC (cromatografía líquida de alta resolución). Desafortunadamente, el patrón proteico y el tiempo de retención de los péptidos recombinantes coincidieron con varias proteínas contenidas en el extracto no transgénico, por lo que tampoco fue posible identificar y cuantificar el nivel de expresión de los péptidos recombinantes.

La limitante del bajo nivel de expresión de antígenos en diferentes especies de plantas transgénicas ha sido previamente reportada (Daniell *et al.*, 2001; Desai *et al.*, 2010) y se ha tratado de optimizar los procedimientos o estrategias necesarias para aumentar el nivel de expresión. Una estrategia alternativa, la producción de plantas transgénicas transplastómicas, presenta las siguientes ventajas: a) alto nivel de expresión del transgén; b) la herencia del transgén se realiza por vía materna, evitándose la contaminación ambiental por dispersión de polen; c) permite la expresión de múltiples genes en un solo evento de transformación; d) el uso de vectores libres de genes de resistencia a antibióticos, y e) una reducción en los costos de producción en un factor de 10 a 100 con respecto a la transformación genómica (Vidi *et al.*, 2007). Reportes al respecto indican la hiperexpresión de antígenos vacunales del cólera, tétanos, ántrax y parvovirus; los niveles de expresión obtenidos varían de 4 a 31% de la proteína soluble total y, de proteínas recombinantes de aplicación terapéutica, como la albúmina sérica bovina, somatotropina, interferón-gamma, un péptido antimicrobiano, la somatostatina humana y la toxina Bt, con un nivel de expresión

de 11.1%, 7%, 6%, 21.5%, 7% y 46% de la proteína total soluble, respectivamente (Chargelegue *et al.*, 2001). Por lo tanto, este sistema de expresión podría considerarse como estrategia alternativa para aumentar el nivel de expresión de los péptidos recombinantes, KETc1.6His, KETc12.6His y KETc7 en trabajos futuros.

Ante la imposibilidad de determinar el nivel de expresión de los péptidos recombinantes, las clonas transgénicas que presentaron niveles considerables del transcrito por análisis de PCR en tiempo real fueron evaluadas en experimentos de vacunación en el modelo de cisticercosis experimental murina por *Taenia crassiceps*. Como puede observarse en las Tablas 1 y 2 de la publicación anexa (Hernández *et al.*, 2007), el extracto de callos embriogénicos no transgénicos de papaya *per se*, así como las clonas transgénicas que expresan los péptido KETc1.6His, KETc12.6His y KETc7, presentaron de 10 a 22% y 50, 80 y 63% en el número de ratones totalmente protegidos ante el desafío con *T. crassiceps*, respectivamente. La capacidad protectora inducida por la inmunización con el extracto de las clonas transgénicas podría deberse al efecto sinérgico del extracto de la papaya *per se* y la respuesta inducida por los péptidos recombinantes (Hernández *et al.*, 2007), que interesantemente resultó similar al obtenido por vacunación con los péptidos sintéticos KETc1, KETc12 y GK1 (proveniente de la secuencia KETc7), 66%, 52% y 40-70% respectivamente, contra la cisticercosis murina (Toledo *et al.*, 1999; 2001; Sciutto *et al.*, 2007). La conservación de la inmunogenicidad de los péptidos recombinantes fue confirmada por análisis de inmunohistoquímica, demostrándose que los anticuerpos de los ratones

inmunizados reconocen los antígenos nativos del parásito, como se observa en la Figura 3 de la publicación anexa (Hernández *et al.*, 2007).

El efecto protector inducido por el extracto de los callos embriogénicos no transgénicos de papaya podría explicarse por la actividad antiparasitaria (antihelmíntica) que se ha atribuido al látex de esta planta, debido a su alto contenido en enzimas proteolíticas (quimopapaína, papaína, caricaína y glicil endopeptidasa) (Hammond *et al.*, 1997; Stepek *et al.*, 2004). Particularmente la papaína ha sido ampliamente evaluada en su capacidad para dañar por digestión proteolítica la cutícula de diferentes parásitos intestinales (*Trichostrongylus colubromis*, *Heligmosomoides polygyrus*, *Trichuris muris*, *Protospirura muricola*) (Berger and Asenjom, 1940; Stepek *et al.*, 2006; 2006; 2007; 2007a; 2007b; 2007c) sin causar efectos colaterales al hospedero (Hounzangbe-Adote *et al.*, 2005; Okeniyi *et al.*, 2007).

Además de la actividad antihelmíntica, al látex de la papaya también se le atribuye la capacidad para producir reacciones alérgicas que pueden presentar reacción cruzada con algunos alimentos como la zanahoria, la manzana, el plátano, el aguacate, el kiwi y en menor grado el higo, la papa, el tomate y la castaña (Blanco *et al.*, 1994; Ebo *et al.*, 1995; Isola *et al.*, 2003). En este sentido, estudios realizados indican que entre 30 y 80% de los individuos susceptibles al látex también presentan síntomas de alergia al comer uno o varios de los alimentos mencionados, y sufren el síndrome de alergia oral. Dicha reactividad cruzada, en parte, es mediada por proteínas denominadas "panalérgenos", como las enzimas tiolproteasas (Hemmer *et al.*, 2004), la papaína (Van Kampen *et al.*, 2005) y alérgenos del polen o el fruto de la papaya.

La existencia de alérgenos comunes entre el polen de la flor del árbol de la papaya, el fruto y la papaína ha sido confirmada por la reactividad que presentan anticuerpos IgE de pacientes alérgicos con el extracto de las tres partes del árbol de la papaya (Blanco *et al.*, 1998). La reactividad cruzada entre algunos alérgenos y alimentos se encuentra ampliamente distribuida en el reino vegetal y está implicada en funciones biológicas (generalmente de defensa), por lo que la secuencia y estructura de los panalérgenos es altamente conservada (Fernández Rivas, M. 2003). Por lo tanto, sería de interés y relevancia determinar si los callos embriogénicos de la papaya podrían contener o no panalérgenos, como se reporta para el polen, el fruto y la papaína.

Finalmente, en la literatura se citan diversos reportes sobre la caracterización y evaluación de la actividad antiparasitaria del látex de la papaya, información sobre sus propiedades terapéuticas y que se ha asociado su consumo excesivo con un factor de riesgo para el desarrollo de cáncer de próstata. Por lo tanto, sería de interés que estudios a futuro realizaran la caracterización bioquímica y determinaran si las propiedades terapéuticas y atribuidas a la papaya se conservan o de qué forma se modifican en los callos embriogénicos. En este sentido, el presente trabajo de investigación ha realizado importantes contribuciones al respecto, en tanto demuestra el potencial de los callos embriogénicos de las clonas transgénicas de la papaya para el diseño y la evaluación de vacunas recombinantes. Así, éstos constituyen una alternativa interesante para la producción de proteínas recombinantes con fines de salud pública.

## XI. CONCLUSIONES

En cuanto a la generación de clonas transgénicas para la expresión de péptidos inmunogénicos se concluye lo siguiente:

1. Mediante transformación por biobalística de callos embriogénicos de maíz, sorgo, zanahoria y papaya se logró la obtención de clonas transgénicas.
2. La eficiencia de transformación varió de acuerdo con la especie vegetal y la construcción genética utilizada.
3. En las clonas transgénicas de zanahoria y papaya se detectó la actividad de  $\beta$ -glucuronidasa, no así en las de sorgo y maíz.
4. Se propagaron *in vitro* las clonas transgénicas de las especies transformadas. La velocidad de propagación varió en cada una de ellas.
5. No fue posible avanzar en la caracterización molecular y bioquímica de las clonas transgénicas de zanahoria, sorgo y maíz, debido a que:
  - a) Las clonas transgénicas de zanahoria tienen un crecimiento muy rápido, por lo que no fue posible mantenerlas en propagación y llevar a cabo su caracterización molecular y bioquímica.
  - b) Las clonas transgénicas de sorgo presentaron contaminación con ácaros.
  - c) No fue posible conservar las clonas transgénicas de maíz en estado embriogénico.

6. Las clonas transgénicas de papaya poseen propiedades antiparasitarias inherentes, y su velocidad de propagación resultó adecuada para su caracterización molecular y bioquímica.

Respecto a los niveles de expresión de los péptidos y las propiedades inmunogénicas de las clonas transgénicas de papaya, se concluye que:

- a) Mediante ensayos de electroforesis, ELISA y cromatografía en fase líquida de alta resolución (HPLC) no fue posible la identificación y cuantificación de los péptidos recombinantes. Ello se debió probablemente a bajos niveles de expresión, al peso molecular reducido de los péptidos KETc1.6His y KETc12.6His, y a que el péptido KETc7 mostró un patrón proteico y tiempo de retención similar al de otras proteínas presentes en el extracto no transgénico.
- b) Mediante el ensayo de inmunohistoquímica fue posible identificar los péptidos nativos.
- c) La inmunización con los callos embriogénicos no transgénicos reduce significativamente *per se* la carga parasitaria (11%) y no presenta efectos colaterales.

- d) La inmunización con callos embriogénicos de clonas transgénicas que expresan los péptidos KETc1.6His, KETc12.6His y KETc7 mostró 50%, 80% y 63%, respectivamente, en su capacidad para obtener ratones totalmente protegidos contra la cisticercosis por *Taenia crassiceps*.
- e) El uso de callos embriogénicos de clonas transgénicas de papaya es un sistema de expresión innovador para el desarrollo de una vacuna contra la cisticercosis, y parece una alternativa viable para la producción de proteínas recombinantes de interés en salud pública.



## XII. PERSPECTIVAS

De acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo de investigación, se proponen las siguientes perspectivas para su continuación.

1. Mantenimiento y propagación de callos embriogénicos de clonas transgénicas, tanto para evaluar su capacidad adyuvante para potenciar otros inmunógenos en el ratón como para determinar su capacidad para inducir protección por vía oral en el modelo experimental de teniasis en el hámster dorado (*Mesocricetus auratus*) y contra la cisticercosis porcina por *T. solium* en condiciones naturales de infección.
2. La regeneración de los callos a plantas y la obtención de semillas transgénicas para la preservación de las clonas, evaluar la estabilidad genética del transgén y analizar la capacidad inmunogénica y protectora de los frutos derivados de dichas semillas, que en caso de resultar efectivos eventualmente podrían incorporarse a programas de inmunización masiva.
3. Producción de cultivos de células en suspensión a partir de las clonas transgénicas, como una alternativa para la producción masiva de material vegetal y la sustitución del cultivo de propagación *in vitro*.

4. Producción de plantas transplastómicas, como una opción para aumentar los niveles de expresión de los péptidos KETc1.6His, KETc12.6His y KETc7, evaluados en este trabajo, así como de otros que con fines similares puedan desarrollarse en el futuro

### XIII. BIBLIOGRAFÍA

Abdelkafi, S., Fouquet, B., Barouh, N., Durner, S., Pina, M., Scheirlincks, F., Villeneuve, P., Carriere, F. 2009. *In vitro* comparison between *Carica papaya* and pancreatic lipases during test meal lipolysis: Potential use of CPL in enzyme replacement therapy. *Food Chemistry*, 225:488-494.

Aluja, A., 1982. Frequency of porcine cysticercosis in Mexico. In: Flisser, A., Willms, K., Laclette, J., Larralde, C., Ridaura, C., Beltrán, F. (Eds). *Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives*. Academic Press, New York. Pp. 53-62.

Arumuganathan, K, and Earle, E. D. 1991. Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Molecular Biology Reporter*, 9:208-218.

Azarkan, M., El Moussaoui, A., van Wuytswinkel, D., Dehon, G. Looze, Y. 2003. Fractionation and purification of the enzymes stored in the latex of *Carica papaya*. *Journal Chromatography B Analytical Technology Biomedical Life Science*, 790:229-238.

Berger, J. and Asenjom, C. F. 1940. Anthelmintic activity of crystalline papain. *Science*, 91: 387-388.

Blanco, C., Carrillo, T., Castillo R., Quiralte, J., Cuevas, M. 1994. Latex allergy: clinical features and cross-reactivity with fruits. *Annals Allergy*, 73: 309-314.

Blanco, C., Ortega, N., Castillo, R., Alvarez, M., Dumpierrez, A. G., Carrillo, T. 1998. *Carica papaya* pollen allergy. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 81:171-175.

Boa, M., Mukaraturwa, S., Willingham, A. L., Johansen, M. V. 2003. Regional plan combating *Taenia solium* cysticercosis/teniosis in Eastern and Southern Africa *Acta Tropica*, 87:183-186.

Bouche, F. B., Marquet-Blouin, E., Yanagi, Y., Steinmetz, A., Muller, CP. 2003. Neutralising immunogenicity of a polyepitope antigen expressed in a transgenic food plant: a novel antigen to protect against measles. *Vaccine*, 21:2065-72

Bouche, F. B., Steinmetz, A., Yanagi, Y., Muller, C. P. 2005. Induction of broadly neutralizing antibodies against measles virus mutants using a polyepitope vaccine strategy. *Vaccine*, 23:2074-2077.

Cabrera-Ponce, J. L., Vegas, A., Herrera-Estrella, L. 1995. Herbicide resistant transgenic papaya plants produced by an efficient particle bombardment transformation methods. *Plant Cell Reports*, 15:1-7.

Cabrera-Ponce, J. L., Vegas-Garcia, A., Herrera-Estrella, L. 1996. Regeneration of transgenic papaya plants via somatic embryogenesis induced by *Agrobacterium rhizogenes*. *In vitro Cell Developmental Biology Plant*, 32:86-90.

Cabrera-Ponce, J. L., López, L., Assad-García, N., Medina-Arevalo, C., Bailey, A. M., Herrera-Estrella, L. 1997. An efficient particle bombardment system for the genetic transformation of asparagus (*Asparagus officinalis* L.). *Plant Cell Reports*, 16:255-260.

Cai, X., Chai, Z., Jing, Z., Wang, P., Luo, X., Chen, J., Dou, Y., Feng, S., Su, C., Jin, J. 2001. Studies on the development of DNA vaccine against *Cysticercus cellulosae* infection and its efficacy. *Southeast Asian Journal Tropical Medicine & Public Health*, 2:105-110.

Carrillo, C., Wigdorovitz, A., Oliveros, J. C., Zamorano, P. I., Sadir, A. M., Gomez, N., Salinas, J., Escribano, J. M., Borca, M. V. 1998. Protective immune response to foot-and-mouth disease virus with VP1 expressed in transgenic plants. *Journal Virology*, 72:1688-1690.

Carabin, H., Krecek, R. C., Cowan, L. D., Michael, L., Foyaca-Sibat, H., Nash, T., Willingham, A. L. 2006. Estimation of the cost of *Taenia solium* cysticercosis in Eastern Cape Province, South Africa. *Tropical Medical & International Health*, 11:906-916.

Carrillo, C., Wigdorovitz, A., Trono, K., Dus Santos, M. J., Castanon, S., Sadir, A. M., Ordas, R., Escribano, J. M. Borca, M. V. 2001. Induction of a virus-specific antibody response to foot and mouth disease virus using the structural protein VP1 expressed in transgenic potato plants. *Viral Immunology*, 14:49-57.

Castanon, S., Marin, M. S., Martin-Alonso, J. M., Boga, R., Casais, R., Humara, J. M., Ordas, R. J., Parra, F. 1999. Immunization with potato plant expressing VP60 protein protects against rabbit hemorrhagic disease virus. *Journal Virology*, 73: 4452-4455

Chargelegue, D., Obregón, P., Pascal, M. W. D. 2001. Transgenic plants for vaccine production: expectations and limitations. *Trends Plant Science*, 6:495-496.

Chiang, C. H., Wang, J. J., Jan, F. J., Yeh, S. D., Gonsalves, D. 2001. Comparative reactions of recombinant papaya ringspot viruses with chimeric coat protein (CP) genes and wild-type viruses on CP-transgenic papaya. *Journal General Virology*, 82:2827-2836.

Chikwamba, R., Cunnick, J., Hathaway, D., McMurray, J., Mason, H., Wang, K. 2002. A functional antigen in a practical crop: LT-B producing maize protects mice against *Escherichia coli* heat labile enterotoxin (LT) and cholera toxin (CT). *Transgenic Research*, 11:479-493.

Christou, P., Ford, T. L, Kofros, M. 1992. The development of a variety of independent gene-transfer methods for rice. *Trend Biotechnology*, 10:239-46.

Daniell, H., Streatfield, S. J., Wycoff, K. 2001. Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants. *Trends Plant Science*, 6: 219-26

Del Bruto, O. H. and Sotelo, J. 1988. Neurocysticercosis, an update. *Reviews Infectious Diseases*, 10:1075-1087.

De la Fuente, J. M., Ramírez-Rodríguez, V., Cabrera Ponce, J. L., Herrera Estrella, L. 1997. Aluminum tolerance in transgenic plants by alteration of citrate synthesis. *Science*, 276:1566-1568.

Desai, P. N., Shrivastava, N., Padh, H. 2010. Production of heterologous proteins in plants: Strategies for optimal expression. *Biotechnology Advances*, (Epub ahead of print).

Díaz, M. A., Villalobos, N., de Aluja, A., Rosas, G., Gomez- Conde, E., Hernández, P., Larralde, C. Sciutto, E. Fragoso, G. 2003. Th1 and Th2 indices of the immune response in pigs vaccinated against *Taenia solium* cysticercosis suggest various host immune strategies against the parasite. *Veterinary Parasitology*, 93:81-90.

Dus Santos, M. J., Wigdorovitz, A., Trono, K., Rios, R. D., Franzone, P. M., Gil, F., Moreno, J., Carillo, c., Escribano, J. M., Borca, M. V. 2002. A novel methodology to develop a foot and mouth disease virus (FMVD) peptide-based vaccine in transgenic plants. *Vaccine*, 20:1141-1147.

Ebo, D. G., Stevens, W. J., De Clerck, L. S. 1995. Latex anaphylaxis. *Acta Clinical Belgica*, 50:87-93.

El Moussaoui, A., Nijs, M., Paul, C., Wintjens, R., Vicentelli, J., Azarkan, M., Looze, Y. 2001. Revisiting the enzymes stored in the laticifers of *Carica papaya* in the context of their possible participation in the plant defense mechanism. *Cell Molecular Life Science*, 58:556-570.

Featherstone, C. 1996. Vaccines by Agriculture. *Molecular Medicine Today*, 2:278-81.

Fernandez Rivas, M. 2003. Cross-reactivity between fruit and vegetables. *Allergology & Immunopathology (Madrid)*, 31:141-146.

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., Fragoso, G. 2003. High prevalence of calcified silent neurocysticercosis in a rural village of Mexico. *Neuroepidemiología*, 22:139-145.



Fleury, A., Morales, J., Bobes, R. J., Dumas, M., Yanez, O., Pina, J., Carrillo-Mezo, R., Martinez, J. J., Fragoso, G., Dessen, A., Larralde, C., Sciutto, E. 2006. An epidemiological study of familial neurocysticercosis in an endemic Mexican community. *Transactions Royal Society Tropical Medicine & Hygiene*, 100:551-558.

Flisser, A., Woodhouse, E., Larralde, C. 1980. Human cysticercosis: antigens, antibodies and non-responders. *Clinical Experimental Immunology*, 39:27-37.

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

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

Floss, D. M., Falkenburg, D., Conrad, U. 2007. Production of vaccines and therapeutic antibodies for veterinary applications in transgenic plants: an overview. *Transgenic Research*, 16:315-332.

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

Fromm, M. E., Morrish., F., Armstrong., C., Williams., R., Thomas., J., Klein, T.M. 1990. Inheritance and expression of chimeric genes in the progeny of transgenic maize plants. *Biotechnology*, 8:833-839.

Fuch, M., Gonzalves, D. 2007. Safety of virus-resistant transgenic plants two decades after their introduction: lessons from realistic field risk assessment studies. *Annual Review Phytopathology*, 45:173-202.

Fujimura T., Komamine, A. 1979. Synchronization of somatic embryogenesis in a carrot cell suspension culture. *Plant Physiology*, 64:162-164.

Gomez, N., Carrillo, C., Salinas, J. Parra, F., Borva, M. V., Escribano, J. M. 1998. Expression of immunogenic glycoprotein S polypeptides from transmissible gastroenteritis coronavirus in transgenic plants. *Journal Virology*, 249:352-358.

Gomez, N., Wigdorovitz, A., Castanon, S., Gil, F., Ordas, R., Borca, M. V., Escribano, J. M. 2000. Oral immunogenicity of the plant derived spike protein from swine-transmissible gastroenteritis coronavirus. *Archives Virology*, 145:1725-1732.

Gonsalves, D. 2002. Coat protein transgenic papaya: "acquired" immunity for controlling papaya ringspot virus. *Current Topics Microbiology & Immunology*, 266:73-83.

Gonzalez, A. E., Gauci, C. G., Barber, D., Gilman, R. H., Tsang, V. C., Garcia, H. H., Verastegui, M., Lightowers, M. W. 2005. Vaccination of pigs to control human neurocysticercosis. *American Journal Tropical Medicine & Hygiene*, 72:837-839.

Guerrero-Andrade, O., Loza-Rubio, E., Olivera-Flores, T., Fehérvári-Bone, T., Gómez-Lim, M. A. 2006. Expression of the Newcastle disease virus fusion protein in transgenic maize and immunological studies. *Transgenic Research*, 15:455-463.

Hammond, J. A., Fielding, D., Bishop, S. C. 1997. Prospects for plant anthelmintics in tropical veterinary medicine. *Veterinary Research Communications*, 21:213-228.

Haq, T. A., Mason, H. S., Clements, J. D., Arntzen, C. J. 1995. Oral immunization with a recombinant bacterial antigen produced in transgenic plants. *Science*, 268: 714-716.

Hemmer, W., Focke, M., Gotz, M., Jarisch, R. 2004. Sensitization to *Ficus benjamina*: relationship to natural rubber latex allergy and identification of foods implicated in the *Ficus*-fruit syndrome. *Clinical & Experimental Allergy*, 34:1251-1258.

Hernandez, M., Cabrera-Ponce, J. L., Fragoso, G., Lopez-Casillas, F., Guevara-Garcia, A., Rosas, G., Leon-Ramirez, C., Juárez, P., Sánchez-Garcia, G., Cervantes, J., Acero, G., Toledo, A., Cruz, C., Bojalil, R., Herrera-Estrella, L., Sciutto, E. 2007. A new highly effective anticysticercosis vaccine expressed in transgenic papaya. *Vaccine*, 24:4251-4260.

Hounzangbe-Adote, S., Fouraste, I., Moutairou, K., Hoste, H. 2005. *In vitro* effects of four tropical plants on the activity and development of the parasitic nematode, *Trichostrongylus colubromis*. *Journal Helminthology*, 79:29-33.

Huerta, M., Sciutto, E., Garcia, G., Villalobos, N., Hernández, M., Fragoso, G., Diaz, J., Diaz, A., Ramírez, R., Luna, S., Garcia, J., Aguilar, E., Espinoza, S., Castilla, G., Bobadilla, J. R., Avila, R., Jose, M. V., Larralde, C., de Aluja, A. S. 2000. Vaccination against *Taenia solium* cysticercosis in underfed rustic pigs of Mexico: roles of age, genetic background and antibody response. *Veterinary Parasitology*, 90:209-219.

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., Sciutto, E. 2001. Synthetic peptide vaccine against *Taenia solium* pig cysticercosis: successful vaccination in a controlled field trial in rural Mexico. *Vaccine*, 20:262-266.

Isola, S., Ricciardi, L., Saitta, S., Fedele, R., Mazzeo, L., Fogliani, O., Gandemi, S., Purello-D'Amrosio, F. 2003. Latex allergy and fruit cross-reaction in subjects who are nonatopic. *Allergy & Asthma Proceeding*, 24:193-197.

Kohno, K., Hirayama, C., Nakamura, M., Tateishi, K., Tamura, Y., Hattori, M., Kohno, K. 2004. Papain protects papaya trees from herbivorous insects: role of cysteine proteases in latex. *Plant Journal*, 37:370-378.

Lamphear, B. J., Streatfield, S. J., Jilka, J. M., Brooks, C. A., Barker, D. K., Turner, D. D., Delaney, D. E., Garcia, M., Wiggins, W., Woodard, S. L., Hood, E. E., Tizard, I. R., Lawhirn, B., Howard, J. A. 2002. Delivery of subunit vaccines in maize seed. *Journal Controlled Release*, 85:169-180.

Larralde, C., Montoya, R. M., Sciutto, E., Diaz, M. L., Govezensky, T., Coltorti, E. 1989. Deciphering western blots of tapeworm antigens (*Taenia solium*, *Echinococcus granulosus* and *Taenia crassiceps*) reacting with sera from neurocysticercosis and hydatid disease patients. *American Journal Tropical Medicine & Hygiene*, 40:282-290.

Larralde, C., Padilla, A., Hernández, M., Govezensky, T., Sciutto, E., Gutierrez, G., Tapia-Conyer, R., Salvatierra, B., Sepúlveda, J. 1992. Encuesta Serológica Nacional: Cisticercosis. *Salud Pública de México*, 34:197-210.

López-Gómez, R., Cabrera-Ponce, J. L., Saucedo-Arias, L. J., Carreto-Montoya, L., Villanueva-Arce, R., Díaz-Perez, J. C., Gómez-Lim, M. A., Herrera-Estrella, L. 2009. Ripening in papaya fruits is altered by ACC oxidase cosuppression. *Transgenic Research*, 18:89-97.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. 1951. The folin phenol protein quantification method of protein. *Journal Biological Chemistry*, 193:265-275.

Loza-Rubio E, Rojas E, Gómez L, Olivera MT, Gómez-Lim MA. 2008. Development of an edible rabies vaccine in maize using the Vnukovo strain. *Development Biology (Basel)*, 131:477-482.

Manoutcharian, K., Rosas, G., Hernández, M., Fragoso, G., Aluja, A., Villalobos, N., Rodarte, L. F., and Sciutto, E. 1996. Cysticercosis: Identification and cloning of protective recombinant antigens. *Journal Parasitology*, 82:250-254.

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

Márquez, M. H., Austria, B. 1969. Cisticercosis en el Hospital General de México: estudio anatomopatológico de 165 casos. *Revista Latinoamericana de Patología*, 88:79-86.

Matsumura, T., Itchoda, N., Tsunemitsu, H. 2002. Production of immunogenic VP6 protein of bovine group A rotavirus in transgenic potato plants. *Archives Virology*, 147:1263-1270.

McGarvey, P. B., Hammond, J., Dienelt, M. M., Hooper, D. C., Fu, Z. F., Dietzchold, B., Koprowski, H., Michaels, F. H. 1995. Expression of the rabies virus glycoprotein in transgenic tomatoes. *Biotechnology*, 13:1484-1487

Ming, R., Hou, S., Feng, Y., Yu, Q., Dionne-Laporte, A., Saw, H. J., Senin, P., Wang, W. *et al.*, 2008. The draft genome of the transgenic tropical fruit tree papaya (*Carica papaya* Linnaeus). *Nature*, 452:991-996

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

Molinari, J. L., Soto, R., Tato, P., Rodriguez, D., Retana, A., Sepulveda, J., Palet, A. 1983. Immunization against porcine cysticercosis in an endemic area in Mexico: a field and laboratory study. *American Journal Tropical Medicine & Hygiene*, 49:502-512.

Morales, J., Martinez, J. J., Manoutcharian, K., Hernández, M., Fleury, A., Gevorkian, G., Acero, G., Blancas, A., Toledo, A., Cervantes, J., Maza, V., Quet F., Bonnabaue, H., Aluja, A., Fragoso, G., Larralde, C., Sciutto, E. 2008. Inexpensive anti-cysticercosis vaccine: S3Pvac expressed in heat inactivated M13 filamentous phage proves effective against naturally acquired *Taenia solium* porcine cisticercosis. *Vaccine*, 26:2899–2905.

Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for growth and bio-assay with tobacco tissue cultures. *Physiology Plant*, 15:473-497.

Nascimento, E., Costa, J. O., Guimaraes, M. P., Tavares, C. A. 1995. Effective immune protection of pigs against cysticercosis. *Veterinary Immunology & Immunopathology*, 45:127-137.

O Connor-Sanchez, A., Cabrera-Ponce, J. L., Valdez, M., Tellez, P., Pons, J. L., Herrera-Estrella, L. 2002. Development of an efficient genetic transformation system of tropical and subtropical maize genotypes. *Plant Cell Reports*, 21:302-312.

Okeniyi, J. A., Ogunlesi, T. A., Oyelami, O. A., Adeyemi, L. A. 2007. Effectiveness of dried *Carica papaya* seeds against human intestinal parasitosis: a Pilot Study. *Journal Medicinal Food*, 10:194-196.



Phiri, I. K., Ngowi, H., Afonso, S., Matenga, E., Boa, M., Mukaratirwa, S., Githigia, S., Saimo, M., Sikansunge, C., Maingi, N., Lubega, G. W., Kassuku, A., Michael, L., Siziya, S., Krecek, R. C., Noormahomed, E., Vilhena, M., Dorny, P., Willingham, A. L. 3<sup>rd</sup>. 2003. The emergence of *Taenia solium* cysticercosis in Eastern and Southern Africa as a serious agricultural problem and public health risk. *Acta Tropica*, 87:13-23

Vidi, P. A., Kessler, F., Bréhélin, C. 2007. Plastoglobules: a new address for targeting recombinant proteins in the chloroplast. *B. M. C. Biotechnology*, 7:4.

Plancarte, A., Flisser, A., Gauci, C. G., Lightowers, M. W. 1999. Vaccination against *Taenia solium* cysticercosis in pigs using native and recombinant oncosphere antigens. *International Journal Parasitology*, 29:643-647.

Poirier, Y., Nawrath, C. and Somerville, C. 1995. Production of polyhydroxyalkanoates, a family of biodegradable plastics and elastomers, in bacteria and plants. *Bio/Technology*, 13:142-150.

Rosales-Mendoza, S., Soria-Guerra, R. E., Lopez-Revilla, R., Moreno-Fierros, L., Alpuche-Solís, A. G. 2008. Indigestion of transgenic carrots expressing the *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit protects mice against cholera toxin challenge. *Plant Cell Reports*, 27:79-84.

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

Rossi, M., Carrari, F., Cabrera-Ponce, J. L., Vázquez-Rovere, C., Herrera-Estrella, L., Gudesblat, G., Lussem., N. D. 1998. Analysis of an abscisic acid (ABA)-responsive gene promoter belonging to the Asr gene family from tomato in homologous and heterologous systems. *Molecular Gene Genetics*, 258:1-8.

Sala, F., Rigano, M., Barbante, A., Basso, B., Walmsley, A, M., Castiglione, S. 2003. Vaccine antigen production in transgenic plants: strategies, gene constructs and perspectives. *Vaccine*, 21:803-808.

Sakuanrungsirikul, S., Sarindu, N., Prasartsee, V., Chaikiatiyos, S., Siriyan, R., Sriwatanakul, M., Lekananon, P., Kitprasert, C., Boonsong, P., Kosiyachinda, P., Fermin, G., Gonsalves, D. 2005. Update on the development of virus-resistant papaya: virus-resistant transgenic papaya for people in rural communities of Thailand. *Food & Nutrition Bulletin*, 26:422-426.

Sanford, J. C., De Vit, M. J., Rusell, J. A., Smith, F. D. Harpending, P. R., Roy, M. K., Jonhson, S. A. 1991. An improvement helium-driven bioballistic device. *Techniques*, 3:3-16.

Sarti, E. 1997. Teniosis y cisticercosis por *Taenia solium*. *Salud Pública de México*, 39:225-231.

Sciutto, E., Fragoso, G., Aluja, A., Hernández, M., Rosas, G., Larralde, C. 2008. Vaccines against cysticercosis. *Current Topics Medicinal Chemistry*, 8:415-423.

Sciutto, E., Fragoso, G., de Aluja, A., Manoutcharian, K., Hernández, M., Rosas, G., Villalobos, Rodarte, L. F. y Díaz, S. Avances en el desarrollo de una vacuna recombinante en contra de la cisticercosis porcina. Memorias del Simposio Internacional "Tanya Martínez Flisser". Mexico, D. F., 1996.

Sciutto, E., Fragoso, G., Fleury, A., Laclette, J. P., Sotelo, J., Aluja, A., Vargas, L, Larralde, C. 2000. *Taenia solium* disease in humans and pigs: An ancient parasitosis disease rooted in developing countries and emerging as a major health problem of global dimensions. *Microbes & infections*, 2:1875-1890.

Sciutto, E., Fragoso, G., Trueba, L., Lemus, D., Montoya, R. M., Diaz, M. L., Govezensky, T., Lomeli, C., Tapia, G., Larralde, C. 1990. Cysticercosis vaccine: cross protecting immunity with *T. solium* antigens against experimental murine *T. crassiceps* cysticercosis. *Parasite Immunology*, 12:687-696.

Sciutto, E., Morales, J., Martinez, J.J., Toledo, A., Villalobos, M.N, Cruz, C., Meneses, G., Hernández, M., Díaz, A., Rodarte, L.F., Acero, A., Gevorkian, G., Manoutcharian, K., Paniagua, J., Fragoso, G., Fleury, A. Larralde, R., de Aluja, A. and Larralde, C. 2007. Further evaluation of the synthetic peptide vaccine S3Pvac agst *Taenia solium* cysticercosis in pigs in an endemic town of Mexico. *Parasitology*, 134:129-133.

Sciutto, E., Rosas, G., Hernandez, M., Morales, J., Cruz-Revila, C., Toledo, A., Manoutcharian, K., Gevorkian, G., Blancas, A., Acero, G., Hernandez, B., Cervantes, J., Bobes, R.J., Goldbaum, F. A., Huerta, M., Diaz-Orea, A., Fleury, A., de Aluja, A. S., Cabrera-Ponce, J. L., Herrera-Estrella, L., Fragoso, G., Larralde, C. 2007. Improvement of the synthetic tri-peptide vaccine (S3Pvac) against porcine *Taenia solium* cysticercosis in search of a more effective, inexpensive and manageable vaccine. *Vaccine*, 25:1368-1378.

Steppek, G., Behnke, J. M., Buttle, D. J., Duce, L. R. 2004. Natural plant cysteine proteinases as anthelmintics? *Trends Parasitology*, 20:322-327.

Steppek, G., Buttle, D. J., Duce, I. R., Behnke, J. M. 2006. Human gastrointestinal nematode infections: are new control methods required? *International Journal Experimental Pathology*, 87:325-341.

Steppek, G., Curtis, R. H., Kerry, B. R., Shewry, P. R., Clark, S. J., Lowe, A. E., Duce, I. R., Buttle, D. J., Behnke, J. M. 2007. Nematicidal effects of cysteine proteinases against sedentary plant parasitic nematodes. *Parasitology*, 134:1831-1838.

Steppek, G., Lowe, A. E., Buttle D. J., Duce, I. R., Behnke, J. M. 2006. *In vitro* and *in vivo* anthelmintic efficacy of plant cysteine proteinases against the rodent gastrointestinal nematode, *Trichuris muris*. *Parasitology*, 132:681-689.

Steppek, G., Lowe, A. E., Buttle, D. J., Duce, I. R., Behnke, J. M. 2007a. *In vitro* anthelmintic effects of cysteine proteinases from plants against intestinal helminths of rodents. *Journal Helminthology*, 81:353-360.

Steppek, G., Lowe, A. E., Buttle, D. J., Duce, I. R., Behnke, J. M. 2007b. The anthelmintic efficacy of plant-derived cysteine proteinases against the rodent gastrointestinal nematode, *Heligmosomoides polygyrus*, *in vivo*. *Parasitology*, 134:1409-1419.

Steppek, G., Lowe, A. E., Buttle, D. J., Duce, I. R., Behnke, J. M. 2007c. Anthelmintic action of plant cysteine proteinases against the rodent stomach nematode, *Protospirura muricola*, *in vitro* and *in vivo*. *Parasitology*, 134:103-112.

Stoger, E., Vaquero, C., Torres, E., Sack, M., Nicholson, L., Drossard, J., Williams, S., Keen, D., Perrin, Y., Christou, P., Fisher, R. 2000. Cereal crops as viable production and storage systems for pharmaceutical scFv antibodies. *Plant Molecular Biology*, 42:583-590.

Streatfield, S. J., Jilka, J. M., Hood, E. E., Turner, D. D., Bailey, M. R., Mayor, J. M., Woodard, S. L., Beifuss, K., Horn, M. E., Delaney, D. E., Tizard, I. R., Howatd, J. A. 2001. Plant-based vaccines: unique advantages. *Vaccine*, 19:2742-2748.

Streatfield, J. S. and Howard, J. A. 2003. Plant-based vaccines. *International Journal Parasitology*, 33:479-493.

Streatfield, S. J. 2006. Mucosal immunization using recombinant plant-based oral vaccines. *Methods*, 38:150-157.

Tacket, C. O. 2005. Plant-derived vaccines against diarrheal diseases. *Vaccine*. 23:1866-1869.

Thanavala, Y., Yang, Y. F., Lyons, P., Mason, H. S., Arntzen, C. 1995. Immunogenicity of transgenic plant-derived hepatitis B surface antigen. *Proceeding National Academy Science. USA*, 92:3358-3361.

Toledo, A., Larralde, C., Fragoso, G., Gevorkian, G., Manoutcharian, K., Hernández, M., Acero, G., Rosas, G., Lopez-Casillas, F., Garfias-Kubli, C., Vázquez, R., Terrazas, I. and Sciutto, E. 1999. Towards a *Taenia solium* cysticercosis vaccine: An epitope shared by *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* protects mice against experimental cysticercosis. *Infection & Immunity*, 67:2522-2530.

Toledo, A., Fragoso, G., Rosas, G., Hernández, M., Gevorkian, G., López-Casillas, F., Hernández, B., Acero, G., Huerta, M., Larralde, C. and Sciutto, E. 2001. Two epitopes shared by *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* confer protection against murine *T. crassiceps* cysticercosis along with a prominent T1 response. *Infection & Immunity*, 69:1766-1773.

Tomes, D. T., Ross, M. C., Songstad, D. D. 1995. Direct DNA transfer into intact plant cells via microprojectile bombardment. In: *Plant Cell Tissue and Organ Culture. Fundamental Methods, Springer Lab Manual*. Springer-Verlag Berlin.

Tripathi, S., Suzuki, J., Gonzalves, D. 2007. Development of genetically engineered resistant papaya for papaya ringspot virus in a timely manner: a comprehensive and successful approach. *Methods Molecular Biology*, 354:197-240.

Tuboly, T. Yu, W., Bailey, A., Degrandis, S., Du, S., Erickson, L., Nagy, E. 2000. Immunogenicity of porcine transmissible gastroenteritis virus spike protein expressed in plants. *Vaccine*, 18:2023-2028.

Valdez, F., Hernandez, M., Govezensky, T., Fragoso, G., Sciutto, E. 1994. Immunization against *Taenia crassiceps* cysticercosis: identification of the most promising antigens in the induction of protective immunity. *Journal Parasitology* 80:931-936.

Van Kampen, V., Merget, R., Bruning, T. 2005. Occupational allergies to papain. *Pneumologie*, 59:405-410.

Villagran, J. and Olvera, J. E. 1988. Cisticercosis Humana: Estudio clínico y Patológico de 481 casos de autopsia. *Patología*, 26: 149–156.

Wakui, C., Akiyama, H., Watanabe, T., Fitch, M. M., Uchikawa, S., Ki, M., Takahashi, K., Chiba, R., Fujii, A., Hino, A., Maitani, T. 2004. A histochemical method using a substrate of beta-glucuronidase for detection of genetically modified papaya. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*, 45:19-24.

Walmsley, A. M., Arntzen, C. J. 2000. Plants for delivery of edible vaccines. *Current Opinion Biotechnology*, 11:126-129.



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

Wei, F. and Ming, R. A. 2008. A fruitful outcome to the papaya genome project. *Genome Biology*, 9:227.

Ye, C. M., Wei, X. D., Chen, D. H., Lan, C. Y., Zhu, L. M. 2003. Analyses of virus resistance and transgenes for transgenic papaya. *Yi Chuan*, 25:181-184.

Zhang, H., Liu, M., Li, Y., Zhao, Y., He, H., Yang, G., Zheng, C. 2010. Oral immunogenicity and protective efficacy in mice of a carrot-derived vaccine candidate expressing UreB subunit against *Helicobacter pylori*. *Protein Expression & Purification*, 69:127-131

#### XIV. ARTÍCULO PUBLICADO DERIVADO DEL TRABAJO DE TESIS

- ❖ **Hernández M**, Cabrera-Ponce, J. L., Fragoso, G., López-Casillas, F., Guevara-García, A., Rosas, G., León-Ramírez, C., Juárez, P., Sánchez-García, G., Cervantes, J., Acero, G., Toledo, A., Cruz, C., Bojalil, R., Herrera-Estrella, L., Sciutto, E. 2007. A new highly effective anticysticercosis vaccine expressed in transgenic papaya. *Vaccine*. 25:4252-4260.

Acad. Mexicana de Ciencias  
SERVICIOS DE INFORMACIÓN  
ARCHIVO HISTÓRICO



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Available online 16 March 2007

### Abstract

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

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

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

### 1. Introduction

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## 2. Materials and methods

### 2.1. Plant material

Seeds of papaya (*Carica papaya* L.) "Maradol Tabasco" were obtained from INIFAP (Instituto Nacional en Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias) Tabasco campus. Immature fruits were used as source of zygotic embryos for embryogenic papaya cells line (EmpCL) induction and propagation was performed according to Cabrera-Ponce et al. [17].

### 2.2. Sequence modifications

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

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

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

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

### 2.4. Genetic transformation

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

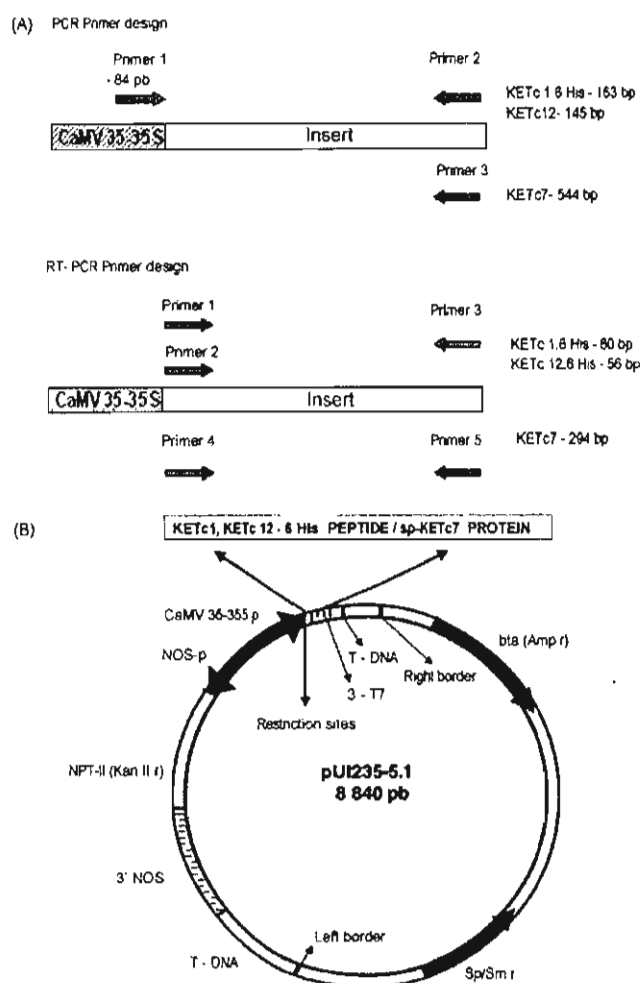


Fig. 1 (A) Design of primers used in PCR and RT-PCR for the detection of the transgene in ETgpC. (B) Schematic diagram of gene constructs.

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

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

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

### 2.6. PCR and RT-PCR analyses

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

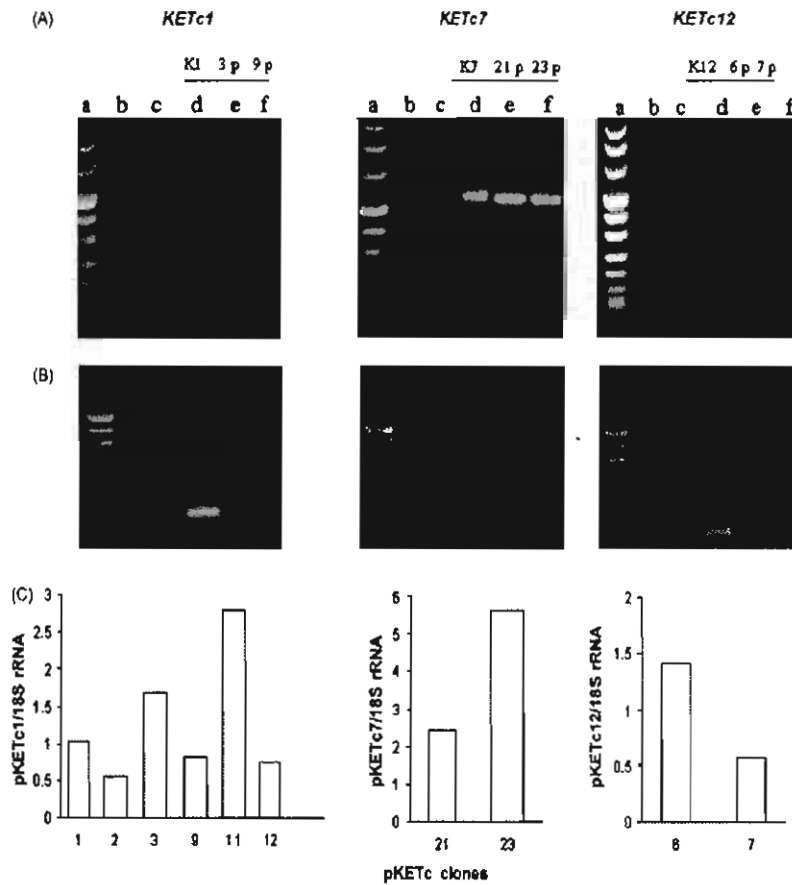


Fig. 2. Analysis of ETgpC revealed the presence of the KETc1.6His, KETc7 and KETc12.6His transgenes by PCR (A) and RT-PCR of the same clones (B), lanes a: VIII MW marker, b: pUI 235-5.1 vector without insert, c: EmpCL, d: pUI 235-5.1 vector with KETc1.6His or KETc7 or KETc12.6His peptide, e, f: KETc1.6His or KETc7 or KETc12.6His ETgpC. (C) Real-time quantitative RT-PCR of KETc1.6His or KETc12.6His or KETc7 content in ETgpC. The transcripts of the indicated clones were quantified and normalized to papaya 18S rRNA expression a.u. are plotted

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

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

2.7. Real time quantitative RT-PCR

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

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

### 2.8. Protein extraction

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

### 2.9. Detection of transgenic recombinant peptides

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

### 2.10. Mice

BALB/cAnN female mice ( $n = 10$  per experimental group) bred and kept in our animal facilities were used for vaccine trials. The experiments reported herein were conducted according to the principles set forth in the Guide for the Use of Laboratory Animals, Institute of Laboratory Animal Resources, National Research Council, Washington, DC, 1996. The experimental protocols were approved by the Animal Care Committee of the University and following the Guide for Care and Use of Experimental Animals.

### 2.11. Immunizations

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

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

### 2.12. Immunohistochemistry

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

### 2.13. Parasite and infections

For infections, *T. crassiceps* ORF cysticerci were harvested from the peritoneal cavity of mice, 1–3 months after inoculation of 10 cysticerci per mouse as described [24]. Ten days after the last immunization, mice were intraperitoneally infected with 10 small (2 mm in diameter), non-budding cysticerci of *T. crassiceps* in 0.5 ml of PBS. Mice were sacrificed 40 days after infection and the cysts inside their peritoneal cavity were harvested and counted as previously reported [24].

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

### 2.14. Statistical analysis

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

## 3. Results

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

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

235-5.1 containing the KETc1.6His, KETc12.6His or KETc7 coding sequences (Fig. 1A). Forty one ETgpC were obtained all of them with stable  $\beta$ -glucuronidase activity and were isolated and propagated for further analysis. The transgene (KETc1.6His, KETc12.6His and KETc7) and its expression was confirmed in 19 ETgpC by PCR and RT-PCR, respectively, 15 corresponding to KETc1.6His, two to KETc12.6His and two to KETc7 as shown in Fig. 2 (lane e, f). Fig. 2A shows the amplification of the products of expected sizes according to the positive controls (KETc1.6His (163 bp), KETc12.6His (154 bp) and KETc7 (544 bp), Fig. 2A lane d). These products were neither present in the pUI 235 5.1 vector (lane b) nor in the EmpCL (lanes c). The transcripts of the transgenes were evaluated by RT-PCR (Fig. 2B). The empty vector and EmpCL (lane b and c) were used as negative controls. Nineteen clones produced the transcript of expected sizes, some illustrated in Fig. 2B (lanes e, f).

### 3.2. Transcript estimation level

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

### 3.3. Antibody induction by immunization with ETgpC

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

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

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

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

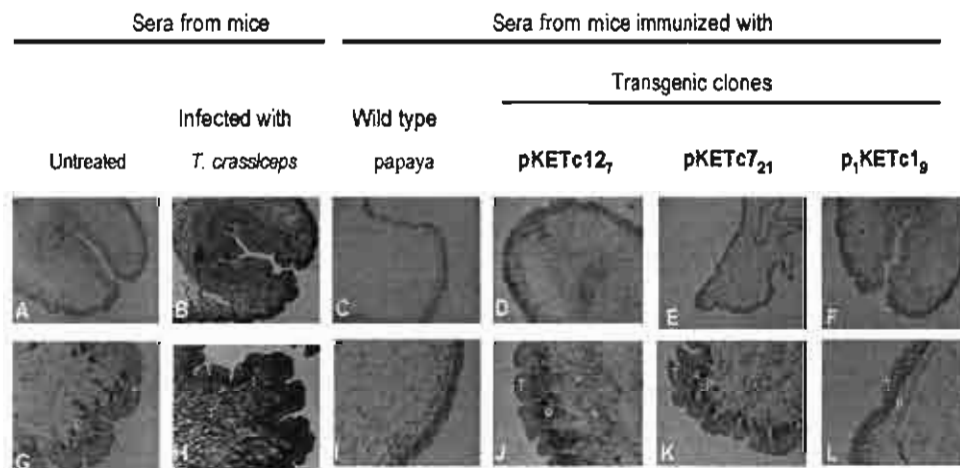


Fig. 3. Immunohistochemistry to detect specific antibodies. Sections of 6  $\mu$ m of *T. crassiceps* tissues were processed and incubated with sera from untreated mice (A, G), from *T. crassiceps*-infected mice (B, H) and from mice immunized with ETgpC (B–F and H–L). KETc7 was detected in tegument (T)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



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

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

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

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

#### 4. Discussion

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

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

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

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

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

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

(pKETc12<sub>5</sub> and pKETc12<sub>7</sub>) and one of KETc7 (pKETc7<sub>23</sub>). Remarkable is also that 200 µg of ETgpC soluble extract, without the presence of adjuvant and with only one booster elicited high level of protection against murine cysticercosis (Table 1), which indicates the high immunogenicity of the recombinant peptides. Some of them induced almost complete resistance to the parasitosis. Differences in vaccine efficiency between the ETgpC tested for the same peptide could be related to the content and/or conformation exhibited by the peptide. As expected, the highest level of protection was induced by the ETgpC which also exhibited the highest level of expression as determined by real time RT-PCR (Table 2, Fig. 2C). Moreover, the level of protection generated with the recombinant peptides KETc1.6His, KETc12.6His and KETc7 delivered by ETgpC is significantly higher than that obtained with the corresponding synthetic peptides [9,10,25]. Immunized mice elicited specific Abs that recognized the respective peptide in the native proteins in the larval parasite stage [9,10] confirming that the recombinant peptides expressed in ETgpC maintained their immunogenic properties. However, KETc1.6His and KETc12.6His could not be detected in ETgpC by ELISA using antibody anti-His (C-Term), probably due to the low expression of the recombinant peptides.

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

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

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

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

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

#### Acknowledgements

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

#### References

- [1] Sciutto E, Frago G, Fleury A, Lacleite JP, Solejo P, Aluja A, et al. Limitations of current diagnostic procedures for the diagnosis of *Taenia solium* cysticercosis in rural pigs. *Microbes Infect* 2000;15:1875–90.
- [2] Carabin H, Kreeck RC, Cowan LD, Michael L, Silbat-Foyaca H, Nash T, et al. Estimation of the cost of *Taenia solium* cysticercosis in Eastern Cape Province, South Africa. *Trop Med Int Health* 2006;11:906–16.
- [3] Molinari JL, Rodríguez D, Tato P, Soto R, Arechavaleta F, Solano S. Field trial for reducing porcine *Taenia solium* cysticercosis in Mexico by systematic vaccination of pigs. *Vet Parasitol* 1997;69:55–63.
- [4] Nascimento E, Costa JO, Guimarães MP, Tavares CA. Effective immune protection of pigs against cysticercosis. *Vet Immunol Immunopathol* 1995;45:127–37.
- [5] Cai X, Chai Z, Jing Z, Wang P, Luo X, Chen J, et al. Studies on the development of DNA vaccine against *Cysticercus cellulosae* infection and its efficacy. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2001;32:105–10.
- [6] Manoutcharian K, Diaz-Orea A, Gevorkian G, Frago G, Acero G, Gonzalez E, et al. Recombinant bacteriophage-based multicapsid vaccine against *Taenia solium* pig cysticercosis. *Vet Immunol Immunopathol* 2004;99:11–24.
- [7] Flisser A, Gaucci GC, Zoli A, Martínez-Ocana J, Garza-Rodríguez A, Domínguez-Alpizar JL, et al. Induction of protection against porcine cysticercosis by vaccination with recombinant oncosphere antigens. *Infect Immun* 2004;72:5292–7.
- [8] Gonzalez AE, Gaucci GC, Barber D, Gilman RH, Tsang VC, Garcia HH, et al. Vaccination of pigs to control human neurocysticercosis. *Am J Trop Med Hyg* 2005;72:837–9.
- [9] Toledo A, Larralde C, Frago G, Gevorkian G, Manoutcharian K, Hernandez M, et al. Towards a *Taenia solium* cysticercosis vaccine: an epitope shared by *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* protects mice against experimental cysticercosis. *Infect Immun* 1999;67:2522–30.
- [10] Toledo A, Frago G, Rosas G, Hernandez M, Gevorkian G, Lopez-Casillas F, et al. Two epitopes shared by *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* confer protection against murine *T. crassiceps* cysticercosis along with a prominent T1 response. *Infect Immun* 2001;69:1766–73.
- [11] Huerrn M, de Aluja AS, Frago G, Toledo A, Villalobos N, Hernández M, et al. Synthetic peptides vaccine against *Taenia solium* pig cysticercosis: successful vaccination in a controlled field trial in rural Mexico. *Vaccine* 2001;20:262–6.
- [12] Sciutto E, Morales J, Martínez JJ, Toledo A, Villalobos N, Cruz-Revilla C, et al. Further evaluation of the synthetic peptide vaccine 53Pvac

- against *Taenia solium* cysticercosis in pigs in an endemic town of Mexico. *Parasitol* 2006;4:1–5.
- [13] Aluja AS, Villalobos NM, Nava G, Toledo A, Martínez JJ, Plancarte A, et al. Therapeutic capacity of the synthetic peptide-based vaccine against *Taenia solium* cysticercosis in pigs. *Vaccine* 2005;23:4062–9.
- [14] Shen X, Lagergard T, Yang Y, Lindblad M, Frodriksson M, Holmgren J. Systemic and mucosal immune response in mice after mucosal immunization with group B streptococcus type III capsular polysaccharide-cholera toxin B subunit conjugate vaccine. *Infect Immun* 2000;68:5749–55.
- [15] Rydell N, Sjöholm L. Oral vaccination against diphtheria using polyacryl starch microparticles as adjuvant. *Vaccine* 2004;22:1265–74.
- [16] Mojica-Henshaw MP, Francisco AD, de Guzman F, Tigno TX. Possible immunomodulatory actions of *Carica papaya* seed extract. *Clin Hematol Microcirc* 2003;29:219–29.
- [17] Cabrera-Ponce JL, Vegas JA, Herrera-Estrella L. Herbicide resistant transgenic papaya plants produced by an efficient particle bombardment transformation method. *Plant Cell Reports* 1995;15:1–7.
- [18] Rosas G, Cruz-Revilla C, Fragoso G, Lopez-Casillas FA, Perez M, Bonilla R, et al. *Taenia crassiceps* cysticercosis: humoral immune response and protection elicited by DNA immunization. *J Parasitol* 1998;84:516–23.
- [19] López-Bucio J, Martínez De La Vega O, Guevara-García A, Herrera-Estrella L. Enhanced phosphorus uptake in transgenic tobacco plants that overproduce citrate. *Nat Biotechnol* 2000;18:450–3.
- [20] Cabrera-Ponce JL, López L, Assad-García C, Medina-Arevalo N, Bailey A, Herrera-Estrella L. An efficient particle bombardment system for the genetic transformation of asparagus (*Asparagus officinalis* L.). *Plant Cell Reports* 1997;16:255–60.
- [21] Christou P, Ford TL, Kolron M. The development of a variety independent gene-transfer methods for rice. *Trends Biotechnol* 1992;10:239–46.
- [22] Shure M, Wessler S, Fedoroff N. Molecular identification and isolation of the Waxy locus in maize. *Cell* 1983;35:225–33.
- [23] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265–75.
- [24] Fragoso G, Lamoysa E, Mellor A, Lombeli C, Hernandez M, Sciutto E. Increased resistance to *Taenia crassiceps* murine cysticercosis in Qa2 transgenic mice. *Infect Immun* 1998;66:760–4.
- [25] Manoutcharian K, Rosas G, Hernandez M, Fragoso G, Aluja A, Villalobos N, et al. Cysticercosis: identification and cloning of the protective recombinant antigens. *J Parasitol* 1996;82:250–4.
- [26] Wen SX, Teel LD, Judge NA, O'Brien AD. A plant-based oral vaccine to protect against systemic intoxication by Shiga toxin type 2. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:7062–7.
- [27] Daniell H, Streatfield SJ, Wycoff K. Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants. *Trends Plant Sci* 2001;6:219–26.
- [28] Chapagain BP, Wiesman Z. Phyto-saponins as a natural adjuvant for delivery of agromaterials through plant cuticle membranes. *J Agric Food Chem* 2006;54:6277–85.

## **XV. CONTRIBUCIÓN DERIVADA DEL DESARROLLO DEL TRABAJO DE TESIS.**

### **Registro de la patente**

“MÉTODO PARA LA PRODUCCIÓN DE ANTÍGENOS RECOMBINANTES PARA USO COMO VACUNA CONTRA LA CISTICERCOSIS-TENIASIS”

**Inventores:** Edda Lydia Sciutto Conde, **Rutilia Marisela Hernández González**, Gladis del Carmen Fragoso González, Jacquelynne Brenda Cervante Torres, Fernando López Casillas, Ángel Arturo Guevara García, Luis Herrera Estrella, José Luis Cabrera Ponce, Claudia Geraldine León Ramírez, Gabriela Rosas Salgado.

Número de Expediente MX/a/2008/006604

No. Folio: MX/E/2008/032787



Solicitud de Patente  
 Solicitud de Registro de Modelo de Utilidad  
 Solicitud de Registro de Oseño Industrial

Modelo Industrial     Dibujo Industrial

Uso exclusivo Delegaciones y Subdelegaciones de la Secretaría Economía y Oficinas Regionales IMPI.

Sello

Folio de entrada

Fecha y hora de recepción

Solicitud Expediente: MX/a/2008/026604  
 Fecha: 22/MAY/2008 Hora: 12:34  
 Folio: MX/E/2008/032787 49296



Atento de leer la forma los requisitos generales al revisar

**I DATOS DEL (DE LOS) SOLICITANTE(S)**

El solicitante es el inventor  El solicitante es el causahabiente

1) Nombre (s): UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO y CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

2) Nacionalidad (es): MEXICANA y MEXICANA

3) Domicilio; calle, número, colonia y código postal: 0° PISO DE LA TORRE DE RECTORÍA S/N, CIUDAD UNIVERSITARIA, DELEGACIÓN COYOACÁN, C.P. 04510.

Población, Estado y País: MÉXICO, DISTRITO FEDERAL.

4) Teléfono (clave): 56226329 AL 31      5) Fax (clave): 56226328

**II DATOS DEL (DE LOS) INVENTOR(ES)**

6) Nombre (s): EDDA LYDIA SCIUTTO CONDE, RUTILIA MARISELA HERNÁNDEZ GONZÁLEZ, GLADIS DEL CARMEN FRAGOSO GONZÁLEZ, JACQUELYNNE BRENDA CERVANTES, FERNANDO LÓPEZ CASILLAS, ÁNGEL ARTURO GUEVARA GARCÍA, LUIS HERRERA ESTRELLA, JOSÉ LUIS CABRERA PONCE, CLAUDIA GERALDINE LEÓN RAMÍREZ, GABRIELA ROSAS SALGADO.

7) Nacionalidad (es): MEXICANA, MEXICANA, MEXICANA, MEXICANA, MEXICANA, MEXICANA, MEXICANA, MEXICANA, MEXICANA y MEXICANA.

8) Domicilio; calle, número, colonia y código postal: PRIVADA DE LA SELVA 108, COL. LOMAS DE LA SELVA, C.P. 62270  
 Población, Estado y País: CUERNAVACA, MORELOS, MÉXICO.

9) Teléfono (clave):      10) Fax (clave):

**III DATOS DEL (DE LOS) APODERADO(S)**

11) Nombre (s): LIC. JESÚS GARCÍA MONCADA      12) R G P: DDAL-10052

13) Domicilio; calle, número, colonia y código postal: EDIFICIO "B" 3er. PISO, ZONA CULTURAL DE CIUDAD UNIVERSITARIA, DELEGACIÓN COYOACÁN, C.P. 04510.

Población, Estado y País: MÉXICO, DISTRITO FEDERAL      14) Teléfono (clave): 56 22 63 29 AL 31      15) Fax (clave): 56 22 63 28

16) Personas Autorizadas para oír y recibir notificaciones: LIC. ROGIO JUÁREZ VÁZQUEZ, LIC. RUBÉN GONZÁLEZ GALINDO, LIC. MARÍA VANESSA REYES CEBALLOS y LIC. CLAUDIA LIZBETH LLANOS ARGÜELLO.

17) Denominación o Título de la Invención: "MÉTODO PARA LA PRODUCCION DE ANTIGENOS RECOMBINANTES PARA USO COMO VACUNAS CONTRA LA CISTICERCOSIS-TEMASIS".

18) Fecha de divulgación previa: 22 | MAYO | 2007      19) Clasificación Internacional: uso exclusivo del IMPI

20) Divisional de la solicitud      21) Fecha de presentación

Número	Figura jurídica	Día	Mes	Año	No. de serie
22) Prioridad Reclamada:	Fecha de presentación				
Pais	Día Mes Año				

**Lista de verificación [uso interno]**

No. Hojas		No. Hojas	
X	1 Comprobante de pago de la tarifa	X	6 Documento de cesión de derechos
X	13 Descripción y reivindicación (es) de la invención	X	7 Constancia de depósito de material biológico
X	7 Dibujo (s) en su caso	X	7 Documento (s) comprobatorio(s) de divulgación previa
X	1 Resumen de la descripción de la invención		Documento (s) de prioridad
X	1 Documento que acredita la personalidad del apoderado		Traducción
		35	TOTAL DE HOJAS

Observaciones:

LIC. JESÚS GARCÍA MONCADA      CO. UNIVERSITARIA, D.F., A 22 DE MAYO DE 2008  
 Nombre y firma del solicitante e su apoderado      Lugar y fecha

## XVI. ARTÍCULOS PUBLICADOS EN COLABORACIÓN DURANTE EL DESARROLLO DE LA TESIS

- ❖ Sciutto, E., Rosas, G., **Hernández, M.**, Morales, J., Cruz-Revilla, C., Toledo, A., Manoutcharian, K., Gevorkian, G., Blancas, A., Acero, G., Hernández, B., Cervantes, J., Bobes, R. J., Goldbaum, F. A., Huerta, M., Díaz-Orea, A., Fleury, A., de Aluja, A. S., Cabrera-Ponce, J. L., Herrera-Estrella, L., Fragoso, G., Larralde, C. 2007. Improvement of the synthetic tri-peptide vaccine (S3Pvac) against porcine *Taenia solium* cysticercosis in search of a more effective, inexpensive and manageable vaccine. *Vaccine*. 25:1368-1378.



Review

Improvement of the synthetic tri-peptide vaccine (S3Pvac) against porcine *Taenia solium* cysticercosis in search of a more effective, inexpensive and manageable vaccine

Edda Sciutto<sup>a,\*</sup>, Gabriela Rosas<sup>b</sup>, Marisela Hernández<sup>a</sup>, Julio Morales<sup>c</sup>, Carmen Cruz-Revilla<sup>a</sup>, Andrea Toledo<sup>a</sup>, Karen Manoutcharian<sup>a</sup>, Goar Gevorkian<sup>a</sup>, Abel Blancas<sup>a</sup>, Gonzalo Acero<sup>a</sup>, Beatriz Hernández<sup>d</sup>, Jacquelynne Cervantes<sup>a</sup>, Raul J. Bobes<sup>a</sup>, Fernando A. Goldbaum<sup>e</sup>, Mirna Huerta<sup>f</sup>, Alicia Diaz-Orea<sup>g</sup>, Agnes Fleury<sup>h</sup>, Aline S. de Aluja<sup>c</sup>, Jose Luis Cabrera-Ponce<sup>i</sup>, Luis Herrera-Estrella<sup>i</sup>, Gladis Fragoso<sup>a</sup>, Carlos Larralde<sup>a</sup>

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

<sup>b</sup> Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, 62210 Cuernavaca, Morelos, Mexico

<sup>c</sup> Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. 04510, Mexico

<sup>d</sup> Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. 04510, Mexico

<sup>e</sup> Fundación Instituto Leloir, Universidad de Buenos Aires, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Av. Patricias Argentinas 435, Buenos Aires 1405, Argentina

<sup>f</sup> Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de Puebla, Puebla, Mexico

<sup>g</sup> Centro de Investigación Biomédica de Oriente, Instituto Mexicano del Seguro Social, Puebla, Mexico

<sup>h</sup> Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, SSA, Insurgentes Sur 3877, México, D.F. 14269, Mexico

<sup>i</sup> Unidad de Biotecnología e Ingeniería Genética de Plantas, Unidad Irapuato, Libramiento Norte, km 9.6, Irapuato, Guanajuato, Mexico

Received 31 July 2006; received in revised form 3 October 2006; accepted 4 October 2006

Available online 23 October 2006

Abstract

Vaccination of pigs may curtail *Taenia solium* transmission by reducing the number of cysticerci, the precursors of adult intestinal tapeworms in humans. Several antigen preparations induce protection against porcine cysticercosis in experimental settings but only one subunit vaccine (S3Pvac) has been tested and proved effective in the field against naturally acquired disease. Besides improving of the vaccine's effectiveness, significant reductions in production costs and in the logistics of its administration are necessary for the feasibility of nationwide control programs.

This review highlights the development of several versions of S3Pvac aimed to increase effectiveness, reduce costs and increase feasibility by novel delivery systems and alternative routes of administration.

© 2006 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: *Taenia solium*; Cysticercosis; Vaccination; S3Pvac improvement; Control

Contents

1. The dimensions of the task ..... 1369
2. Immunological effectiveness ..... 1369
2.1. Effective vaccine candidates against experimental *T. solium* porcine cysticercosis ..... 1369

\* Corresponding author. Tel.: +52 55 56223153; fax +52 55 56223369. E-mail address: edda@servidor.unam.mx (E. Sciutto).

3. Identification of the S3Pvac components .....	1371
3.1. Usefulness of <i>T. crassiceps</i> murine cysticercosis as an experimental model for the identification of promising vaccine candidates against <i>T. solium</i> porcine cysticercosis .....	1371
3.2. Development of the synthetic S3Pvac vaccine .....	1371
3.3. Field trials of S3Pvac against naturally acquired porcine cysticercosis .....	1371
4. Reducing costs of production of the S3Pvac anti-cysticercosis vaccine .....	1374
5. Improving the feasibility of S3Pvac wide and sustained application .....	1375
5.1. Expressing the peptides on <i>Brucella</i> spp. humazine synthase: a novel adjuvant and antigen delivery system that effectively induces oral immunity .....	1375
5.2. Expressing the peptides on transgenic papaya embryogenic callus: a new antigen delivery system .....	1375
6. The mechanisms of S3Pvac protection .....	1375
7. Concluding remarks .....	1376
Acknowledgments .....	1376
References .....	1376

## 1. The dimensions of the task

In order for a vaccine against porcine cysticercosis to significantly reduce transmission of *Taenia solium* in humans and pigs living in the poorest areas of the Third World, where the parasite thrives, the vaccine must not only be immunologically effective but must also be inexpensive and simple to administrate to millions of rustically bred pigs, which are renewed each year and are dispersed in thousands of villages across large and variable geographic territories.

## 2. Immunological effectiveness

### 2.1. Effective vaccine candidates against experimental *T. solium* porcine cysticercosis

Vaccination is one of the most effective biotechnological tools for the control of bacterial and viral infections [1–3]. In contrast with vaccines against various protozoan parasite infections which have faced serious difficulties [4–6], the vaccines against infections caused by the metacystode stage of several cestodes, have consistently proved effective in experimental conditions. Indeed, several effective vaccine candidates have been developed since the pioneering work of Rickard and White [7] against the larval phase of *Taenia ovis* [8]. There are currently a number of reports about successful vaccination against metacystode disease caused by *Taenia saginata* [9,10]; *T. solium* [11–15]; *Echinococcus granulosus* and *E. multilocularis* [16–18]; *Taenia crassiceps* [19–24] and *Hymenolepis nana* [25]. Two parameters are usually employed to evaluate vaccine efficacy against porcine cysticercosis: the number of infected pigs (detected by necropsy or by tongue inspection) and the number of cysticerci identified in each carcass (intensity). Tongue inspection is notoriously less sensitive than thorough histological dissection at necropsy [26,27]. In many instances, however, either because of the large number of pigs involved in the study or because of the owners' refusal to sacrifice their pigs, or because diagnosis of antibody levels in vaccinated animals is ambiguous,

tongue inspection is the only plausible way to estimate the protective effects of the vaccine. The vulnerability of the metacystodes to the acquired immune response induced by vaccination may be related to a number of factors not yet extensively explored, among which the Th1, Th2 [28–32] and innate-immunity profiles seem to be involved [33]. Host and parasite-related factors (i.e., genetic background [34,35] and sex [36]) may also be involved in the effectiveness of vaccination. In addition, the high vulnerability of infective oncospheres to antibodies could also underlie the high efficacy of vaccination against taeniid cestodes [37,38].

In 1983, Molinari et al. reported the first vaccine candidate against porcine cysticercosis, based on a total extract from *T. solium* cysticerci [11]. Later on, many other vaccine candidates were developed by purification of *T. solium* and other taeniids' cross-reacting cysticercal antigens in parasites recovered from naturally or experimentally infected hosts [11,12,20,39–41]. Afterwards, other successful efforts were made to identify and produce subunit vaccines in search of a stable product with high and uniform immunogenic activity (Table 1). High levels of protection were obtained using different parasite antigens from different stages of parasite development, i.e., oncospheres [13], cysticerci [11,39,40] and from homologous and/or heterologous cysticerci (Table 1).

As is also shown in Table 1, high protection levels against experimental challenge were obtained using total extracts, vesicular fluid, semi-purified and recombinant or synthetic antigens. Good results were also obtained using DNA vaccination (Table 2). Worth noting is that all but one purified or recombinant vaccine candidates have been tested only under experimental conditions. Only S3Pvac has been tested twice against naturally acquired porcine cysticercosis and its efficiency has been measured by tongue inspection because of the large numbers of pigs included in the study. Some results were also obtained by necropsy but in fewer animals. Postmortem studies in the field meet with the extreme difficulties in programming the times of slaughter and necropsy inspection on account of the harsh conditions prevailing in the rural endemic areas of underdeveloped countries, where need of nourishment or local festivities frequently interfere with the strict following of the program [52]. Nonethe-



Table 1  
Listing of results in vaccination against *Taenia solium* porcine cysticercosis

Source of antigens + adjuvant	Vaccine	Dose (per pig)	Number	Via	Diagnosis	Protection level (% reduction)	Challenge (per pig)	Reference
<i>T. solium</i> carcassory—secretory antigens + FCA		2.5 ml + 2.5 ml	1	n.t.	Necropsy	95% cysticerci	15,000 eggs	[42]
<i>T. solium</i> cysticerci extract		250 µg/pig	3	i.m.	Necropsy	74% cysticerci	Field trial	[11]
Taiwan <i>Taenia</i> frozen oncospheres + FCA		$1.6 \times 10^4$	1	s.c.	Necropsy	50% infected pigs, 98% cysticerci	$1.6 \times 10^4$ <i>T. Taeniam</i> eggs	[43]
Korea <i>Taenia</i> frozen oncospheres + FCA		$1.6 \times 10^4$	1	s.c.	Necropsy	33% infected pigs, 98% total cysticerci	$1.6 \times 10^4$ <i>T. Taeniam</i> eggs	[43]
<i>T. saginata asiatica</i> frozen oncospheres + FCA		$1.6 \times 10^4$	1	s.c.	Necropsy	33% infected pigs, 99% cysticerci	$1.6 \times 10^4$ <i>T. Taeniam</i> eggs	[43]
<i>T. solium</i> frozen oncospheres + FCA		$1.6 \times 10^4$	1	s.c.	Necropsy	100% infected pigs, 77% cysticerci	$1.6 \times 10^4$ <i>T. Taeniam</i> eggs	[43]
<i>Taenia crassiceps</i> extract + FCA		400 µg		i.m.	Necropsy	50% cysticerci	$2.5 \times 10^5$ eggs	[12]
<i>T. solium</i> cysticerci extract		250 µg		i.m.	Tongue	100% infected pigs	Field trial	[39]
<i>T. solium</i> cysticerci extract		150 µg		i.m.	Tongue	82% infected pigs	Field trial	[40]
<i>T. solium</i> scolex extract + FIA		1st (3 mg); 2nd und	3	s.c.	Necropsy	71% cysticerci	$10^4$ eggs	[41]
<i>T. solium</i> scolex extract + <i>Corynebacterium parvum</i>		3rd (300 µg)	3	s.c.	Necropsy	75% cysticerci	$10^4$ eggs	[41]
Three synthetic <i>T. crassiceps</i> peptides + S		250 µg/peptide	2	s.c.	Necropsy	98% ver cysticerci	Field trial	[14]
Three synthetic <i>T. crassiceps</i> peptides + S		250 µg/peptide	2	s.c.	Tongue	70–80% infected pigs	Field trial	[44]
TSOL18-GST + Quil A		200 µg	2	i.m.	Necropsy	100% cysticerci	$40 \times 10^3$ eggs	[15]
TSOL45-1A-GST + Quil A		200 µg	2	i.m.	Necropsy	0%	$40 \times 10^3$ eggs	[15]
TSOL18-GST + TSOL45-1A-GST + Quil A		200 µg each	2	i.m.	Necropsy	95%	$40 \times 10^3$ eggs	[15]
TSOL18-GST + Quil A		200 µg	3	i.m.	Necropsy	99%	$9 \times 10^3$ eggs	[15]
TSOL45-1A-GST + Quil A		200 µg	4	i.m.	Necropsy	97%	$9 \times 10^3$ eggs	[15]
TSOL18-GST + Quil A		200 µg	2	NR	Necropsy	99.9% cysticerci	Gravid proglottids	[45]
TSOL45-1A-GST + Quil A		200 µg	2	NR	Necropsy	97% cysticerci	Gravid proglottids	[45]
<i>T. crassiceps</i> S6 + 66 + 74 kDa proteins + FCA		150 µg	2	i.m.	Necropsy	97% cysticerci, 86% infected pigs	$2.5 \times 10^5$ eggs	[20]
Recombinant phage (KETc1 + KETc7 + KETc12 + GK1)		$4 \times 10^{11}$ recombinant phages	2	i.m.	Necropsy	97% ver cysticerci, 95% total cysticerci	$17 \times 10^3$ eggs	[46]
Recombinant phage (KETc1 + KETc7 + KETc12 + GK1)		$4 \times 10^{12}$ recombinant phages	2	Oral	Necropsy	89% ver cysticerci, 42% cysticerci	$17 \times 10^3$ eggs	[46]

FCA: Freund complete adjuvant; FIA: Freund incomplete adjuvant; S: saponin; NR: not reported; tongue: tongue inspection; ver: cysticerci; total: total cysticerci.

Table 2  
Listing of results in DNA vaccination against *T. solium* porcine cysticercosis

Source of antigens + adjuvant	Vaccine			Diagnosis	Protection level (%)	Challenge (# eggs/pig)	Reference
	Dose (per pig) ( $\mu$ g)	Number	Via				
<i>T. solium</i> B + PV93	100	3	i.m.	Necropsy	85–99% cysticercosis	$18 \times 10^2$	[47]
cCl + pcDNA3	500	3	i.m.	Necropsy	73% cysticercosis	$2 \times 10^4$	[48]
pVAX-S-deltaC-3n: hepatitis B core antigen particle + S3Pvac + IL2 signal peptide	500	2	i.m.	Necropsy	83% cysticercosis	$2 \times 10^4$	[49]
pcDNA3-cCl + (GST-cCl + FIA)	500 + 200	3	i.m.	Necropsy	Challenged (weeks after vaccination) 6 weeks, 85%; 12 weeks, 77%; 20 weeks, 72–79%	$2 \times 10^4$	[50]
pcDNA3-B <i>T. solium</i> : antigen B + pcDNA3.1	1000 + 200	1	i.m.	Necropsy	92.6% cysticercosis, 4/5 pigs totally protected	$2 \times 10^4$	[51]

less, note in Table 1 that vaccination effectively reduced the intensity of the pigs' natural infection above 90% and to a lesser extent (~50–70%) the percent of totally protected pigs [14].

### 3. Identification of the S3Pvac components

#### 3.1. Usefulness of *T. crassiceps murine* cysticercosis as an experimental model for the identification of promising vaccine candidates against *T. solium* porcine cysticercosis

Experimentation leading to a vaccine candidate against porcine cysticercosis is costly, difficult and slow if performed in pigs. On the other hand, experimental murine cysticercosis caused by *T. crassiceps* is a comparatively inexpensive and fast alternative approach to test antigens to be used as vaccine candidates against *T. solium* pig cysticercosis. The similarities in antigen composition among these two cestodes [53] and others [44,54,55] have allowed the use of antigens from one species to be applied to studies of a different one [12,13,19,24,56]. In addition, *T. crassiceps* cysticercosis can rapidly reproduce asexually in the peritoneal cavity of mice, and intensity can be counted in each infected mouse, a convenient property that facilitates the assessment of vaccination effects, as well as the effects of sex, age, stress and genetic background [19,34,57]. Murine cysticercosis has demonstrated the value of investigating promising antigens for vaccination [12,19] and of testing different vaccination approaches [23,58,59].

#### 3.2. Development of the synthetic S3Pvac vaccine

Three recombinant antigens (KETc7, KETc1 and KETc12) against cysticercosis were identified in a cDNA library of *T. crassiceps* metacestodes using specific antibodies against two antigen fractions that induced high levels of protection against murine and pig cysticercosis [20]. These recombinant antigens were also recognized by sera from *T.*

*solium*-infected pigs and were shown to induce protective immunity against murine cysticercosis [20].

The recombinant antigen KETc7 codes for a polypeptide of 100 amino acids. Its protective capacity has been confirmed using DNA vaccination [23,60,61]. Furthermore, three putative epitopes were identified in the KETc7 sequence by computer-aided prediction of antigenicity and were synthesized in solid-phase [62]. The protective capacity of the three synthetic peptides produced was tested in murine cysticercosis. One of these peptides of 18 aa, produced in the linear form (GK1), induced the highest levels (96–99%) of protection against murine cysticercosis [21]. In addition, based on the complete amino acid sequence encoded by selected clones, two peptides designated as KETc1 (12 aa) and KETc12 (8 aa) were synthesized. Both peptides also induced high levels (66.7–100% and 52.7–88.1%, respectively) of protection against murine cysticercosis [22]. It should be noted that these three peptides belong to native antigens present along the different stages of *T. solium* parasite development (egg, tapeworm and cysticercus) [21,22], and that are exposed in different anatomical structures, thus representing different immunological targets in the parasite (Figs. 1 and 2), a fact that widens the spectrum of action of the vaccine, offering the possibility of being used to prevent the intestinal tapeworm stage of the parasite [63].

#### 3.3. Field trials of S3Pvac against naturally acquired porcine cysticercosis

The field trial is an indispensable requirement before the extensive application of a vaccine to prevent naturally acquired disease in the authentic subjects that are continuously exposed to high risk of infection. The stress on realistic testing is of particular relevance in pig cysticercosis because of the many variables involved in the dynamics of transmission. It does not suffice that the antigen(s) are effective in highly controlled experimental conditions. Experiments usually employ a low number of pigs, all of uniform genetic background, of similar age and gender, in superb health and relaxed conditions and very well nourished with balanced

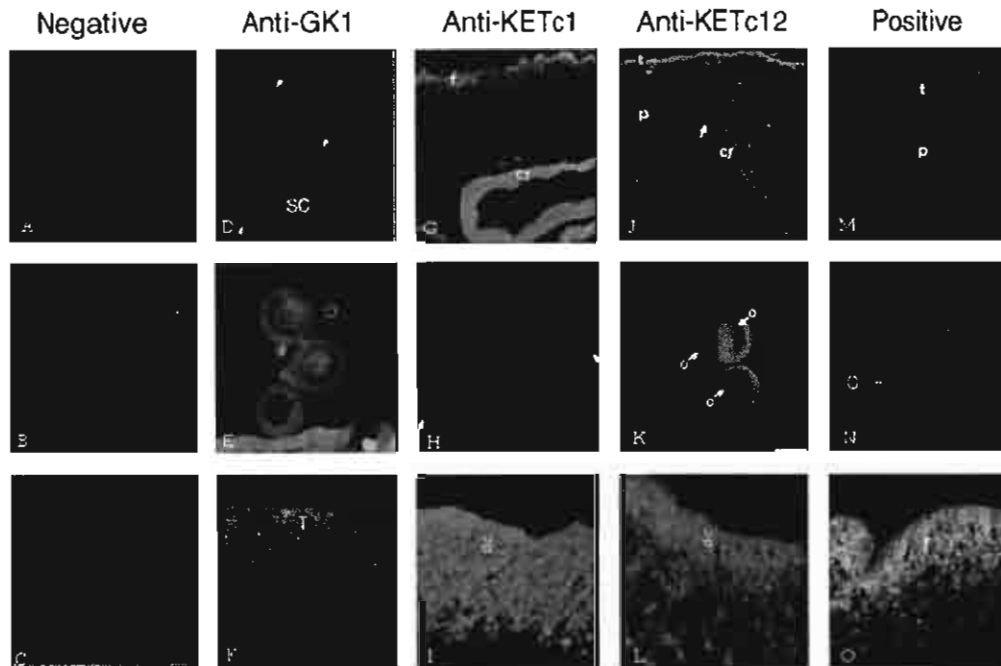


Fig. 1. Immunofluorescent staining of *Taenia crassiceps* (A, C, E, and G) and *Taenia solium* (B, D, F, and H) cysticerci. Sections of 6 mm were processed and incubated with pooled sera from non-infected mice (A and B), *T. crassiceps*-infected mice (C and D), KETc1-immunized (E and F) and KETc12-immunized (G and H) and GK1-immunized (I and J) mice. The tegument (t) and the parenchyma (p) are evident in both cysticerci (C and D). In *T. crassiceps* cysticerci (E), KETc1 antigen shows a protruding and intensely positive signal in the tegument, while in *T. solium* cysticerci (F) it is clearly evident in the cuticular folds of the spiral canal (cf) and also in the tegument (t). KETc12 is quite abundant in both metacystodes; it is evident in the tegument and in the parenchyma of *T. crassiceps* (G) as well as in the tegument, parenchyma, and flame cells (arrows) of *T. solium* (H). GK-1 is intensely expressed in the tegument (T) of *T. crassiceps* cysticerci (I) and strongly expressed in the cuticular folds of the spiral canal (SC) and flame cells (arrows). Bar, 40  $\mu$ m.

foods and proper feeding schedules. Furthermore, experimental protocols on pigs generally use a single infection challenge with limited numbers of eggs, all produced by a single tapeworm, and the infection is studied at a single time after infection. The real conditions in the field differ in all the above mentioned variables, with significant impact on the probability of infection, on its intensity and on the likelihood of the host developing a competent immune reaction. In the rural areas of Mexico, and perhaps in other endemic countries, rustic pigs are genetically vastly heterogeneous besides being malnourished, stressed and exposed to various other diseases. During their usual 1 year long perilous existence, rural pigs are exposed to *T. solium* egg ingestion on multiple occasions and in diverse amounts, probably produced by different tapeworm specimens. Thus, a field trial implies a number of circumstances which are impossible to reproduce experimentally. These complex and interactive circumstances can affect the host's immunity that underlies vaccine effectiveness. Surely, field trials of a vaccine against porcine cysticercosis are extremely difficult, dangerous, time consuming, logistically complicated and costly. They require of a team of workers endowed with various abilities, includ-

ing the hunting, seizing, restraining and injecting of fiercely defensive animals, and develop specialized social skills to communicate with local inhabitants of a different culture. Not the least of the field trials' difficulties is to rescue enough valid data from a process which, once on its way, meets with so many varied and uncontrollable events. Especially those related with the disappearance of many of the included pigs, victims of their predators, of other diseases and of the owners' sudden needs of food or money. Nonetheless, field trials are the closest approximation to a veritable assessment of a vaccine's potential effect in preventing naturally acquired porcine cysticercosis in endemic areas.

S3Pvac was evaluated in the field against naturally acquired *T. solium* porcine cysticercosis. Two different trials were performed in two rural communities in Mexico.

The first trial was carried out in Tepetzintla, Puebla [14,64]. Pigs of mixed genetic breeds were reared in the communities. Pigs were immunized twice with S3Pvac using saponin as an adjuvant whilst controls received only saponin. A total of 278 piglets were distributed in pairs (one immunized pig/one control pig) among households of the community with the understanding that the pigs

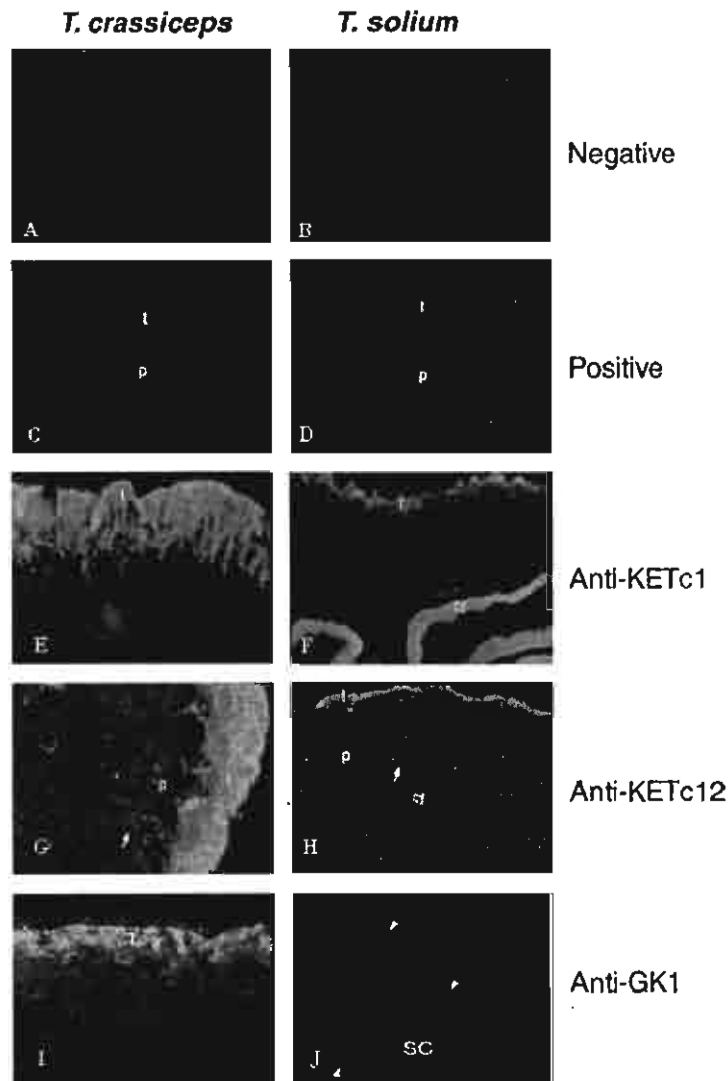


Fig. 2. Immunofluorescence staining of the *T. solium* cysticerci (A, D, G, J, and M), oncosphere (B, E, H, K, and N) and proglottid tegument (C, F, I, L, and O). Sections of 6 mm were processed and incubated with pooled sera from non-infected mice (A, B, and C), *T. crassiceps*-infected mice (M, N, and O), GK1-immunized (D, E, and F) and KETc1-immunized (G, H, and I) and KETc12-immunized (J, K, and L) mice. In cysticerci, all peptides are present in the spiral canal (CF and sc). KETc1 and KETc12 are in tegument (t) but only KETc12 is in parenchyma (p). OK1 is the most abundant peptide expressed in the oncospheres (o), and KETc1 and KETc12 are lightly presented. Also, the three peptides are present in the distal cytoplasm region (dc) of the tegument of adult tissue. Bar, 40 mm.

would be reared following traditional community methods. Thirty-eight pigs were lost before sacrifice because of different uncontrollable causes (malnutrition, infectious diseases, snake bites, scorpion stings, necessary sale, prey of predators, village festivities). The remaining 240 pigs were sacrificed at 10–12 months of age and thoroughly dissected in search of cysticerci. The number of cysticerci found in each half car-

cass was quantified and parasites were classified as vesicular or calcified according to their macroscopic and microscopic aspect. As shown in Table 3, the vaccine reduced the number of infected pigs by 50% and lowered parasite intensity from 66,563 to 1369 (98%), especially because there were no pigs heavily infected. Reducing the number of cysticerci is extremely important since each cysticercus is potentially

**Table 3**  
Protective capacity of the S3Pvac in the two different field trials performed in Mexico

Communities (state)	Number of pigs	Level of protection (%)		Reference
		Pigs totally protected	Reduction in parasite load	
Huautlaucua, Tepezezinla, Puebla	240	50 <sup>a</sup>	97 (66565/1364) <sup>*</sup>	[14]
Cuentepec, Morelos	166	70 <sup>b</sup>	100 (29/0) <sup>**</sup>	[44]

<sup>\*</sup>Total number of cysticerci recovered in 120 controls and 120 vaccinated pigs. <sup>\*\*</sup>and in the tongue, masseters and diaphragm of 20 controls (2 pigs infected) and 20 vaccinated pigs.

<sup>a</sup> Percent of pigs totally free of cysticerci by necropsy.

<sup>b</sup> Percent of non-cysticercotic pigs by tongue inspection

capable of reaching the tapeworm stage. It is also interesting that S3Pvac damaged over 80% of the cysticerci established in the immunized pigs [14].

In the second trial the protective effect of S3Pvac was assessed by tongue inspection in 166 pigs. Only 40 pigs included in the study underwent inspection by necropsy (Table 3). This trial was a 5-month S3Pvac vaccination program which included 80% of new-born piglets in the rural community of Cuentepec, Morelos. Cysticercosis was found in the tongues of 4% and 3% of the one- and two-dose groups, respectively, both significantly lower than the 14% found in sentinel pigs before the trial, and not quite significantly different from the 10% (2/20) found in the very few surviving saponin controls [44]. These results support the protective effect of the S3Pvac vaccine observed in the first trial [14], overriding the differences between the villages of two different geographic areas.

Further support for S3Pvac was provided by Wu et al. [49] who inserted the KETc1 and KETc12 epitopes into the immunodominant loop of the truncated HBc149, and GK-1 epitope in its C-terminus. As shown in Table 2 a high level of protection (83%) against experimental pig cysticercosis was obtained by DNA immunization using this fused protein deltaC-3n expressed in pVAX3.0 with the signal peptide of IL-2 [49]. Considering that this study was performed using *T. solium* eggs from a different continent, the high protective response induced by vaccination indicates that S3Pvac could be helpful in spite of possible significant genetic differences between cysticerci from different continents [65,66].

As it is shown in Table 4, S3Pvac has also exhibited therapeutic properties [67], as reported for total antigens [39]. Clear evidence of the cysticidal effect of S3Pvac but not of GK1 alone has been recently published [67]. S3Pvac injection

in 30-day experimentally infected pigs reduced the number of vesicular cysticerci in muscles and increased the number of damaged and necrotic cysticerci [67]. The therapeutic properties of S3Pvac add to its interest as a powerful tool that significantly interferes with the development of cysticercosis in its porcine host.

#### 4. Reducing costs of production of the S3Pvac anti-cysticercosis vaccine

Once the protective capacity of an immunogen has been evaluated in natural conditions of transmission, the costs of its production should be considered, especially when aiming to apply it amongst the poorest sectors of developing countries [68].

To reduce the cost of the S3Pvac, a new inexpensive recombinant version of S3Pvac expressed in filamentous phages was developed (PhageCistiVac) [46]. Filamentous phages are a suitable delivery system for inexpensive massive production of the vaccine, which hence do not require additional adjuvant for immunization. The DNA that codes for GK1, KETc12 and KETc7 was inserted into a phagemid vector to express the peptides as N-terminal fusions in M13 bacteriophage major coat protein (CPVIII), which is expressed in high copy number on the phage's surface. KETc1 was displayed on phage minor coat protein pIII. The pool of the four recombinant heat-inactivated phages induced high levels of protection against experimental murine and pig cysticercosis [46]. Important progress has been made in field evaluation of PhageCistiVac in natural transmission conditions of pig cysticercosis: preliminary results indicate that it is as efficient as S3Pvac [69]. Altogether, these results

**Table 4**  
Therapeutic effect of the S3Pvac against experimental *T. solium* cysticercosis

Status of the infected pigs	Calculated cysticerci (%)	Evagination <sup>a</sup> (%)	Tapeworms transformation <sup>b</sup> (%)
Saponine	6.41 (59/1039)	70	58
S3Pvac + saponine	61.1 (344/563)	38	19

Five piglets per group were orally infected with 20,000 of *T. solium* eggs and 1 month later treated with saponine (control) or S3Pvac, three times each at a 30-day interval. Four months after the last immunization, animals were euthanized and the total number of cysticerci found in half of the carcass, plus heart, diaphragm and brain and their macroscopical aspect were recorded.

<sup>a</sup> In vitro evagination capacity from a total of 269 (controls) and 50 (S3Pvac) cysticerci sampled.

<sup>b</sup> In vivo transformation of cysticerci to tapeworms in immunodepressed hamsters orally infected with 5 cysticerci each to a total of 20 (control pigs) and 10 (S3Pvac) hamsters [67].

endorse PhageCistiVac as a cost-effective vaccine to be used in developing countries where cysticercosis is endemic (unit cost of production of a single dose of vaccine is US\$ 0.25). This recombinant vaccine will be produced by the Biomedical Research Institute (Instituto de Investigaciones Biomédicas) of the National Autonomous University of Mexico (Universidad Nacional Autónoma de México) and will be made available at no cost for initial applications in regional control programs in Mexico.

### 5. Improving the feasibility of S3Pvac wide and sustained application

Scientific evidence points to vaccination as a potentially useful tool for cysticercosis prevention, and S3Pvac-based PhageCistiVac seems ready for regional application in the field. However, both vaccines – S3Pvac and PhageCistiVac – are administered by injection. This is a paramount limitation for their application on a nationwide and sustained control program. The costs and likelihood of once per year gathering and activating a number of task-forces to vaccinate the 6 millions of rustic pigs distributed throughout Mexico in thousands of small and recondite villages is inconceivable. It would be more feasible if owners could vaccinate their own pigs. The easiest way to implement such regime would be to develop an inexpensive orally administered vaccine, which the owners could mix with the pigs' food.

#### 5.1. Expressing the peptides on *Brucella* spp. lumazine synthase: a novel adjuvant and antigen delivery system that effectively induces oral immunity

The possibility of oral administration of the anti-cysticercosis vaccine was explored using a potentially appropriate delivery system of the S3Pvac peptides, as is the case of the polymeric protein *Brucella lumazine synthase* (BLS) [70]. BLS is an immunodominant *Brucella* antigen, able to generate strong humoral as well as cellular immunity against *Brucella abortus* in mice [71]. In this highly immunogenic protein that folds as a stable dimer of pentamers [72], foreign peptides and proteins may be inserted at the 10 N-terminus of BLS without disrupting its general folding [72]. The enzyme lumazine synthase from *Brucella* spp. (BLS) was evaluated as protein carrier to improve antigen delivery of KETc1. KETc1 recombinantly bound to BLS (BLS-KETc1) preserved its immunogenicity and protective capacity when injected subcutaneously with no need of adjuvant [73]. Moreover, the orally administered chimera BLS-KETc1 induced up to 98% of protection against murine cysticercosis [74]. These are promising results that increase the possibility of designing a multivalent vaccine in only one chimerical protein that displays S3Pvac epitopes simultaneously on BLS. Experiments are underway to explore this possibility as well as the effectiveness of the BLS-KETc1 oral vaccine against *T. solium* under experimental and field conditions.

#### 5.2. Expressing the peptides on transgenic papaya embryogenic callus: a new antigen delivery system

The anti-cysticercosis peptides (KETc7, KETc1.6His and KET12.6His) were successfully expressed in transgenic embryogenic papaya clones, a novel biotechnological approach that offers a new alternative for inexpensive production and oral delivery. The vaccine peptides were expressed from transgenes stably incorporated into a host plant's nuclear genome, via particle bombardment. Several immunogenic and protective clones were identified using the murine experimental model of cysticercosis. Complete protection was induced by subcutaneous immunization with some of the embryogenic papaya clones in up to 90% of the immunized mice, higher than that expected using the respective synthetic peptides. These results point to the potential usefulness of this new version of the anti-cysticercosis vaccine. The expressed antigen can be administered without the need of additional purification and is appropriate for capsule formulation, which could be easily mixed with the pigs' food pellets for oral delivery [44].

### 6. The mechanisms of S3Pvac protection

It is largely assumed that the mechanisms of protection elicited by pig vaccination against *T. solium* are those of acquired immunity and of the inflammatory process. The few existing results in porcine cysticercosis show that both major mechanisms are probably involved in the protective response provoked by vaccination. S3Pvac vaccinated pigs do indeed make antibodies that react with the peptides of the vaccine and with the parasite's protein antigens [30]. Likewise, the vaccinated pigs' peripheral mononuclear cells show specific increased cellular proliferation and elevated production of inflammatory cytokines (IL-2 and IFN $\gamma$ ) [30]. There are also signs that the vaccine peptides exhibit adjuvant properties probably involving inflammatory mediation [75]. When the vaccine peptides are expressed in filamentous phages (PhageCistiVac), the immunized pigs respond with a mixed Th1/Th2 immune response and their PBMCs exhibit a peptide/antigen-specific proliferative response in vitro, along with IFN $\gamma$  and IL-4 production [46].

The precise molecular or cellular mechanisms by which the immune response injures the parasite are not clear yet. There is a general and longstanding consensus that the early stages of metacystode and onchosphere development of various taeniid species are the most vulnerable to polyclonal antibody attack (presumably with the aid of complement), whilst fully developed metacystodes are either not damaged by these antibodies [76] or evade their harmful effects by a number of mechanisms [77]. More recent research in experimental pig cysticercosis has shown the liability of early cysticerci that develop after challenge of pigs with eggs [67]. Most developing cysticerci are found dead after 12 months of infection [78] and their destruction rate holds a positive

correlation with antibody levels and with the appearance of eosinophils surrounding the parasite, followed by other inflammatory cells [79]. It thus seems that killing of the parasite involves immune and inflammatory processes. Moreover, it has also been found that antibodies do not have to necessarily kill the cysticerci to play a significant role in cysticercosis biology: preincubation of *T. solium* cysticerci with mouse or pig anti-GK1 antibodies cripples their capacity to transform into intestinal tapeworms when placed in the intestines of hamsters [29,30].

Along their development in the intermediary host cysticerci may express epitopes with which specific antibodies may react and interfere with their proper physiological function, thus limiting their transmission dynamics by blocking their way into adult egg-producing tapeworms [29]. This antibody-mediated restriction of the tapeworm stage development may add to the understanding of why there are so many cysticerci and such few tapeworms in endemic areas [80].

## 7. Concluding remarks

The anti-cysticercosis vaccines based on the peptides KETc7, GK1, KETc1 and KETc12 are ready for wide and sustained application because they have met with the following requirements: (a) the peptides are present in all developmental stages of *T. solium*; (b) all versions induce effective protection in experimental conditions; (c) S3Pvac and PhageCisúVac protect rustic pigs against natural infection in highly endemic areas; (d) PhageCisúVac's cost of production is low (US\$ 0.25 per dose/pig); (e) the cost and logistic difficulties involved in nationwide vaccine administration may be significantly lowered by oral administration of BLS-KETc1, which has been shown to induce protection in mice; (f) the successful expression of the vaccine's peptides by transgenic embryogenic papaya clones and their efficacy in inducing protection in mice connects these vaccines with the high expectations of novel biotechnological solutions to vaccine production and delivery.

## Acknowledgments

The authors thank Gerardo Arrellán, Georgina Díaz Herrera and Mercedes Baca for technical support and Isabel Pérez Montfort for English edition. This investigation was partially supported by the International Center for Genetic Engineering and Biotechnology, the Howard Hughes Medical Institute (55004134), CONACYT 2004-01-040, 46953-M, PROMEP-UAEMOR-PTC-87 (103.5/03/2530) and Dirección General de Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México (IN-221905).

## References

- [1] Ada G. Overview of vaccines and vaccination. *Mol Biotechnol* 2005;29:255–72.
- [2] Kueny MP, Girard MP. Human vaccine research and development: an overview. *Vaccine* 2005;23:5705–7.
- [3] Ferreira CT, da Silveira TR. Viral hepatitis prevention by immunization. *J Pediatr (Rio J)* 2006;82(3 Suppl):555–66.
- [4] Tongren JE, Zavala F, Roos DS, Riley EM. Malaria vaccines: if at first you don't succeed. *Trends Parasitol* 2004;20:604–10.
- [5] Graves P, Golband H. Vaccines for preventing malaria (SP166). *Cochrane Database Syst Rev* 2006;19. CD005966.
- [6] Tarleton RL. New approaches in vaccine development for parasitic infections. *Cell Microbiol* 2005;7:1379–86.
- [7] Rickard MD, White JB. Vaccination of lambs against infection with *Taenia ovis*. *Aust Vet J* 1976;52:209–14.
- [8] Johnson KS, Harrison GB, Lightowers MW, O'Hoy KL, Cougle WG, Dempster RP, et al. Vaccination against ovine cysticercosis using a defined recombinant antigen. *Nature* 1989;338:585–7.
- [9] Lightowers MW, Rolle R, Gauci CG. *Taenia saginata*: vaccination against cysticercosis in cattle with recombinant oncosphere antigens. *Exp Parasitol* 1996;84:330–8.
- [10] Harrison LJ, Garate T, Bryce DM, Gonzalez LM, Foster-Cuevas M, Wamac LW, et al. Ag-ELISA and PCR for monitoring the vaccination of cattle against *Taenia saginata* cysticercosis using an oncospherical adhesion protein (HP6) with surface and secreted localization. *Trop Anim Health Prod* 2005;37:103–20.
- [11] Molinari JL, Meza R, Suarez B, Palacios S, Tibo P, Retana A. *Taenia solium*: immunity in hogs to the *Cysticercus*. *Exp Parasitol* 1983;55:340–57.
- [12] Sciutto E, Aluja A, Fragoso G, Rodarte LF, Hernandez M, Villalobos MN, et al. Immunization of pigs against *Taenia solium* cysticercosis: factors related to effective protection. *Vet Parasitol* 1995;60:53–67.
- [13] Plancarte A, Flisser A, Gauci CG, Lightowers MW. Vaccination against *Taenia solium* cysticercosis in pigs using native and recombinant oncosphere antigens. *Int J Parasitol* 1999;29:643–7.
- [14] Huerta M, de Aluja AS, Fragoso G, Toledo A, Villalobos N, Hernandez M, et al. Synthetic peptide vaccine against *Taenia solium* pig cysticercosis: successful vaccination in a controlled field trial in rural Mexico. *Vaccine* 2001;20:262–6.
- [15] Flisser A, Gauci CG, Zohi A, Martínez-Ocana J, Garza-Rodríguez A, Domínguez-Alpizar JL, et al. Induction of protection against porcine cysticercosis by vaccination with recombinant oncosphere antigens. *Infect Immun* 2004;72:5292–7.
- [16] Lightowers MW, Lawrence SB, Gauci CG, Young J, Raistoo MJ, Maas D, et al. Vaccination against hydatidosis using a defined recombinant antigen. *Parasite Immunol* 1996;18:457–62.
- [17] Müller-Schollenberger V, Beyer W, Schnitzler P, Merckelbach A, Roth S, Kalinna BH, et al. Immunization with *Sabnonella typhimurium*-delivered proglottids des-3-phosphate dehydrogenase protects mice against challenge infection with *Echinococcus multilocularis* eggs. *Int J Parasitol* 2001;31:1441–9.
- [18] Siles-Lucas M, Meril M, Mackenstedt U, Gottstein B. The *Echinococcus multilocularis* 14-3-3 protein protects mice against primary but not secondary alveolar echinococcosis. *Vaccine* 2003;21:431–9.
- [19] Sciutto E, Fragoso G, Trueba L, Lemus D, Montoya RM, Díaz ML, et al. Cysticercosis vaccine: cross protecting immunity with *T. solium* antigens against experimental murine *T. crassiceps* cysticercosis. *Parasite Immunol* 1990;12:687–96.
- [20] Manouchehian K, Rosas G, Hernandez M, Fragoso G, Aluja A, Villalobos N, et al. Cysticercosis: identification and cloning of protective recombinant antigens. *J Parasitol* 1996;82:250–4.
- [21] Toledo A, Larralde C, Fragoso G, Gevorkian G, Manouchehian K, Hernandez M, et al. Towards a *Taenia solium* cysticercosis vaccine: an epitope shared by *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* protects mice against experimental cysticercosis. *Infect Immun* 1999;67:2522–30.
- [22] Toledo A, Fragoso G, Rosas G, Hernandez M, Gevorkian G, Lopez-Casillas F, et al. Two epitopes shared by *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* confer protection against murine *T. crassiceps* cysticercosis along with a prominent T1 response. *Infect Immun* 2001;69:1766–73.

- [23] Rosas G, Cruz-Revilla C, Fragoso G, Lopez-Castillas F, Perez A, Bonilla MA, et al. *Taenia crassiceps* cysticercosis: humoral immune response and protection elicited by DNA immunization. *J Parasitol* 1998;84:516–23.
- [24] Rosas G, Fragoso G, Garate T, Hernandez B, Ferrero P, Foster-Cuevas M, et al. Protective immunity against *Taenia crassiceps* murine cysticercosis induced by DNA vaccination with a *Taenia saginata* tegument antigen. *Microbes Infect* 2002;4:1417–26.
- [25] Gabriele F, Ecça AR, Aru AB, Palmes C. Vaccination against the gastrointestinal helminths *Trichinella spiralis* and *Hymenolepis nana*: relationship between routes of immunization and effective protection. *Boll Ist Sieroter Milan* 1985;64:408–13.
- [26] Gonzalez AE, Cama V, Gilman RH, Tsang VC, Pritchard JB, Chavera A, et al. Prevalence and comparison of serologic assays, necropsy, and tongue examination for the diagnosis of porcine cysticercosis in Peru. *Am J Trop Med Hyg* 1990;43:194–9.
- [27] Scuitto E, Martinez JJ, Villalobos NM, Hernandez M, Jose MV, Beltran C, et al. Limitations of current diagnostic procedures for the diagnosis of *Taenia solium* cysticercosis in rural pigs. *Vet Parasitol* 1998;79:299–313.
- [28] Terrazas LI, Cruz M, Rodriguez-Sosa M, Bojalil R, Garcia-Tamayo F, Larralde C. Th1-type cytokines improve resistance to murine cysticercosis caused by *Taenia crassiceps*. *Parasitol Res* 1999;85:135–41.
- [29] Garcia G, Scuitto E, Fragoso G, Cruz-Revilla C, Toledo A, Villalobos N, et al. Inhibitory role of antibodies in the development of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* toward reproductive and pathogenic stages. *J Parasitol* 2001;87:582–6.
- [30] Diaz MA, Villalobos N, de Aluja A, Rosas G, Gomez-Conde E, Hernandez P, et al. Th1 and Th2 indices of the immune response in pigs vaccinated against *Taenia solium* cysticercosis suggested various host immune strategies against the parasite. *Vet Immunol Immunopathol* 2003;93:81–90.
- [31] Rodriguez-Sosa M, Satoskar AR, David JR, Terrazas LI. Altered T helper responses in CD40 and interleukin-12 deficient mice reveal a critical role for Th1 responses in eliminating the helminth parasite *Taenia crassiceps*. *Int J Parasitol* 2003;33:703–11.
- [32] Rodriguez-Sosa M, Saavedra R, Tenorio EP, Rosas LE, Satoskar AR, Terrazas LI. A STAT4-dependent Th1 response is required for resistance to the helminth parasite *Taenia crassiceps*. *Infect Immun* 2004;72:4552–60.
- [33] Gomez-Garcia L, Lopez-Marin LM, Saavedra R, Reyes JL, Rodriguez-Sosa M, Terrazas LI. Intact glycans from cestode antigens are involved in innate activation of myeloid suppressor cells. *Parasite Immunol* 2005;27:395–405.
- [34] Fragoso G, Lamoyi E, Mellor A, Lomeli C, Hernandez M, Scuitto E. Increased resistance to *Taenia crassiceps* murine cysticercosis in Qa-2 transgenic mice. *Infect Immun* 1998;66:760–4.
- [35] Scuitto E, Martinez JJ, Huerta M, Avida R, Fragoso G, Villalobos N, et al. Familial clustering of *Taenia solium* cysticercosis in the rural pigs of Mexico: hints of genetic determinants in innate and acquired resistance to infection. *Vet Parasitol* 2003;116:223–9.
- [36] Morales-Montor J, Larralde C. The role of sex steroids in the complex physiology of the host-parasite relationship: the case of the larval cestode of *Taenia crassiceps*. *Parasitology* 2005;131:287–94.
- [37] Molinari JL, Tato P, Lara-Aguilera R, White Jr AC. Effects of serum from neurocysticercosis patients on the structure and viability of *Taenia solium* oncospheres. *J Parasitol* 1993;79:124–7.
- [38] Kyngdon CF, Gauci CG, Rolfe RA, Velasquez Guzman JC, Farfan Salazar MJ, Verastegui Placentel MR, et al. In vitro oncosphere-killing assays to determine immunity to the larvae of *Taenia plisiformis*, *Taenia ovis*, *Taenia saginata*, and *Taenia solium*. *J Parasitol* 2006;92:273–81.
- [39] Molinari JL, Soto R, Tato P, Rodriguez D, Retana A, Sepulveda J, et al. Immunization against porcine cysticercosis in an endemic area in Mexico: a field and laboratory study. *Am J Trop Med Hyg* 1993;49:502–12.
- [40] Molinari JL, Rodriguez D, Tato P, Soto R, Arechavaleta F, Solano S. Field trial for reducing porcine *Taenia solium* cysticercosis in Mexico by systematic vaccination of pigs. *Vet Parasitol* 1997;69:55–63.
- [41] Nascimento E, Costa JO, Guimaraes MP, Tavares CA. Effective immune protection of pigs against cysticercosis. *Vet Immunol Immunopathol* 1995;45:127–37.
- [42] Pathak KM, Gaur SN. Immunization of pigs with culture antigens of *Taenia solium*. *Vet Parasitol* 1990;34:353–6.
- [43] Fan PC, Chung WC, Lin CY, Wu CC. Vaccination trials against *Taenia solium* eggs in pigs injected with frozen oncospheres of *T. solium* or *Taenia saginata asiatica*. *J Microbiol Immunol Infect* 2003;36:96–100.
- [44] Scuitto E, Morales J, Martinez JJ, Toledo A, Villalobos NM, Cruz-Revilla C, et al. Further evaluation of the synthetic peptide vaccine S3Pvac against *Taenia solium* cysticercosis in pigs in an endemic town of Mexico. *Parasitology* 2006;1–5.
- [45] Gonzalez AE, Gauci CG, Barber D, Gilman RH, Tsang VC, Garcia HH, et al. Vaccination of pigs to control human neurocysticercosis. *Am J Trop Med Hyg* 2005;72:837–9.
- [46] Manoutcharian K, Diaz-Orea A, Gevorkian G, Fragoso G, Acero C, Gonzalez E, et al. Recombinant bacteriophage-based multiepitope vaccine against *Taenia solium* pig cysticercosis. *Vet Immunol Immunopathol* 2004;99:11–24.
- [47] Cai X, Chau Z, Jing Z, Wang P, Luo X, Chen J, et al. Studies on the development of DNA vaccine against *Cysticercus cellulosae* infection and its efficacy. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2001;32(2 Suppl):105–10.
- [48] Wang QM, Sun SF, Hu ZL, Wu D, Wang ZC. Immune response and protection elicited by DNA immunization against *Taenia* cysticercosis. *Vaccine* 2003;21:1672–80.
- [49] Wu L, Diao Z, Deng X, Gao J, Zhou Z, Liu Y, et al. DNA vaccine against *Taenia solium* cysticercosis expressed as a modified hepatitis B virus core particle containing three epitopes shared by *Taenia crassiceps* and *Taenia solium*. *J Nanosci Nanotechnol* 2005;5:1204–10.
- [50] Guo YJ, Sun SH, Zhang Y, Chen ZH, Wang KY, Huang L, et al. Protection of pigs against *Taenia solium* cysticercosis using recombinant antigen or in combination with DNA vaccine. *Vaccine* 2004;22:3841–7.
- [51] Guo A, Jin Z, Zheng Y, Hai G, Yuan G, Li H, et al. Induction of protection against porcine cysticercosis in growing pigs by DNA vaccination. *Vaccine* 2007;25:170–5.
- [52] Larralde C, Montoya RM, Scuitto E, Diaz ML, Govezensky T, Coltorti E. 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* 1989;40:282–90.
- [53] Miller HM. Acquired immunity against a metazoan parasite by use of non-specific worm material. *Proc Soc Exp Biol* 1932;29:1125–6.
- [54] Gemmell MA. Immunological responses of the mammalian host against tapeworm infections. XI. Antigen sharing among *Taenia pisiformis*, *T. hydatigena*, and *T. ovis*. *Exp Parasitol* 1969;26:67–72.
- [55] Gottstein B, Tsang VC, Schantz PM. Demonstration of species-specific and cross-reactive components of *Taenia solium* metacestode antigens. *Am J Trop Med Hyg* 1986;35:308–13.
- [56] Harrison LJ, Parkhouse RM. *Taenia saginata* and *Taenia solium*: reciprocal models. *Acta Leidica* 1989;57:143–52.
- [57] Morales J, Martinez JJ, Garcia-Castella J, Peña N, Mazza V, Villalobos N, et al. *Taenia solium*: the complex interactions, of biological, social, geographical and commercial factors, involved in the transmission dynamics of pig cysticercosis in highly endemic areas. *Ann Trop Med Parasitol* 2006;100:123–35.
- [58] Solis CF, Ostoa-Saloma P, Lugo-Martinez VH, Johnston SA, Lacleite JP. Genetic vaccination against murine cysticercosis by using a plasmid vector carrying *Taenia solium* paramyosin. *Infect Immun* 2005;73:1895–7.
- [59] Vazquez-Talavera J, Solis CF, Terrazas LI, Lacleite JP. Characterization and protective potential of the immune response to *Taenia solium* paramyosin in a murine model of cysticercosis. *Infect Immun* 2001;69:5412–6.



- [60] Cruz-Revilla C, Rosas G, Fragoso G, Lopez-Casillas F, Toledo A, Larralde C, et al. *Taenia crassiceps* cysticercosis: protective effect and immune response elicited by DNA immunization. *J Parasitol* 2000;86:67–74.
- [61] Cruz-Revilla C, Snnabend AM, Rosas G, Toledo A, Meneses G, Lopez-Casillas F, et al. Intrahepatic DNA vaccination: unexpected increased resistance against murine cysticercosis induced by non-specific enhanced immunity. *J Parasitol* 2006;92:655–7.
- [62] Gevorkian O, Manoutcharian K, Larralde C, Hernandez M, Almagro JC, Viveros M, et al. Immunodominant synthetic peptides of *Taenia crassiceps* in murine and human cysticercosis. *Immunol Lett* 1996;49:185–9.
- [63] Cruz-Revilla C, Toledo G, Rosas A, Huerta M, Flores-Perez I, Peña N, et al. Effective protection against experimental *Taenia solium* tapeworm infection in hamsters by primo-infection and by vaccination with recombinant or synthetic heterologous antigens. *J Parasitol* 2006;92:864–7.
- [64] Sciutto E, Martínez JJ, Huerta M, Ávila R, Fragoso G, Villalobos N, et al. Familial clustering of *Taenia solium* cysticercosis in the rural pigs of Mexico: hints of genetic determinants in innate and acquired resistance to infection. *Vet Parasitol* 2003;116:223–9.
- [65] Vega R, Pínero D, Ramanankandrasana B, Dumas M, Bouteille B, Fleury A, et al. Population genetic structure of *Taenia solium* from Madagascar and Mexico: implications for clinical profile diversity and immunological technology. *Int J Parasitol* 2003;33:1479–85.
- [66] Maravilla P, Souza V, Valera A, Romero-Valdovinos M, Lopez-Visal Y, Domínguez-Alpizar, et al. Detection of genetic variation in *Taenia solium*. *J Parasitol* 2003;89:1250–4.
- [67] de Aluja AS, Villalobos N, Nava G, Toledo A, Martínez JJ, Plancarte A, et al. Therapeutic capacity of the synthetic peptide-based vaccine against *Taenia solium* cysticercosis in pigs. *Vaccine* 2005;23:4062–9.
- [68] Hotez PJ, Ferris MT. The antipoverty vaccines. *Vaccine* 2006;24:5787–99.
- [69] Sciutto E, Morales J, Rosas G, Fragoso G, Hernández M, Cruz C, et al. The multiepitope anticysticercosis vaccine from laboratory to the field: novel delivery systems and alternative routes for vaccine administration. In: Proceedings of the 11th International Congress of Parasitology, ICOPA XI, Medimond International Proceeding, Glasgow, Scotland 2006:581–87.
- [70] Zylberman V, Craig PO, Klinke S, Braden BC, Cauerhft A, Goldbaum FA. High order quaternary arrangement confers increased structural stability to *Brucella* sp. lumazine synthase. *J Biol Chem* 2004;279:8093–101.
- [71] Velikovskiy CA, Goldbaum FA, Cassataro J, Estlin S, Bowden RA, Bruno L, et al. *Brucella* lumazine synthase elicits a mixed Th1–Th2 immune response and reduces infection in mice challenged with *Brucella abortus* 544 independently of the adjuvant formulation used. *Infect Immun* 2003;71:5750–5.
- [72] Laplagne DA, Zylberman V, Ainciart N, Steward MW, Sciutto E, Fossan CA, et al. Engineering of a polymeric bacterial protein as a scaffold for the multiple display of peptides. *Proteins* 2004;57:820–8.
- [73] Sciutto E, Toledo A, Cruz C, Rosas G, Meneses G, Laplagne D, et al. *Brucella* spp. lumazine synthase: a novel antigen delivery system. *Vaccine* 2005;23:2784–90.
- [74] Rosas G, Fragoso G, Ainciart N, Esquivel-Guadarrama F, Santana A, Bobes RJ, et al. *Brucella* spp. lumazine synthase: a novel adjuvant and antigen delivery system to effectively induce oral immunity. *Microb Infect* 2006;8:1277–86.
- [75] Segura-Velazquez R, Perez-Turres A, Rosas G, Toledo A, Restelli M, Acosta E, et al. A novel synthetic adjuvant effectively enhances the immunogenicity of the influenza vaccine. *Vaccine* 2006;24:1073–80.
- [76] Mitchell GF, Oodling JW, Rickard MD. Studies on immune responses to larval cestodes in mice. Increased susceptibility of certain mouse strains and hypothyroid mice to *Taenia taeniaeformis* and analysis of passive transfer of resistance with serum. *Aust J Exp Biol Med Sci* 1977;55:165–86.
- [77] Baig S, Damián RT, Morales-Montor J, Olecki P, Talhouk J, Hashmey R, et al. Characterization of excretory/secretory endopeptidase and metallo-aminopeptidases from *Taenia crassiceps* metacystodes. *J Parasitol* 2005;91:983–7.
- [78] de Aluja AS, Villalobos AN, Plancarte A, Rodarte LF, Hernández M, Sciutto E. Experimental *Taenia solium* cysticercosis in pigs: characteristics of the infection and antibody response. *Vet Parasitol* 1996;61:49–59.
- [79] de Aluja A, Vargas G. The histopathology of porcine cysticercosis. *Vet Parasitol* 1988;28:65–77.
- [80] Flisser A. Where are the tapeworms? *Parasitol Int* 2006;55:117–20.

- ❖ Sciutto, E., Morales, J., Martínez, J. J., Toledo, A., Villalobos, M. N., Cruz-Revilla, C., Meneses, G., **Hernández, M.**, Díaz, A., Rodarte, L. F., Acero, G., Gevorkian, G., Manoutcharian, K., Paniagua, J., Fragoso, G., Fleury, A., Larralde, R., De Aluja, A. S., Larralde, C. 2007. Further evaluation of the synthetic peptide vaccine S3Pvac against *Taenia solium* cysticercosis in pigs in an endemic town of Mexico. *Parasitology*. 134:129-133.



## Further evaluation of the synthetic peptide vaccine S3Pvac against *Taenia solium* cysticercosis in pigs in an endemic town of Mexico

E. SCIUTTO<sup>1\*</sup>, J. MORALES<sup>2</sup>, J. J. MARTÍNEZ<sup>3</sup>, A. TOLEDO<sup>1</sup>, M. N. VILLALOBOS<sup>4</sup>, C. CRUZ-REVILLA<sup>1</sup>, G. MENESES<sup>1</sup>, M. HERNÁNDEZ<sup>1</sup>, A. DÍAZ<sup>5</sup>, L. F. RODARTE<sup>2</sup>, G. ACERO<sup>1</sup>, G. GEVORKIAN<sup>1</sup>, K. MANOUTCHARIAN<sup>1</sup>, J. PANIAGUA<sup>4</sup>, G. FRAGOSO<sup>1</sup>, A. FLEURY<sup>2</sup>, R. LARRALDE<sup>1</sup>, A. S. DE ALUJA<sup>2</sup> and C. LARRALDE<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, AP 70228, Ciudad Universitaria, 04510 México, D.F., México

<sup>2</sup> Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito de la Investigación Científica, Ciudad Universitaria, 04510 México, D.F., México

<sup>3</sup> Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, Insurgentes Sur 3877, Col. Las Fomas, 14269 México, D.F., México

<sup>4</sup> Laboratorios Silanes, Amares # 130-4, Col. Del Valle, México, D.F., México

<sup>5</sup> Centro de Investigación Biomédica de Oriente, Instituto Mexicano del Seguro Social, Puebla, México

(Received 14 June 2006; accepted 4 July 2006; first published online 4 September 2006)

### SUMMARY

*Taenia solium* cysticercosis is a parasitic disease frequently affecting human health and the pig industry in many developing countries. A synthetic peptide vaccine (designated S3Pvac) against porcine cysticercosis has been developed previously as an aid to interrupt transmission and has been shown to be effective. The results of the present study support the effectiveness of the vaccine under endemic field conditions. However, given the time-frame of the vaccination trial, no changes in the local levels of transmission were detectable before and after vaccination using sentinel pigs. Thus, this investigation shows the limited usefulness of single vaccination as the sole means of interrupting *Taenia solium* transmission in an endemic region.

Key words: *Taenia solium*, cysticercosis, control, vaccination, field evaluation.

### INTRODUCTION

*Taenia solium* taeniasis/cysticercosis is a major parasitic disease of humans and/or pigs which seriously affects human health and the economy in developing countries in Latin America, Asia and Africa (Sciutto *et al.* 2000; Carabin *et al.* 2006). As it is progressively being recognized as a key disease (Boa *et al.* 2003; Phiri *et al.* 2003), the development of more effective control measures against cysticercosis is needed. As an adjunct to other measures, the vaccination of pigs against cysticercosis promises to be a useful preventative and control tool, because of the role that pigs play in the life-cycle of *T. solium* and the life-styles of rural people in endemic regions (Sciutto *et al.* 2000). Vaccination of the porcine (intermediate) host could reduce or eliminate the transmission to humans (definitive and accidental

intermediate host), thus decreasing the environmental contamination with *T. solium* eggs and diminishing the impact of transmission and disease, particularly neurocysticercosis in humans (Huerta *et al.* 2001; González *et al.* 2005).

Various whole or subunit vaccine candidates with promising protective effects against porcine cysticercosis have been reported, but their effectiveness has been assessed mostly experimentally rather than under complex field conditions (Nascimento *et al.* 1995; Molinari *et al.* 1997; Plancarte *et al.* 1999; Cai *et al.* 2001; Wang *et al.* 2003; Flisser *et al.* 2004; Manoutcharian *et al.* 2004; Gonzalez *et al.* 2005). Such a vaccine requires testing in local breeds of pigs, reared under extensive (free-range) conditions, being exposed to famine, stress and various diseases other than cysticercosis. Recently, a vaccine to protect against porcine cysticercosis, based on 3 synthetic-peptides (designated S3Pvac) present in all stages of development of *T. solium*, was developed and shown to be effective in mice against *Taenia crassiceps* (see Toledo *et al.* 1999, 2001) and in pigs against *T. solium* (see Manoutcharian *et al.* 1996; Huerta *et al.* 2001). Its protective capacity (50% reduction in prevalence levels and 98% reduction of intensity of infection)

\* Corresponding author: Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, A.P. 70228, Ciudad Universitaria, 04510 México, D.F., México. Tel: +5255 5622 3153. Fax: +5255 5622 3369. E-mail: esclla@servidor.unam.mx

Table 1. Percentage of free-range pigs with cysticercosis included in the vaccination trial in the town of Cuentepec in Mexico

(Prior to the vaccination trial, sentinel pigs (Group S1) were randomly selected and examined for cysticerci (cysts). The vaccination trial included pigs which were administered the adjuvant saponin (Group V0), and pigs which were injected once (Group V1) or twice (Group V2) with S3Pvac in saponin and then examined for cysts 4–8 months later. Two additional examinations for cysts in sentinel pigs were performed 8 (Group S2) and 22 (Group S3) months after the termination of the vaccination trial.)

Group of pigs	Group description	Date of inspection for cysticerci by tongue examination	No. of pigs with cysticerci/total no. of pigs examined (% with cysticercosis)
S1	Sentinel; prior to vaccination	April–May 2001	4/29 (13.8) 8/29 (27.6)*
V0	Saponin	June–October 2001	2/20 (10.0)
V1	S3Pvac (1 dose) + Saponin	June–October 2001	2/48 (4.2)
V2	S3Pvac (2 doses) + Saponin	June–October 2001	3/98 (3.1)
S2	Sentinel; after vaccination	July 2002	24/200 (12.0)
S3	Sentinel; after vaccination	September 2003	8/50 (16.0)

\* Also examined for cysts by necropsy.

was demonstrated against naturally-acquired cysticercosis in piglets free-ranging in Tepetzitintla, Puebla, Mexico (Huerta *et al.* 2001).

To be broadly applicable, a vaccine against cysticercosis should also be effective under a variety of conditions in which the disease occurs naturally and under different transmission/infection pressures. For this reason, the vaccine S3Pvac was assessed in Cuentepec (Morelos), a densely populated rural town in Mexico with a high prevalence of porcine cysticercosis (Morales *et al.* 2002). This town differs significantly in socio-economic, cultural and climatic characteristics from Tepetzitintla (*cf.* Morales, 2003) in which this vaccine was tested previously (Huerta *et al.* 2001).

#### MATERIALS AND METHODS

##### The synthetic peptide vaccine, S3Pvac

The S3Pvac vaccine consists of the following synthetic peptides: GK1 (amino acids [aa]; (GYYY-PSDPNTFYAPPYSA); KETc1 (APMSTPSATS-VRG) and KETc12 (GNLLLSCLG). The peptides were prepared commercially (Invitrogen Corporation). Each of these peptides was shown to be 95% pure, based on analysis using high-pressure liquid chromatography employing analytical C18 reverse-phase columns (3.9 × 150 nm; Delta Park, Waters). The aa sequence of each peptide was verified by protein sequencing using a pulsed liquid-phase sequencer (Applied Biosystems). Each dose of vaccine per pig comprised 250 µg of each of the peptides KETc1, KETc12 and GK1 as well as saponin (500 µg). The vaccine was stored at 4 °C.

##### Community selected as the study site

Cuentepec, Tenmixco, in the State of Morelos, México, was selected because the epidemiological

conditions in this town favour the transmission of *T. solium*. In this town, there are (i) a high prevalence of porcine cysticercosis (Morales *et al.* 2002), (ii) defaecation by humans in open latrines, (iii) open-range pig rearing, (iv) extensive domestic slaughtering of pigs and local consumption of uninspected and cysticercotic pork (Morales *et al.* 2002; Morales, 2003; Fleury *et al.* 2006). Also, Cuentepec differs from the site of the previous trial of vaccine S3Pvac (Huerta *et al.* 2001) in that it is less isolated socially, more densely populated and represents a more humid, temperate and fertile rural area (<http://www.clocal.gob.mx/work/templates/enciclo/morelos/Municipios/17018a.htm>).

##### Surveys of cysticercosis in sentinel pigs before and after vaccination

'Sentinel pigs' (7–12 months of age; both sexes) from Cuentepec, living under the same conditions as those included in the vaccination trial, were randomly selected and inspected for cysticercosis before and after the trial. Prior to the vaccination trial (April–May, 2001), 29 sentinel pigs were slaughtered and examined for cysticercosis by tongue inspection and by whole-body necropsy, according to the procedures described elsewhere (Gonzalez *et al.* 1990). After the termination of the vaccination trial in October 2001, 2 other evaluations of cysticercosis in sentinel pigs (Groups S2 and S3) were conducted by tongue inspection (200 pigs in July 2002, and 50 different pigs in September 2003) (see Table 1).

##### Vaccination trial

A total of 476 piglets that had reached approximately 2 months of age in the period between June and October of 2001 were considered for inclusion in the study. Ultimately, 381 piglets (80%) were included;

the other 95 belonged to owners who refused to provide pigs for the trial. Each piglet included was tagged with a microchip, and its sex and its owner's name and address were recorded. Pigs were first injected (subcutaneously at the base of an ear) at 2 months of age. The following groups of control and vaccinated piglets were formed: Group V0, 1 control pig in every 2 litters received saponin alone ( $n=32$ ); Group V1, 1 piglet from each litter received 1 dose of the S3Pvac vaccine at ( $n=95$ ); Group V2, the rest of the piglets ( $n=254$ ) received 2 doses of S3Pvac (the second injection was given 1 month after the first).

#### Diagnosis of cysticercosis in pigs

The diagnosis of porcine cysticercosis was conducted *in vivo* by tongue inspection for subepithelial cysts. This is considered the most practical method available; it achieves a sensitivity of 25–75%, and a specificity of up to 100% (Viljoen, 1937; Gonzalez *et al.* 1990; Sciutto *et al.* 1998). Diagnosis was performed 4–8 months after the termination of the vaccination trial, because, in rural communities, most pigs are consumed or sold at 7–12 months of age. If pigs were found to be cysticercotic, their owners were informed about the diagnostic finding and advised not to consume uncooked pork or sell infected pigs.

#### Questionnaire

Twice during the study, in September 2000 and May 2001, owners were asked to answer a questionnaire designed to 'track' possible changes in factors affecting the prevalence of porcine cysticercosis in the community (e.g., governmentally implemented treatment programmes of humans, or the exchange of healthy for sick pigs) or to its estimation (e.g., biased sale of diseased pigs, slaughter or consumption of cysticercotic or vaccinated pigs).

#### Statistical analysis

Data were processed in Excel 7.0 (Microsoft). Statistical analyses were performed using the Instat Software Program (GraphPad, San Diego, California), EPIINFO 6.0 (CDC Atlanta, Georgia, 2002). The Fisher's exact test was used (95% confidence level).

#### RESULTS

The percentages of sentinel pigs detected to be cysticercotic by tongue inspection were 13.8% (April–May, 2001, Group S1), 12% (July 2002, Group S2) and 16% (September 2003, Group S3) (Table 1); the differences between these percentages were not statistically significant. The estimate of porcine cysticercosis by necropsy in the sentinel pig

group S1 was 27.6%, which is significantly greater than that estimated by tongue inspection in the same pigs (13.8%); thus, tongue inspection had a sensitivity of 50% compared with that of necropsy (data not shown).

The vaccination trial included 381 piglets, 166 (44%) of which were recovered 4–8 months later, at the time of inspection, whereas 215 (56%) were reported to be sold or missing by their owners. Table 1 shows the percentages of pigs with cysticercosis included in the vaccination trial. In Group V0, 2/20 (10%) pigs were found to be infected, whereas 4.2% (2/48) and 3.1% (3/98) were found to be infected in Groups V1 and V2, respectively. There was no statistical difference in the percentage of cysticercotic pigs between Groups V1 and V2 ( $P>0.05$ ). When pooled, the percentage of cysticercotic pigs in the vaccinated groups (V1 and V2) was 3.4% (5/146). Although the percentage of cysticercotic pigs was less than 50% of that of the saponin group (V0), statistical analysis did not support a significant difference between them, likely to be due to the difference in sample sizes ( $P=0.2$ ; OR=0.31, CI {0.05–1.76}). However, the 3.4% (for cysticercotic, vaccinated pigs) was significantly different from the percentage of cysticercotic sentinel pigs in Groups S1, S2, and S3, before or after the vaccination trial (Table 1).

#### DISCUSSION

The results from this field trial carried out in the rural town of Cuentepec, Mexico, support the protective effect of the vaccine S3Pvac against porcine cysticercosis reported previously for the endemic village of Tepetzitintla (Huerta *et al.* 2001), despite significant epidemiological, ecological and social differences between the two villages.

The percentage of cysticercotic pigs found in the different groups of sentinel pigs, before and after the vaccination study, did not change significantly. The apparent stability of the prevalence in sentinel pigs from the same town suggests that a single vaccination is not sufficient to decrease the impact of *T. solium* transmission at the community level, possibly because the number of human carriers of adult *T. solium* under the local, rural life-style is not affected in such a short a time-frame of diminished cysticercus supply. Thus, the beneficial effects of vaccinating pigs may be obscured on a larger scale if other risk factors remain unchanged (i.e. the tapeworms' long life-span assures ready transmission of infective eggs to a new generation of naïve pigs). This resembles the situation that exists for *Taenia ovis*, *Taenia hydatigena* and *Echinococcus granulosus* control programmes for which, after thorough therapeutic intervention, levels of cysticercosis in sheep are promptly re-established through the persistence or new arrival of dogs infected with adult

worms (cf. Gemmell, 1978; Cabrera *et al.* 2002). The time lag between a reduction in the prevalence of porcine cysticercosis and the prevalence of human carriers of adult *T. solium* may impact on the usefulness of vaccination in controlling or preventing this disease, if not sustained. Also, there is a need for a simultaneous implementation of other measures in control programmes seeking to rapidly and thoroughly interrupt transmission; these include specific and general health educational programmes, the elimination of human carriers of adult *T. solium* in the community, encouragement of confined (indoor) instead of free-range pig farming, improvement of pork inspection and cooking methods, discouragement of the sale of cysticercotic pigs to traffickers, etc.

Notwithstanding their complications (costs, labour intensiveness and loss of pigs) and the imprecision of tongue inspection for cysticercosis, field testing of vaccines against cysticercosis is critical in the evaluation of their true effectiveness and usefulness. To be applicable, a vaccine must be effective not only under experimental conditions but, importantly, must be effective in the diverse and changing natural conditions of transmission. The factors involved in the latter situation are complex and include mixed pig breeds, variable exposure to *T. solium* material from the environment, possible seasonal changes in levels of transmission, variable pigs' health status, stress due to famine and various infectious and non-infectious diseases, and the different life-styles and migration patterns linked to the human population. Clearly, much more work is required to optimize prevention and control programmes involving vaccination against porcine cysticercosis in endemic areas.

The authors thank Mercedes Baca, Demetria Meza, Israel Alvarez and Teresa Velasco for technical assistance. This study was supported by Dirección General de Personal Académico Académico (IN221905) of the Universidad Nacional Autónoma de México, the Howard Hughes Medical Institute (55000643), Laboratorios Silanes SA de CV., México, CONACyT (400310-5-35418-B and SALUD-2004-01-040) and The British Council

## REFERENCES

- Boa, M., Mukaratirwa, S., Willingham, A. L. and Johansen, M. V. (2003). Regional action plan for combating *Taenia solium* cysticercosis/taeniosis in Eastern and Southern Africa. *Acta Tropica* 87, 183–186.
- Cabrera, P. A., Lloyd, S., Haran, G., Pineyro, L., Parietti, S., Gemmell, M. A., Correa, O., Morana, A. and Valledor, S. (2002). Control of *Echinococcus granulosus* in Uruguay: evaluation of different treatment intervals for dogs. *Veterinary Parasitology* 103, 333–340. DOI: 10.1016/S0304-4017(01)00603-3.
- Cai, X., Chai, Z., Jing, Z., Wang, P., Luo, X., Chen, J., Dou, Y., Feng, S., Su, C. and Jin, J. (2001). Studies on the development of DNA vaccine against *Cysticercus cellulosae* infection and its efficacy. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 32, 105–110.
- Carabiu, H., Krecek, R. C., Cowan, L. D., Michael, L., Foyaca-Sibat, H., Nash, T. and Willingham, A. L. (2006). Estimation of the cost of *Taenia solium* cysticercosis in Eastern Cape Province, South Africa. *Tropical Medicine and International Health* 11, 906–916. DOI: 10.1111/j.1365-3156.2006.01627.
- Fleury, A., Morales, J., Bobes, R. J., Dumas, M., Yanez, O., Pina, J., Carrillo-Mezo, R., Martinez, J. J., Fragoso, G., Dessen, A., Larralde, C. and Sciutto, E. (2006). An epidemiological study of familial neurocysticercosis in an endemic Mexican community. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 100, 551–558. DOI: 10.1016/j.trstmh.2005.08.008.
- 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 Lightowers, M. W. (2004). Induction of protection against porcine cysticercosis by vaccination with recombinant oncosphere antigens. *Infection and Immunity* 72, 5292–5297. DOI: 10.1128/IAI.72.9.5292-5297.2004.
- Gemmell, M. A. (1978). The styx field trial: effect of treatment of the definitive host for tapeworms on larval forms in the intermediate host. *Bulletin of the World Health Organization* 56, 433–443.
- González, A. E., Cama, V., Gilman, R. H., Tsang, V. C., Pilcher, J. B., Chavera, A., Castro, M., Montenegro, T., Verastegui, M., Miranda, E. and Bazalar, H. (1990). Prevalence and comparison of serologic assays, necropsy and tongue examination for the diagnosis of porcine cysticercosis in Peru. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 43, 194–199.
- González, A. E., Gauci, C. G., Barber, D., Gilman, R. H., Tsang, V. C., Garcia, H. H., Verastegui, M. and Lightowers, M. W. (2005). Vaccination of pigs to control human neurocysticercosis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 72, 837–839.
- Huerta, M., De Aluja, A. S., Fragoso, G., Toledo, A., Villalobos, N., Hernández, M., Gevorkian, G., Acero, G., Diaz, A., Alvarez, I., Avila, R., Beltrán, C., Garcia, G., Martínez, J. J., Larralde, C. and Sciutto, E. (2001). Synthetic peptide vaccine against *Taenia solium* pig cysticercosis: successful vaccination in a controlled field trial in rural México. *Vaccine* 20, 262–266. DOI: 10.1016/S0264-410X(01)00249.
- Manoutcharian, K., Rosas, G., Hernández, M., Fragoso, G., Aluja, A., Villalobos, N., Rodarte, L. F. and Sciutto, E. (1996). Cysticercosis: identification and cloning of protective recombinant antigens. *Journal of Parasitology* 82, 250–254.
- Manoutcharian, K., Diaz-Orea, A., Gevorkian, G., Fragoso, G., Acero, G., Gonzalez, E., De Aluja, A., Villalobos, N., Gomez-Cande, E. and Sciutto, E. (2004). Recombinant bacteriophage-based multi-epitope vaccine against *Taenia solium* pig cysticercosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 99, 11–24. DOI: 10.1016/j.vetimm.2003.12.009.
- Molinari, J. L., Rodriguez, D., Tato, P., Soto, R., Arechavaleta, F. and Solano, S. (1997). Field trial for

- reducing porcine *Taenia solium* cysticercosis in Mexico by systematic vaccination of pigs. *Veterinary Parasitology* 69, 55–63.
- Morales, J., Velasco, T., Tovar, V., Fragoso, G., Fleury, A., Beltran, C., Villalobos, N., Aluja, A., Rodarte, L. F., Sciutto, E. and Larralde, C. (2002). Castration and pregnancy of rural pigs significantly increase the prevalence of naturally acquired *Taenia solium* cysticercosis. *Veterinary Parasitology* 1, 41–48. DOI: 10.1016/S0304-4017(02)00168-1.
- Morales, J. (2003). The porciculture and the presence of *Taenia solium* cysticercosis in an indigenous community of Morelos, México. Thesis. Facultad de Ciencias Agropecuarias Universidad Autónoma del Estado de Morelos, México.
- Nascimento, E., Costa, J. O., Guimaraes, M. P. and Tavares, C. A. (1995). Effective immune protection of pigs against cysticercosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 45, 127–137.
- Phiri, I. K., Ngowi, H., Afonso, S., Matenga, E., Boa, F., Mukaratirwa, M. S., Githigia, S., Saimo, M., Sikasunge, C., Maingi, N., Lubega, G. W., Kassuku, A., Michael, L., Siziya, S., Krecek, R. C., Noormahomed, E., Vilhena, M., Dorny, P. and Willingham, A. L. 3rd (2003). The emergence of *Taenia solium* Cysticercosis in Eastern and Southern Africa as a serious agricultural problem and public health risk. *Acta Tropica* 87, 13–23. DOI: 10.1016/S0001-706X(03)00051-2.
- Plancarte, A., Flisser, A., Gauci, C. G. and Lightowlers, M. W. (1999). Vaccination against *Taenia solium* cysticercosis in pigs using native and recombinant oncosphere antigens. *International Journal for Parasitology* 29, 643–647. DOI: 10.1016/S0020-7519(99)00021-1.
- Sciutto, E., Martínez, J. J., Villalobos, N. M., Hernández, M., Jose, M. V., Beltran, C., Rodarte, F., Flores, I., Bobadilla, J. R., Fragoso, G., Parkhouse, M. E., Harrison, L. J. and De Aluja, A. S. (1998). Limitations of current diagnostic procedures for the diagnosis of *Taenia solium* cysticercosis in rural pigs. *Veterinary Parasitology* 79, 299–313. DOI: 10.1016/S0304-4017(98)00180-0.
- Sciutto, E., Fragoso, G., Fleury, A., Laclotte, J. P., Sotelo, A. J., Aluja, A., Vargas, L. and Larralde, C. (2000). *Taenia solium* disease in humans and pigs: an ancient parasitosis disease rooted in developing countries and emerging as a major health problem of global dimensions. *Microbes and Infection* 15, 1875–1890. DOI: 10.1016/S1286-4579(00)01336-8.
- Toledo, A., Larralde, C., Fragoso, G., Gevorkian, G., Manoutcharian, K., Hernández, M., Acero, G., Rosas, G., Lopez-Casillas, F., Garfias, C. K., Vazquez, R., Terrazas, I. and Sciutto, E. (1999). Towards a *Taenia solium* cysticercosis vaccine: an epitope shared by *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* protects mice against experimental cysticercosis. *Infection and Immunity* 67, 2522–2530.
- Toledo, A., Fragoso, G., Rosas, G., Hernández, M., Gevorkian, G., Lopez-Casillas, F., Hernández, B., Acero, G., Huerta, M., Larralde, C. and Sciutto, E. (2001). Two epitopes shared by *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* confer protection against murine *T. crassiceps* cysticercosis along with a prominent T1 response. *Infection and Immunity* 69, 1766–1773. DOI: 10.1128/IAI.69.3.1766-1773.2001.
- Viljoen, N. F. (1937). Cysticercosis in swine and bovines, with special reference to South African conditions. *Onderstepoort Journal of Veterinary Science and Animal Industry* 9, 337–570.
- Wang, Q. M., Sun, S. H., Hu, Z. L., Wu, D. and Waag, Z. C. (2003). Immune response and protection elicited by DNA immunization against *Taenia cysticercosis*. *Vaccine* 21, 1672–1680. DOI: 10.1016/S0264-410X(02)00661-8

- ❖ Morales, J., Martínez, J. J, Manoutcharian, K., **Hernández, M.**, Fleury, A., Gevorkian, G., Acero, G., Blancas, A., Toledo, A., Cervantes, J., Maza, V., Quet, F., Bonnabau, H., de Aluja, A. S., Fragoso, G., Larralde, C., Sciutto, E. 2008. Inexpensive anti-cysticercosis vaccine: S3Pvac expressed in heat inactivated M13 filamentous phage proves effective against naturally acquired *Taenia solium* porcine cysticercosis. *Vaccine*. 26:2899-2905.





## Inexpensive anti-cysticercosis vaccine: S3Pvac expressed in heat inactivated M13 filamentous phage proves effective against naturally acquired *Taenia solium* porcine cysticercosis

Julio Morales<sup>a</sup>, José Juan Martínez<sup>a</sup>, Karen Manoutcharian<sup>b</sup>, Marisela Hernández<sup>b</sup>, Agnes Fleury<sup>c</sup>, Goar Gevorgian<sup>b</sup>, Gonzalo Acero<sup>b</sup>, Abel Blancas<sup>b</sup>, Andrea Toledo<sup>b</sup>, Jacquelynne Cervantes<sup>b</sup>, Victor Maza<sup>d</sup>, Fabrice Quet<sup>e</sup>, Henri Bonhabau<sup>e</sup>, Aline S. de Aluja<sup>a</sup>, Gladis Fragoso<sup>b</sup>, Carlos Larralde<sup>b</sup>, Edda Sciutto<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup> Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. 04510, Mexico

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

<sup>c</sup> Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, SSA, Insurgentes Sur 3877, México, D.F. 14269, Mexico

<sup>d</sup> Secretaría de Desarrollo Agropecuario, Dirección General de Ganadería, Gobierno del Estado de Morelos, Mexico

<sup>e</sup> Institut d'Epidémiologie Neurologique et de Neurologie Tropicale (EA3174), Université de Limoges, 2 rue du Dr. Marcland, Limoges 87025, France

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 30 January 2008

Received in revised form 16 March 2008

Accepted 19 March 2008

Available online 10 April 2008

#### Keywords:

Vaccine

*Taenia solium* cysticercosis

Control

### ABSTRACT

In search of reducing vaccine production costs, a recombinant M13 phage version of the anti-cysticercosis tripeptide vaccine (S3Pvac) was developed. The efficacy of S3Pvac-Phage vs. placebo was evaluated in a randomized trial that included 1047 rural pigs in 16 villages of Central Mexico. Three to five months after vaccination 530 pigs were examined by tongue inspection. At 5–27 months of age, 331 pigs (197 vaccinated/134 controls) were inspected at necropsy. Vaccination reduced 70% the frequency of tongue cysticercosis and, based on necropsy, 54% of muscle-cysticercosis and by 87% the number of cysticerci.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

*Toenia solium* cysticercosis still affects humans and rustic pigs living in Mexico [1–3] and in several other developing countries of Latin America, Asia and Africa [4–6], as well as in the countries of destiny of their migrant workers [7–9]. Albeit transiently effective in focal situations, traditional measures to control cysticercosis transmission (i.e., health education, sanitation, meat inspection, ...) are impractical to apply in the large scale and long enough to change the conditions that support parasite transmission [10]. Hopes of quicker, more general and lasting solutions, lie in the development of several technologically based approaches to control the endemia, while the definitive solution of social development finally comes [11]. Research for better and less costly diagnostic and therapeutic agents and protocols is nowadays getting some attention [12–14]. And so is the development of an

effective vaccine against porcine cysticercosis, one that can meet with the conditions of low cost and feasible application to the millions of practically feral pigs exposed to acquire cysticercosis in impoverished nations [15].

The rationale for vaccination of pigs to curtail *T. solium* transmission rests on the expectation that reducing the number of infected pigs and/or their load of metacystodes would lead to a decrease in the number or viability of pig's cysticerci and thus to a reduction in the number of adult tapeworms, the stage of the parasite with the highest potential of spreading the infection [10].

In pursuit of such goal we first developed and successfully tested in the field the anti-cysticercosis S3Pvac synthetic vaccine composed by the protective peptides KETc12, KETc1 and the GK1 derived from the KETc7 [16]. However, the huge costs of synthetic peptide technology make S3Pvac production unaffordable in the massive amounts needed by nation-wide and sustained pig vaccination programs in the weak economies of endemic countries. Recombinant phage technology offered to cut down costs. S3Pvac recombinantly expressed in M13 filamentous phage (S3Pvac-Phage) exhibited high levels of protection against pig cysticercosis under experimental conditions [17]. However, when

Abbreviations: mo, months; vs, versus.

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

E-mail address: [edda@servidor.unam.mx](mailto:edda@servidor.unam.mx) (E. Sciutto).

approaching natural infections we realized that experimentation in pigs under controlled laboratory conditions could hardly imitate the natural pressures of cysticercosis transmission. The diversity of genetic backgrounds of the rural pigs, their meagre diets, their life-long continuous exposure to varied numbers of eggs coming from various tapeworms and the inevitable energy costs from the concomitant stress of living in the wild [18] could all lead to unreliable conclusions. The vaccine had to be tested under natural conditions of transmission and in the genetic type and lifestyles of the pigs exposed to infection [19].

Here, we inform of the efficacy of this novel vaccine candidate (S3Pvac-Phage) tested against naturally acquired pig cysticercosis in 16 rural communities of "Sierra de Huautla" in the State of Morelos, Mexico. The findings support the usefulness of this new, effective and inexpensive anti-cysticercosis vaccine.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Construction of recombinant S3Pvac-Phage

Four different peptide-phage recombinants were prepared: (1) from *Taenia crassiceps* 96 aa long antigen KETc7 (FK7) (Manoutcharian et al., 1996) and (2) KETc7-derived peptide GK1 (FGK1) (aa 69–95, GYYPSDPNTFYAPPYSA); (3) the *T. crassiceps* recombinant antigen-derived peptides KETc1 (APMSTPSATSVRG) (FKETc1) and (4) KETc12 (GNLLLSCLG) (FKETc12) [16]. They were all expressed on the phage surface by cloning the corresponding DNA fragments in phage/phagemid vectors as previously reported [17].

The ligation mixtures of the recombinant phagemids FK7, FGK1 and FKETc12 (fused the foreign peptides to M13 cpVIII) were rescued and amplified by superinfection with M13K07 helper phage (Invitrogen) from transformed *Escherichia coli* TG-1 cells as described previously [20]. KETc1 was cloned into the M13KE phage vector and the recombinant phage clone FKETc1 was amplified by infecting TG-1 cells as described elsewhere [20]. Recombinant phagemids/phage particles were recovered from the supernatants of the cultures at  $10^{12}$  to  $10^{14}$  particles per ml and inactivated and sterilized by autoclave during 30 min at 121 °C. Each pig-dose of the S3Pvac-Phage vaccine contained, in a total volume of 2 ml,  $10^{12}$  formaldehyde-heat inactivated phage particles of each of the four different recombinant phage particles.

### 2.2. Design of the vaccine trial

The objective of this work was to evaluate the efficacy of the S3Pvac-Phage vaccine on real conditions of use: that is, on piglets usually encountered in rural communities of Mexico. The vaccine trial lasted from April 2004 to July 2006. The procedures and experiments reported herein were conducted according to the principles set forth by the Mexican Ethical Committee for the care and use of farm animals.

### 2.3. Selection of rural area and communities

The rural area selected for the vaccination trial (Sierra de Huautla, Morelos, localized in the south of the state between coordinates 18° 20' and 18° 31' north altitude and 98° 51' and 98° 53' west longitudinal) had immediately before been shown was endemic for porcine cysticercosis. About a year before starting the vaccination program, from August to December 2003, tongue cysticercosis was found in 73 (13%) of the randomly selected 562 pigs from the 926 pigs older than 3 months living in 13 of the 16 communities planned to be included. The pigs' sample in this previous assessment of the local endemicity represented 62% of the total population of pigs bred in these communities at that time,

**Table 1**  
Baseline characteristics

	Placebo (n=421)	S3Pvac-Phage (n=626)	P-Value
Age in month (mean ± S.D.)	3.08 ± 1.82	3.15 ± 2.34	0.60
Weight in kg (mean ± S.D.)	14.19 ± 8.28	14.62 ± 8.55	0.42
Sex, n (%)			
Male	198 (47.03)	305 (48.72)	0.59
Female	223 (52.97)	321 (51.28)	
Male castration, n (%)			
Yes	174 (87.88)	253 (82.95)	0.13
No	24 (12.12)	52 (17.05)	
Female castration, n (%)			
Yes	11 (4.93)	9 (2.80)	0.19
No	212 (95.07)	312 (97.20)	
Water supply, n (%)			
Well	80 (19.00)	142 (22.68)	0.14
River	236 (56.06)	356 (56.87)	
Tap-water	105 (24.94)	128 (20.45)	
Confinement, n (%)			
Loose	408 (96.91)	602 (96.17)	0.52
Tethered	13 (3.09)	24 (3.83)	
Latrine in owner's households, n (%)			
Yes	306 (72.68)	441 (70.45)	0.43
No	115 (27.32)	185 (29.55)	
Origin of pigs, n (%)			
Household	359 (85.27)	538 (86.08)	0.71
Purchased	62 (14.73)	88 (13.92)	
Destinations of pigs, n (%)			
Self-consumption	122 (19.98)	186 (29.71)	0.79
For sale	299 (71.02)	440 (70.29)	
Piglets' breed, n (%)			
Criollo	265 (62.95)	365 (58.31)	0.13
Other	156 (37.05)	261 (41.69)	

according to data from the Secretaría de Desarrollo Rural, Morelos. These previous findings documented active transmission of porcine cysticercosis in the communities and triggered the vaccination program which lasted from April 2004 to July 2006. This program included a total of 1047 pigs as shown in Table 1.

**Table 2**  
Vaccination reduced 70% of the infected pigs diagnosed by tongue inspection at 7–9 months of age

Community	No of pigs included <sup>a</sup>	No of pigs inspected	% of infected pigs <sup>b</sup>	
			Control	Vaccinated
Ajuchitlan	136	113	6.6 (3/45)	4.4 (3/68)
Chimalcatlan	141	53	10.5 (2/19)	0 (0/34)
El Limon	90	29	27 (3/11)	11.1 (2/18)
Huautla	132	73	7.5 (3/40)	0 (0/33)
Xochipala	12	12	40 (2/5)	0 (0/7)
Huautla	24	9	25 (1/4)	0 (0/5)
El Tepehuaje	24	16	20 (1/5)	12.5 (1/11)
Huizactla	3	3	0	0 (0/3)
La Era	46	34	27.2 (9/22)	8.3 (1/12)
Los Elotes	24	13	0 (0/4)	0 (0/9)
Los Sauces	94	48	10.5 (2/19)	10.3 (3/29)
Quilamula	158	32	7.6 (1/13)	0 (0/19)
Rancho Viejo	44	25	33.3 (3/9)	6.2 (1/16)
San Jose de Pala	66	34	6.6 (1/15)	0 (0/19)
Santiopa	44	29	9 (1/11)	5.5 (1/18)
El Vergel	9	7	0 (0/1)	0 (0/6)
Total	1047	530	13 (28/223)	3.9 (12/307)

<sup>a</sup> Total number of not infected pigs of 3–4 months of age included in the vaccination trial according to tongue inspection.

<sup>b</sup> Number of infected pigs/total number of pigs inspected by tongue inspection in the control and in the vaccinated group in each of the 16 communities.

Sixteen rural communities were selected from the 25 in the area (Table 2). The conditions which favour the transmission of *T. solium* were present in all communities selected: a high prevalence of cysticercosis in live pigs (13%, as cited above), open air defecation, rustic pig rearing where pigs are allowed to roam free in search of food, extensive domestic pig slaughtering and local consumption of non-inspected pork with cysticerci.

2.4. Statistical design

Considering a vaccine efficacy of 50%, a minimum of 225 piglets in each vaccinated and control group would be required for confident statistical inferences [21,22]. In order to minimize differences related to hosts' genetic and exposure factors, half the members of each litter were immunized with S3Pvac-Phage vaccine described above and half with placebo (saline). The additional pig of litters with odd number of piglets was vaccinated. The owners were kept unaware of the treatment received by each pig in the litter and were instructed to raise the pigs as accustomed.

The response variables were: (a) cysticercosis prevalence by tongue inspection; (b) cysticercosis prevalence at necropsy (the number of infected pigs with at least one parasite in masseters or tongue or diaphragm or heart/the total number of pigs inspected in the group); and (c) the number of cysticerci found in each individual

pig carcass, macroscopically distinguishing whether the parasites were damaged or vesicular.

2.5. Pigs included in the study

For vaccination, 1127 piglets of 3–4 months of age and apparently healthy were eligible for inclusion. From these, 80 were excluded because they were found to be already positive for tongue cysticercosis. The remaining 1047 negative for tongue cysticercosis were included (Fig. 1). The owners of all piglets included accepted to participate in the study and gave their informed consent. All pigs included were labelled using a numbered microchip for their individual identification.

2.6. Pig-associated variables

The study recorded for each individual pig: age (months), weight (kg), and pregnancy (yes/no), male and female castration (yes/no), age (months) of castration, confinement (loose, tethered), source of animal drinking water supply (well, river, or tap water), latrine in the owners' household (yes/no) and whether it was positive or negative by tongue inspection. The pigs' sex, castration and pregnancy status were verified by veterinarian inspection. Pregnancy was confirmed by the birth of the piglets. Pregnant sows were slaughtered by their owners 2–3 months after parturition.

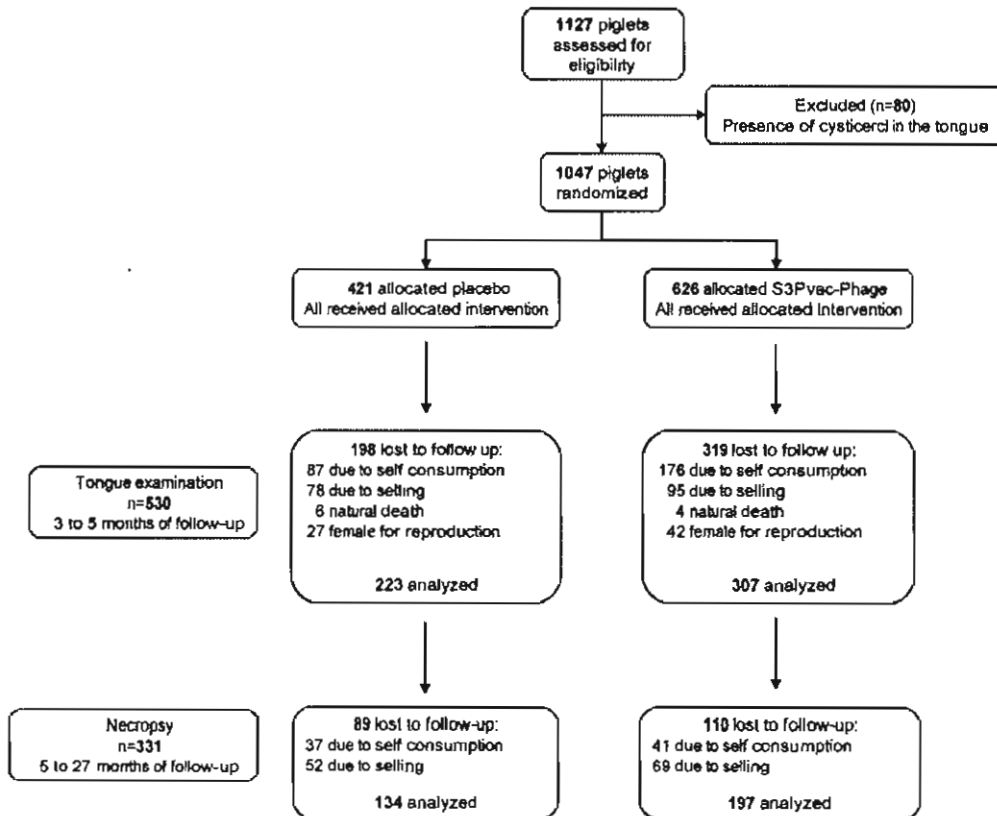


Fig. 1. Flow chart, vaccination survey in 16 Mexican communities (April 2004–July 2006).

### 2.7. Vaccination of pigs

Half of the piglets in each litter received two subcutaneous injections of S3Pvac-Phage at 3–4 months of age and 1 month later, and the other half of the litter received only saline as placebo. When litters were composed by an odd number of piglets, the additional pigs were vaccinated. The pigs' age at vaccination (3–4 months) was chosen considering that high mortality (up to 50%) is expected in rural piglets before 2 months of age [19]. The S3Pvac-Phage vaccine composed by the four recombinant phages was autoclaved and adjusted to  $4 \times 10^{12}$  phage particles in 2 ml of media containing 0.05% of formaldehyde. Two millilitres of such vaccine preparation were injected subcutaneously at the base of the pigs' ears. The vaccine was maintained at 4–10°C until used. Control pigs were each injected with 2 ml of saline only.

### 2.8. Follow-up of the vaccination trial

The 16 communities included in this study were visited weekly to look after the pigs included in the trial and to identify any modification in their localization in the community or disappearance due to their selling or death and to determine their reproductive status. For this purpose pigs were double-labelled using a microchip and an earring that permitted the visual identification of those included in the vaccination trial. After 7–9 months of age (3–5 months after vaccination), their tongues were inspected for cysticercosis. At 5–27 months of age, when their owners slaughtered the pigs for consumption, cysticercosis was diagnosed at necropsy by dissecting masseters, tongue, diaphragm, heart and the liver in search of visible cysticerci by making scalpel slices every half-centimetre. The number of cysticerci found in each pig was registered and the owners were instructed not to consume the meat if the pig was infected. Diagnosis of porcine cysticercosis was performed by six thoroughly trained technicians from Dirección General de Ganadería, directly supervised by one of veterinarians of our research team. Following the instructions of the veterinarians the infected carcasses were not consumed by the owners or were extensively cooked before consumed.

### 2.9. Statistical analysis

Data were processed in Excel 7.0 (Microsoft). Statistical calculations were performed using the computer program Statistica 9.0 (StatCorp LP, College Station, USA) and the statistical program of EPI-Info, SPSS (SPSS Inc. Chicago, USA) and SAS 9.1.3 (SAS Institute Inc., Cary, USA). Descriptive analyses were based on frequencies and percentages for qualitative variables and means and standard deviations for quantitative variables. Comparisons were made using the Student's *t*-test or the Mann-Whitney *U*-test. Frequencies were compared using the  $\chi^2$ -test, with Yates' correction or two-tailed Fisher's exact tests when necessary. Adjusted relative risks (RRa) with the corresponding 95% confidence interval (95% CI) and *P* values were estimated by a multivariate logit regression. We incorporated in the multivariate model, all variables of interest for which we found a *P* value of less than 0.25 in univariate analyses, by a backward stepwise procedure. All analyses of efficacy, using tongue examination or necropsy, as criteria of diagnosis were made at the end of study.

A two-sided *P* value of less than 0.05 was considered to indicate statistical significance.

## 3. Results

### 3.1. Sample size changes during the vaccine trial

A total of 1127 piglets of 3 months of age were examined by tongue inspection before vaccination. Eighty pigs (7.1%) were found infected and excluded from the study. Of the other 1047 not-cysticercotic piglets 626 were vaccinated and 421 were used as controls. Baseline characteristics of the 1047 pigs were not significantly different between control and vaccinated pigs (Table 1). Most male pigs ( $n = 427$ ) and few sows ( $n = 20$ ) were castrated by their owners at different times prior to slaughter arguing it quickens weight gain and improves the quality of the meat.

Changes in sample size occurred as the trial proceeded, as shown in Fig. 1 according to CONSORT Statement [23]. Because of the extremely harsh social and economic conditions of the communities involved, by the end of the trial, 49% of the pigs originally included were missing, mostly on account of their being consumed or sold. The diagram in Fig. 1 shows in detail the number and design allocation of the missing pigs.

Tongue inspections were made at 3–5 months after vaccination on 530 of the piglets included in the trial. Nearly half of the included pigs ( $n = 517$ ) could not be inspected because they had been consumed or sold by their owners or were sacrificed without timely notice to the project's personnel (198 and 319, respectively in placebo and in the S3Pvac-Phage group). The residual 102 pigs (44 controls and 58 vaccinated) were not examined because of consumption. Necropsies were performed at 5–27 months of age on 331 pigs (197 and 134 pigs in the vaccinated and control group, respectively) because the residual 199 pigs (89 controls and 110 vaccinated) were consumed or sold without timely notice to the project's personnel.

Considering the high number of piglets lost during the two stages of follow-up (tongue inspection, necropsy), analyses of efficacy were adjusted to ensure the statistical representation of the initial population. The variables of adjustment were identified using a logistic regression of the initial variables and the initial number of observations done (1047). Variables significantly linked with pig loss at tongue inspection were: origin (household, purchased), castration (yes, no), Piglets' breed (Criollo, other) and sex (male, female). Variables significantly linked with pig loss at the necropsy examination were: weight and castration (yes, no). Neither vaccination nor placebo were linked with loss at tongue inspection.

### 3.2. Effect of vaccination as determined by tongue inspection

Table 2 shows the effect of vaccination on the number of infected pigs in the 530 pigs examined by tongue inspection at 7–9 months of age: cysticercosis was diagnosed in 12 pigs (3.9%) of the vaccinated group and in 29 pigs (13.0%) of the control group, corresponding to a vaccine efficacy of 70%. In the S3Pvac-Phage group an adjusted relative risk (adjustment on origin, castration, piglets' breed and sex as previously described) of 2.7 (CI<sub>95</sub>: [1.8–4.2],  $P < 0.0001$ ) was estimated, which means that cysticercosis frequency in vaccinated pigs are nearly threefold less than that of the placebo group (number of observations used = 530,  $R^2 = 0.32$ ).

### 3.3. Effect of vaccination as determined by necropsy

Table 3 shows that vaccination significantly decreases the number of infected pigs (13/197 = 6.6% in vaccinated group vs. 19/134 = 14.2% in control group,  $P = 0.036$ ) and also significantly reduces the number of cysticerci counted at necropsy ( $8.4 \pm 14.4$  in

**Table 3**  
Effect of vaccination on the number of pigs infected and the parasite load according to necropsy at 5–27 months of age

Community	<sup>a</sup> Control	<sup>b</sup> Number of cysticerci	<sup>a</sup> Vaccinated	<sup>b</sup> Number of cysticerci
Ajuchitlan	5/19	265	3/28	25
Chimalacatlan	2/9	71	2/10	5
El Limon	1/14	109	1/14	27
Huautla	1/31	69	2/28	21
Xochipala	0/1	0	1/7	6
Huaxtla	1/1	86	0/7	0
El Tepehuaje	0/2	0	0/1	0
Huizaxtla	0/0	0	0/2	0
La Era	1/7	107	1/4	2
Los Elotes	0/4	0	0/7	0
Los Sauces	1/11	40	3/23	49
Quilamula	2/12	44	0/15	0
Rancho Viejo	1/7	15	0/24	0
San Jose de Pala	3/10	182	0/13	0
Santiopa	1/6	60	0/14	0
El Verger	0/0	0	0/1	0
Total	19/134	1048	13/197	135
Prevalence	14.2%		6.6%	
Mean ± S.D.		65.5 ± 74.2		8.4 ± 14.4

<sup>a</sup> Number of infected pigs/total number of pigs inspected by necropsy in the control and in the vaccinated group in each of the 16 communities.

<sup>b</sup> Number of cysticerci recovered in the control or vaccinated pigs infected in each community. Vaccine efficiency: 54.15% (reduction in the number of infected pigs) or 87.1% (reduction in the number of cysticerci).

**Table 4**  
Effect of biological and exposure variables on infection determined by necropsy

	Infected	Infected	P-Value
Gender (male/female)	9/23	157/142	0.009
Gestation (yes/no)	12/11	20/123	0.0001
Castration in female (yes/no)	1/22	4/138	0.53
Castration in male (yes/no)	9/0	142/15	1
Month since castration in male	12.3 ± 4.2 <sup>a</sup>	9.5 ± 5.4	0.12
Free roaming (yes/no)	32/0	289/10	0.6
Open water (yes/no)	27/5	243/56	0.8
Latrine (presence/absence)	15/17	266/73	0.001
Vaccination (yes/no)	19/13	115/184	0.036

<sup>a</sup> Mean ± S.D.

vaccinated group vs. 65.5 ± 74.2 in control group,  $P = 0.013$ ). All the cysticerci detected were macroscopically vesicular. The relative risk of vaccinated pigs at necropsy was 2.3 (CI<sub>95</sub>: [1.2–4.3],  $P = 0.0113$ , adjustment on weight and castration as previously described), which means that frequency of cysticercosis in vaccinated pigs is nearly half that of placebo controls (number of observations used = 331,  $R^2 = 0.48$ ).

**Table 5**  
Relevance of exposure and sexual factors in the vaccine efficacy in the 331 pigs diagnosed at necropsy

	Controls		Vaccinated		$P^c$	$P^d$
	<sup>a</sup> Frequency of infection	<sup>b</sup> (X ± S.D.)	<sup>a</sup> Frequency of infection	<sup>b</sup> (X ± S.D.)		
Sex						
Male	3/63	54 ± 16	6/103	11 ± 10	1	0.02
Female	16/71	55 ± 35	7/94	10 ± 14	0.007	0.008
Latrines						
Yes	8/97	47 ± 39	7/144	7 ± 6	0.29	0.019
No	11/37	61 ± 28	6/53	14 ± 17	0.05	0.003
Gestation						
Yes	10/73	51 ± 33	2/19	3 ± 1	<0.001	0.06
No	6/58	62 ± 41	5/76	13 ± 17	0.5	0.034

X: mean; S.D.: standard deviation.

<sup>a</sup> Number of infected pigs/total number of pigs.

<sup>b</sup> Mean of cysticerci ± S.D. in infected pigs.

<sup>c</sup> Difference in the frequency of infected pigs between control and vaccinated groups.

<sup>d</sup> Difference in the number of parasite between control and vaccinated groups.

**3.4. Relevance of biological and exposure factors on cysticercosis prevalence**

Table 4 shows the different pig-associated factors and their relation with cysticercosis as determined by necropsy. In the univariate analysis, male ( $P = 0.009$ ), absence of gestation ( $P = 0.0001$ ), lower time since castration in males ( $P = 0.004$ ), latrine in the owners' household ( $P = 0.001$ ) and vaccination ( $P = 0.036$ ) were related to a lower prevalence of cysticercosis. A multivariate logistic regression was performed including those factors that were related to infection with a significance under  $P < 0.1$  in univariate analysis. The presence of latrine ( $P = 0.039$ ), gestation ( $P < 0.0001$ ) and vaccination ( $P = 0.004$ ) were factors that significantly associated with protection according to this multivariate analysis.

**3.5. Relevance of biological and exposure factors in the vaccine efficacy**

Table 5 summarizes the effect of exposure and sexual factors on the vaccine efficacy as determined at necropsy and measured in terms of reduction of infected pigs and reduction in the number of the cysticerci in those infected. Only the three parameters signifi-

**Table 6**  
Weight of the control and vaccinated pigs included in the trial

	Age (months)			<i>P</i> <sup>a</sup>	<i>P</i> <sup>b</sup>	
	3–4	7–9	12			
<b>Controls</b>						
Infected	11	18 ± 10.6	43.2 ± 24.4	52.1 ± 11.9	0.006	0.29
Not-infected	71	15.1 ± 8.5	45.4 ± 20	63.4 ± 18.4	<0.0001	<0.0001
<b>Vaccinated</b>						
Infected	6	6 ± 2	30.8 ± 18.5	41.7 ± 7.5	0.004	0.2
Not-infected	127	14.8 ± 8.9	43.9 ± 19.8	61.2 ± 19.1	<0.0001	<0.0001

Increase of the weight of 215 pigs in which cysticercosis was diagnosed by tongue inspection and necropsy.

<sup>a</sup> Differences in the weight between 3–4 and 7–9 months.

<sup>b</sup> Differences in the weight between 7–9 and 12 months of age.

cantly related to cysticercosis (Table 4) were used for this analysis: the sex of the pigs, if female had or not one gestation, and if the pigs' owners had or not latrines in their houses. As Table 5 shows, the vaccine significantly reduced the percent of infected pigs in females but not in males. The vaccine also reduced the frequency of cysticercosis in females that had been pregnant and to similar extents in pigs whose owners had or had not latrines at home. In addition, the vaccine significantly reduced the number of cysticercosis in vaccinated pigs disregarding any of the other variables considered.

### 3.6. Weight gain and age

Table 6 shows the weight gain of pigs in which tongue and necropsy diagnosis coincided. Their weights increased similarly between 3–4 and 7–9 months of age, regardless of whether they were vaccinated or controls and whether infected or not. However, after 7–9 months of age, a non-significant 28% increase in weight was detected in control or vaccinated pigs if they had acquired cysticercosis, while those healthy still significantly increased their weight by 39%.

## 4. Discussion

This study shows the extent of the protective capacity of the S3Pvac-Phage vaccine against naturally acquired porcine cysticercosis under realistic conditions of transmission in a highly endemic region of Mexico [1].

A high number of pigs were lost for follow-up despite close weekly surveillance. This is neither surprising nor novel for in-the-field evaluation trials in underdeveloped regions [15]. Undisciplined human behaviour is emblematic of communities under pressure by harsh social and economic conditions, as they occur in rural Mexico. However, the number of pigs lost during the trial from the control and the vaccinated group did not significantly differ at tongue examination ( $P=0.21$ ) nor at necropsy ( $P=0.90$ ), indicating unbiased withdrawal of the pigs. That is, infected pigs were not preferentially withdrawn from the initial sample.

However, in order to examine the effect of pig loss upon the validity of our statistical conclusions, an independent research group (co-authors from Université de Limoges), expert in statistical analysis, was invited to more thoroughly examine the database, reduce bias and improve the robustness of the conclusions reached. All their statistical approaches performed (Student's *t*-test, Mann-Whitney *U* or  $\chi^2$  with Yates' correction or two-tailed Fisher's exact tests or the logistic analysis) confirmed that vaccination significantly reduced the prevalence and intensity of porcine cysticercosis in the sample studied by tongue inspection and by necropsy at time of slaughter. Also, when using the most rigor-

ous maximum Bias Approach to statistical analysis of trials with numerous missing data, in two of its modalities, it confirmed significant protective effects of vaccination. However, no differences in prevalence due to vaccination were significant in its most stringent modality of considering as cysticercotic all missing pigs, vaccinated or not. An unlikely possibility since similar numbers of vaccinated and not vaccinated pigs were documented as missing and because it would imply a cysticercosis prevalence level close to 50% among the included pigs. Their results showed that S3Pvac-Phage significantly reduced the prevalence of cysticercosis among the vaccinated pigs by 54.2% and, most significantly, reduced the intensity of infection with vesicular cysts by 87.1%. It is important to note that a pig was considered infected regardless of its total parasite load: the pig was scored as positive even if only one cysticercus was found in its muscles. Thus, the higher efficacy of a vaccine in reducing the parasite load is a more sensitive response variable than the stringent goal of sterile immunity. The latter may perhaps be of use for negotiations dealing with international import of potentially contaminated meats but, for lowering transmission in a defined endemic region, a reduction of 87% in the number of parasite larvae that may eventually transform into tapeworms could significantly impact the endemicity to the low levels of impending extinction of the parasite [24].

The efficacy of the S3Pvac-Phage vaccine reported in this study is similarly high to that obtained using the synthetic first version of the anti-cysticercosis vaccine (S3Pvac) when also tested under realistic conditions of rural Mexico [16]. We believe this is a major achievement since the significant lower cost of this new version makes its application feasible for extensive control programs in undeveloped countries.

Other important findings are also disclosed by this trial.

The vaccine significantly reduced the number of cysticerci in pigs exposed to different levels of exposure: high (absence of latrines) or low (presence of latrines). Indeed, in the absence of vaccination, cysticercosis prevalence changed from 8.2 to 29.8% if the owners of the pigs had or not latrines in their households, the relevance of improving sanitary conditions in the rural areas. However, vaccination plus latrines dropped down the overall cysticercosis prevalence further, from 29.8 (without both variables) to 4.8% (with both of them): a prime example of positive interactions between control measures aimed against porcine cysticercosis.

The roles of sexual factors upon cysticercosis prevalence and vaccination effects are also emphasized by this study. A higher prevalence of cysticercosis was found in females (22.5%) vs. castrated male pigs (4.8%). The vaccine did not modify the percentage of male pigs totally protected possibly because castration inhibits the effective TH1 mediated immune response to vaccination, as it happens in murine cysticercosis [25]. Nevertheless, the vaccine significantly reduced the number of cysticerci established in both females and castrated males to a similar relative extent (81% of reduction vs. controls). The increase of cysticercosis prevalence in pregnant sows is also intriguing. Ten of the thirteen pigs that were pregnant in the control group became infected. Albeit the low number of pigs included in this group, the significant relation between pregnancy and cysticercosis points to a role of hormonal factors in cysticercosis, very much in line with the consistently higher prevalence of cysticercosis in sows found in different epidemiological studies [1,26]. Nonetheless, the vaccine managed to reduce the parasite loads even in the more permissive pregnant sows. Clearly, the relevance of sexual factors merits further studies considering their prominent role under experimental conditions in murine cysticercosis caused by the closely related cestode *Taenia crassiceps* [25] and earlier epidemiological hints coming from porcine and human cysticercosis [26–30].

Another finding of practical importance is that vaccination did not reduce the weight gain of pigs but cysticercosis did (Table 6). So that, the net effect of vaccination not only lowers prevalence of porcine cysticercosis but also implies economic benefit by allowing for a normal weight gain in the protected pigs.

In summary, this article exhibits clear evidence of the usefulness and limits of the newly developed and less costly vaccine S3Pvac-Phage under realistic conditions of porcine-cysticercosis transmission.

#### Acknowledgements

The authors thank Cesar Medina Rojas, Roberto Oregón Morales, José López Reyes, Ubaldo Leal Ponciano, David García Herrera, Oscar Cruz Bartolomé, Juan Antonio Hernández, Diana Hernández, Mario Kemler Valencia, Antonio Linares Ibáñez, Humberto Cisneros, Julián Rodríguez, Alfredo Blas Brito, Salvador Linares Lara, Conrado Canovas Olmos, Francisco Gadea, Elias Salinas Granados, Herminio Jiménez, Nelly Peña H., Manuel Alejandro, Julián Rodríguez Cabrera, Silvia Vargas and Mercedes Baca for their technical support. The authors also thank the program ECOS-North, (Evaluation-orientation de la Coopération Scientifique, France, Amérique Latine) which permitted the collaboration of a French research group comprised by some authors (Quet F and Bonnabau H) under the leadership of Pierre Marie Preux. This investigation was partially supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología 185946, 46953-m, 2004-01-040, the Fundación Produce, Morelos A.C. and Secretaría de Desarrollo Rural del Estado de Morelos, México, CEAMISH-Universidad Autónoma del Estado de Morelos, LISIG-UAEM, Autoridades Municipales de Tlaquitenango, Tepalcingo y Ciudad Ayala del Estado de Morelos, CBTA No. 8 de Xoxocotla and the Dirección General de Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México IN-221905.

#### References

- Morales J, Martínez JJ, García-Castella J, Peña H, Maza V, Villalobos N, et al. *Taenia solium*: the complex interactions, of biological, social, geographical and commercial factors, involved in the transmission dynamics of pig cysticercosis in highly endemic areas. *Ann Trop Med Parasitol* 2006;100(2):123–35.
- Rodríguez-Canul R, Fraser A, Allan JC, Domínguez-Alpizar JL, Anguaz-Rodríguez F, Craig PS. Epidemiological study of *Taenia solium* taeniasis/cysticercosis in a rural village in Yucatan State, Mexico. *Ann Trop Med Parasitol* 1999;83:57–67.
- Fleury A, Morales J, Bobes RJ, Dumas M, Yáñez O, Pina J, et al. An epidemiological study of familial neurocysticercosis in an endemic Mexican community. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2006;100:551–8.
- Montano SM, et al. Cysticercosis Working Group in Peru. Neurocysticercosis: association between seizures, serology, and brain CT in rural Peru. *Neurology* 2005;65(2):229–33.
- Rodríguez-Hidalgo R, Benítez-Ortiz W, Praet N, Saa LR, Vercruyse J, Brandt J, et al. Taeniasis-cysticercosis in Southern Ecuador: assessment of infection status using multiple laboratory diagnostic tools. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006;101(7):779–82.
- Preux PM, Druet-Cabanac M. Epidemiology and aetiology of epilepsy in sub-Saharan Africa. *Lancet Neurol* 2005;4(1):21–31.
- DeGiorgio CM, Medina MT, Duron R, Zee C, Escueta SP. Neurocysticercosis. *Epilepsy Curr* 2004;4:107–11.
- De la Garza Y, Gravis EA, Daver NG, Garbarin KJ, Shandera WX, Schantz PM, et al. Epidemiology of neurocysticercosis in Houston, Texas. *Am J Trop Med Hyg* 2005;73(4):766–70.
- Sorvillo FJ, DeGiorgio C, Waterman SH. Deaths from cysticercosis United States. *Emerg Infect Dis* 2007;13:230–5.
- Sciutto E, Fragoso G, Fleury A, Laclette JP, Sotelo J, Aluja A, et al. *Taenia solium* disease in humans and pigs: an ancient parasitosis disease rooted in developing countries and emerging as a major health problem of global dimensions. *Microbes Infect* 2000;2:1875–90.
- Pawliowski ZS, Allan J, Sarti E. Control of *Taenia solium* taeniasis/cysticercosis: from research towards implementation. *Int J Parasitol* 2005;35:1221–32.
- Nash TE, Singh G, White AC, Rajshikhar V, Loeb JA, Proano JV, et al. Treatment of neurocysticercosis: current status and future research needs. *Neurology* 2006;67(7):1120–7.
- Levine MZ, Lewis MM, Rodríguez S, Jiménez JA, Khan A, Lin S, et al. Development of an enzyme-linked immunoelectrotransfer blot (EITB) assay using two baculovirus expressed recombinant antigens for diagnosis of *Taenia solium* taeniasis. *J Parasitol* 2007;93(2):409–17.
- Serpa JA, Yancey LS, White Jr AC. Advances in the diagnosis and management of neurocysticercosis. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2006;4(6):1051–61.
- Sciutto E, Rosas G, Hernández M, Morales J, Cruz-Revilla C, Toledo A, et al. Improvement of the synthetic tri-peptide vaccine (S3Pvac) against porcine *Taenia solium* cysticercosis in search of a more effective, inexpensive and manageable vaccine. *Vaccine* 2007;25(8):1368–78.
- Huerta M, de Aluja AS, Fragoso G, Toledo A, Villalobos N, Hernández M, et al. Synthetic peptide vaccine against *Taenia solium* pig cysticercosis: successful vaccination in a controlled field trial in rural Mexico. *Vaccine* 2001;20:262–6.
- Manoutcharian K, Diaz-Orea A, Gevorkian G, Fragoso G, Acero G, Gonzalez E, et al. Recombinant bacteriophage-based multi-epitope vaccine against *Taenia solium* pig cysticercosis. *Vet Immunol Immunopathol* 2004;99:11–24.
- Del Rey A, Roggero F, Randolph A, Mahood C, McCano S, Rettori V, et al. IL-1 resets glucose homeostasis at central levels. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103(43):16039–44.
- Sciutto E, Morales J, Martínez JJ, Toledo A, Villalobos MN, Cruz-Revilla C, et al. Further evaluation of the synthetic peptide vaccine S3Pvac against *Taenia solium* cysticercosis in pigs in an endemic town of Mexico. *Parasitology* 2007;134:129–33.
- Manoutcharian K, Terrazas LI, Gevorkian G, Acero G, Petrossian P, Rodríguez M, et al. Phage-displayed T-cell epitope grafted into immunoglobulin heavy-chain complementary-determining regions: an effective vaccine design tested in murine cysticercosis. *Infect Immun* 1999;67(9):4764–70.
- Lemeshow S, Hosmer DW, Janella K, Lwanga SK. Adequacy of sample size in health studies. John Wiley & Sons Ltd.; 1990.
- Elshoff JD, Lemeshow S. Sample size determination in epidemiologic studies. In: Ahrens W, Pigeot J, editors. *Handbook of epidemiology*. Berlin/Heidelberg: Springer; 2004. p. 559–94.
- Moher D, Schulz KF, Altman DG. For the CONSORT Group. The CONSORT statement: revised recommendations for improving the quality of reports of parallel-group randomised trials. *Lancet* 2001;357:1191–4.
- Heesterbeek JA, Roberts MG. Threshold quantities for helminth infections. *Math Biol* 1995;33(4):415–34.
- Morales-Montor J, Larralde C. The role of sex steroids in the complex physiology of the host-parasite relationship: the case of the larval cestode of *Taenia crassiceps*. *Parasitology* 2005;131(Pt 3):287–94.
- Morales J, Velasco T, Tovar V, Fragoso G, Fleury A, Beltrán C, et al. Castration and pregnancy of rural pigs significantly increase the prevalence of naturally acquired *Taenia solium* cysticercosis. *Vet Parasitol* 2002;108:41–8.
- Peña N, Morales J, Morales-Montor J, Vargas-Villavicencia A, Fleury A, Zarco L, et al. Impact of naturally acquired *Taenia solium* cysticercosis on the hormonal levels of free ranging boars. *Vet Parasitol* 2007;149(1–2):134–7.
- Del Brutto OH, García E, Talámas O, Sotelo J. Sex-related severity of inflammation in parenchymal brain cysticercosis. *Arch Intern Med* 1988;148(3):544–6.
- Larralde C, Montoya RM, Sciutto E, Diaz ML, Govezensky T, Coltori E. 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* 1989;40:282–90.
- Fleury A, Dessesio A, Preux PM, Dumas M, Tapia G, Larralde C, et al. Symptomatic human neurocysticercosis—age, sex and exposure factors relating with disease heterogeneity. *J Neurol* 2004;251(7):830–7.

- ❖ Sciutto, E., Fragoso, G., de Aluja, A. S., **Hernández, M.**, Rosas, G., Larralde, C. 2008. Vaccines against cysticercosis. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 8:415-423.



## Vaccines Against Cysticercosis

Edda Sciutto<sup>1\*</sup>, Gladis Fragoso<sup>1</sup>, Aline S. de Aluja<sup>2</sup>, Marisela Hernández<sup>1</sup>, Gabriela Rosas<sup>3</sup> and Carlos Larralde<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Investigaciones Biomédicas, <sup>2</sup>Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, México D. F., <sup>3</sup>Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca Morelos, México

**Abstract:** *Taenia solium* cysticercosis is a major parasitic disease that seriously and frequently affects human health and economy in undeveloped countries. Since pigs are an indispensable intermediate host, it is conceivable to curb transmission by reducing pig cysticercosis through their effective vaccination. This article reviews current knowledge on the development of vaccines against porcine cysticercosis. It highlights the development of several versions of S3Pvac aimed to increase effectiveness, reduce costs and increase feasibility by novel delivery systems and alternative routes of administration.

**Keywords:** *Taenia solium*, cysticercosis, neurocysticercosis, vaccines, control.

### INTRODUCTION

Vaccination is one of the most promising biotechnological measures for the control of infectious diseases. Important progress in molecular biology and immunology has provided new and safer vaccines against a variety of viral and bacterial pathogens [1-4]. However, vaccination has been less successful in the prevention of human infections caused by protozoan parasites, such as malaria, leishmaniasis and trypanosomiasis, in spite of the multiple and millionaire efforts carried out for the development of vaccines [5]. In contrast, the situation seems exceptionally different for cestode parasites, against which several vaccines are effective [6-10].

### THE CASE OF TAENIA SOLIUM

*Taenia solium* infection of humans and pigs seems vulnerable to immunological intervention. It is especially noticeable that the cysticercus is frequently found spontaneously destroyed and surrounded by many immune cell types in activated states expressing features involved in immunity [9, 11-16]. There are also some epidemiological clues involving immunity. In rural communities of endemic areas, cranial axial computerized tomography (CTscan) not infrequently finds people with single nodular lesions in their brains, which are deemed compatible with a cysticercus located in the central nervous system. These putative cysticerci are usually calcified, their destruction not being associated to any symptoms or therapeutic interventions [17-19]. This capability to destroy the parasite does not seem to depend uniquely on the years of evolution, since in children most of brain cysticerci are also found calcified [19, 20]. On the other hand, in pigs experimentally challenged and maintained well nourished in clean and relaxed conditions, the parasites begin to disappear months after challenge and, after approximately one year, the majority are found calcified in the muscle masses [21, 22]. In contrast, in the pigs' CNS, the cysticerci stay vesicular, apparently undamaged,

and even after one year from challenge [23]. Possibly, the cysticerci located in the pigs' brains require more time to be destroyed than those located in the skeletal muscles. If that also occurs in human infection it is hard to sustain since human and porcine cysticercosis exhibit many differences in absolute times of duration (many years in humans and usually one year in pigs) and in parasite loads (rarely more than ten parasites in humans versus tens or hundreds in the pigs). Differences in their immune response, recorded at almost surely different times of infection and therefore perhaps trivial, are that pigs but not humans, have circulating mature T lymphocytes CD4+CD8- [24, 25] and a high percentage of T  $\gamma\delta$  cells with a phenotype CD2+CD4-CD8+, CD2+CD4-CD8- y CD2-CD4-CD8+ [26].

However, some other immunological observations in human NC more strongly suggest a role for the immune response in the evolution of *T. solium* infection. Notwithstanding the fact that the parasite itself may have its own internal biological clock timing its death, differences in the immune profiles of those individuals that destroy the parasite from those that cannot damage it sustains participation of the host's immune system [27]. In humans, a specific systemic response type Th2 associates to calcified neurocysticercosis is well defined, while symptomatic neurocysticercosis is associated to a depressed systemic specific response [28, 29]. Additional evidence indicates to the existence of acquired immunity and temporary protection induced by the primo-infection [22], a fact that argues in support the potential benefit of vaccination against cysticercosis caused by *T. solium*. The observations presented above are not conclusive proof of immunity being responsible of the cysticercus destruction but they add up to a strong inference, which satisfactorily explains the success had by different immunogens inhibiting the installation of *T. solium* cysticerci and/or promoting their destruction.

### DEVELOPMENT OF VACCINES AGAINST PORCINE CYSTICERCOSIS

Different parasite antigens, originally derived from related cestodes (*T. solium*, *T. crassiceps*, *T. saginata*, *T. ovis*) at different developmental stages of the parasite (i.e., oncospheres, cysticerci), purified, recombinant or synthetic,

\*Address correspondence to this author at the Instituto de Investigaciones Biomédicas, A.P. 70228, 04510 México, D. F., México México 04510, D.F., México, Tel: (5255) 5622-3153; Fax: (5255) 5622-3369; E-mail: edda@servidor.unam.mx

Table 1. Experiences in vaccination against *Taenia solium* pig Cysticercosis

Source of Antigens+ adjuvant	Protection Level (% reduction)		Challenge (per pig)	Reference
	In number of pigs	In parasites quantity		
<i>T. solium</i> excretory-secretory antigens + FCA		95 %	Experimental	[30]
<i>T. solium</i> cysticerci extract		74 %	Field trial	[9]
<i>T. saginata asiatica</i> (Indonesian) frozen oncospheres + FCA	100 %	98 - 99%	Experimental	[31]
<i>T. saginata asiatica</i> (Taiwan) frozen oncospheres + FCA	66 %	99 %	Experimental	[31]
<i>T. solium</i> frozen oncospheres + FCA	100 %	99 - 100%	Experimental	[31]
<i>T. crassiceps</i> extract + FCA		50 %	Experimental	[32]
<i>T. solium</i> cysticerci extract	100%		Field trial	[33]
<i>T. solium</i> cysticerci extract	82%		Field trial	[34]
<i>T. solium</i> scolex extract + FIA		71%	Experimental	[35]
<i>T. solium</i> scolex extract + <i>Corynebacterium parvum</i>		75 %	Experimental	[35]
Three synthetic <i>T. crassiceps</i> peptides + S		98 %	Field trial	[36]
Three synthetic <i>T. crassiceps</i> peptides + S	70-80 %		Field trial	[37]
TSO18-GST + Quil A		100 %	Experimental	[38]
TSOL45-1A-GST + Quil A		0 %	Experimental	[38]
TSO18-GST + TSOL45-1A-GST + Quil A		95 %	Experimental	[38]
TSO18-GST + Quil A		99 %	Experimental	[38]
TSOL45-1A-GST + Quil A		97 %	Experimental	[38]
TSO18-GST + Quil A		99.9 %	Experimental	[39]
TSOL45-1A-GST+ Quil A		97 %	Experimental	[39]
<i>T. crassiceps</i> 56+66+74kDa proteins + FCA		97 %	Experimental	[40]
		86 %		
Recombinant phage (KETc1+KETc7+KETc12+GK1)		97 %	Experimental	[41]
		95 %		
Recombinant phage (KETc1+KETc7+KETc12+GK1)		89 %	Experimental	[41]
		42 %		

have been proven as vaccines (Table 1) [9, 30-41] and shown to reduce the rate of infection and the parasite load in vaccinated pigs challenged with *T. solium* eggs under experimental conditions [30-32, 35, 38-41]. Different vaccine candidates are also tested against *T. solium* pig cysticercosis using DNA vaccination (Table 2) [42-46].

In Mexico, the first report of effective vaccination against porcine cysticercosis was based on a total extract of cysticercal antigens from *T. solium* cysticerci drawn out from naturally infected pigs [9]. Further investigations have searched to identify, isolate and produce the antigens responsible for the immunological protection, to eliminate irrelevant and potentially parasite facilitating compounds [47], as well as to stabilize and standardize the immunogenic activity. The distribution of the vaccine antigens among the

regional or world population of all taenia specimens is not known with any precision. What is well known is that there are numerous antigens common to different species of taenias and even among other cestodes [6, 48, 49], as it occurs with the antigens used in immunodiagnosis [48, 50, 51]. Considering the genetic differences reported among cysticerci recovered from pigs of different regions of Mexico and other countries of the world [52, 53], common antigens are of great interest for vaccine design because they imply that a single vaccine could possibly prevent a wide spectrum of cestode diseases.

Among the vaccine candidates against *T. solium* are those originally identified of interest for the prevention of other diseases caused by cestodes closely related to *T. solium*, like *T. ovis* and *T. saginata* [6, 54]. It has been demonstrated the

Table 2. Experimental Experiences in DNA Vaccination Against *Taenia solium* Pig Cysticercosis

Source of antigen+ adjuvant	Protection Level (%)		Challenge	Reference
	In number of pigs	In parasite quantity		
<i>T. solium</i> B + PV93		85-99%	Experimental	[42]
cC1 + pcDNA3		73 %	Experimental	[43]
pVAX-S-del $\alpha$ C-3 $\alpha$ hepatitis B core antigen particle + S1Pvac + IL2 signal peptide		83 %	Experimental	[44]
pcDNA3-cC1 + (GST-cC1 + FIA)		Challenged (weeks after vaccination)	Experimental	[45]
		6 wk, 85 %		
		12 wk, 77 %		
		20 wk, 72 -79 %		
pcDNA3-B <i>T. solium</i> : antigen B + pcDNA3.1	80%	92.6%	Experimental	[46]

high protective capacity of three *T. ovis* recombinant antigens (45WB/X-GST, 16K-GST and 18K-GST) evaluated in experimental porcine cysticercosis [38, 54, 55]. The HP6 antigen, originally isolated from *Taenia saginata* [56, 57], that induced high levels of protection against cysticercosis in cows, has been found present in *T. solium* cysticerci [6] and shown to protect against murine cysticercosis by *Taenia crassiceps* [58]. KETc1, KETc12 and KETc7 peptides, originally isolated from *Taenia crassiceps*, were later identified in *T. solium* [59, 60]. Furthermore, as it shown in Table 3 it proved to be protective against *T. solium* porcine cysticercosis in natural conditions of transmission [36, 37]. The protective capacities of these peptides were also reported against experimental *T. solium* cysticercosis expressed as a modified hepatitis B virus core [44]. Considering the high protective capacity of the *T. ovis* recombinant antigens of 18 and 45 kDa [54], the corresponding TSOL18 and TSOL45-1A were isolated from *T. solium* and proved more efficient against experimental infection in pigs [38, 39]. Additional homologous recombinant antigens have confirmed the protective capacity of antigen B against experimental *T. solium* porcine cysticercosis [46], as previously reported against murine *T. crassiceps* [61]. A new recombinant protein, namely cC1, also induces high level of protection against pig cysticercosis, when administered as a DNA vaccine [45, 46].

#### THE IMPORTANCE OF TESTING THE VACCINE'S EFFICIENCY AGAINST THE REAL THREAT POSED BY THE NATURAL ENVIRONMENTAL CONDITIONS OF TRANSMISSION

For an antigen be upgraded from "vaccine candidate" to the status of "vaccine" it is necessary to demonstrate its effectiveness in preventing the disease in a large and varied populations of the real hosts under risk, challenged in the uncontrollable multiple combinations nature can provide and living in their natural environment and peculiar styles of life. It is convenient but does not suffice that the antigen is effective in highly controlled experimental conditions, which usually employ a small number of pigs, all of the same breed, age and gender, healthy and well nourished,

experimentally challenged only once with eggs originating from the same taenia, and let to establish for a short time after their administration. The realistic conditions in the field differ enormously from those experimental and imply great differences in the chances of infection, on time left for the cysticercus to develop and of adequate immune reaction by the infected pig. In the field, pigs are genetically extremely heterogeneous, besides being malnourished, stressed and exposed to other diseases and to mistaken official programs of obligatory vaccination against other infections. They are also probably exposed to ingest taenia eggs in multiple occasions in variable amounts, probably from different taenias, and let to live for about a year before being inspected for cysticercosis. Clearly a group of circumstances that are impossible to be experimentally reproduced and are likely to be related to the effectiveness of the immune system response in a changing and threatening environment.

#### FIELD TRIAL DESIGN

It is then essential to realistically design the field trial with which the effectiveness of a vaccine is to be evaluated. The issues to be considered are numerous: 1) the area or village selected should be previously shown to have a porcine cysticercosis prevalence level of about 10% to be measurable with some accuracy and cost-effectively; 2) age of pigs to be included in the trial (i.e., at 2 months its minimal the risk of infection previous to vaccination but the piglet is old enough to be immunocompetent [62]; 3) the genetic composition of the host population to be vaccinated is suspected to generate differences in the effectiveness of vaccination [63]; 4) biological circumstances that may possibly modify the efficiency of vaccination, such as sex, castration and pregnancy, are associated to an increase in susceptibility to infection [64, 65] the regime of pig upbringing (there are remarkable differences in risk to infection among confined, half-confined and wandering pigs [64, 65]; different number and sizes of challenge [66].

All the above mentioned variables should be duly balanced in the making of the groups of pigs included in the field trial - as vaccinated and non-vaccinated pigs. The

Table 3. Protective Capacity of the S3Pvac in the Two Different Field-Trials Performed in Mexico

Communities (state)	Number of pigs	Level of protection (%)		References
		Pigs totally protected	Reduction in parasite load	
Huatlatleuca, Tepezapintla, Puebla	240	50% <sup>†</sup>	97% (66565/1364)*	[36]
Cuentepec, Morelos	166	70% <sup>†*</sup>	100% (29/0)**	[37]

<sup>†</sup>Percent of pigs bearing zero cysticerci by necropsy. <sup>††</sup>Percent of non-cysticercotic pigs by tongue inspection. \*Total number of cysticerci recovered in 120 controls and 120 vaccinated pigs \*\*and in 20 controls and 20 vaccinated pigs

critical response variables to evaluate are: a) the difference of cysticercosis prevalence in vaccinated pigs and non-vaccinated adjuvant injected, pigs; b) the difference in the number of parasites found in vaccinated and non-vaccinated pigs; c) the physiological state of the cysticerci found (live, degenerate, calcified). A third group of pigs is recommended to be included in the field trial, the sentinel pigs, to act as of control to, and validate, the whole trial. Because of the unique cultural conditions usually prevalent in endemic villages and regions, pigs known to been included in the trial (those injected with vaccine or adjuvant) may be cared-for differently from the usual forms by their owners, be sold quicker at higher prices, or consumed more eagerly, all frequently resulting in a large number of missing pigs in the included groups. The sentinel pigs' prevalence levels and parasite loads then save the day: they test the assumption of active transmission in the selected area at the time of the trial and may serve as an additional contrast for the vaccinated group. Unfortunately, tongue inspection for pig cysticercosis although quite sensitive and cost/effective it misses a good many of truly cysticercotic pigs with low parasite loads [67-70]. Thus, if possible, tongue inspection should be carried out several times during the trial (to spot those pigs that got infected but apparently solved the infection) and, at the end of the trial, usually after 12 months of age or at least 4 months postvaccination. As many of the included pigs as possible should also be thoroughly examined post-mortem in order to strengthen the credibility of tongue inspection by correlative analysis.

The necropsies, which examine microscopically the totality of muscle masses from each pig, dissected centimeter by centimeter, with microscopic corroboration, provide of course the most precise estimates of the prevalence in each group, of the parasite load and of the integrity of the parasites in each pig. However, these studies cannot be carried out in a large number (say hundreds) of pigs. Besides it is not practicable to improvise a morgue in the rural spot and when the owners of the pigs decide to sacrifice them. Tongue inspection in live pigs, looking for the subepithelial cysticercus, even though it is not a simple intervention, it is more feasible to effect and program in large numbers of pigs than complete necropsies. The main limitant of tongue inspection is that it underestimates the prevalence and little or nothing reveals of the parasite load [67-69]. On the other hand, serology based on the antibody detection, could be of use in experimental controlled conditions but in real life it only provides evidence of contact but not necessarily of

infection. As for antigen detection many naturally infected pigs carry only a few parasites [21, 67] and it's doubtful that presently developed technology can detect their circulating antigens [71] or can be overpowered by circulating antibodies [71]. The identification of porcine cysticercosis by the detection of *T. solium* antibodies is further made difficult because of the many cross-reactions between related cestodes that the free ranging pigs of endemic countries encounter in their hazardous lifestyle (i.e., *Echinococcus spp*) [48]. In addition, pigs living in endemic areas are highly exposed to the parasite and consequently many of them exhibit high levels of antibodies in the absence of any parasite detected by necropsy [69].

#### THE S3PVAC VACCINE AND IT EFFICACY IN NATURAL CONDITIONS OF TRANSMISSION

Only one of the candidates to the porcine anti-cysticercosis vaccine has been critically assessed in the realistic conditions of the disease naturally acquired by rustic pigs in highly endemic rural locations of Mexico. This vaccine is constituted by 3 peptides synthetically produced (S3Pvac), and is owned by the National Autonomous University of Mexico. Its production, distribution and availability in the market is planned to be ready in the near future with the participation of Laboratorios Silanes, a national laboratory.

The three protective peptides in S3Pvac are named KETc12, KETc1 and GK1. They are composed by 8, 13 and 18 amino acids respectively. They were first identified by their protective capacity against experimental murine *T. crassiceps* cysticercosis in mice [40]. The peptides' sequences belong to native antigens that are present in the different developmental stages of the homologous parasite and of *T. solium* in different anatomical structures. S3Pvac was tested in the field in communities of the State of Puebla [36]. Vaccination reduced 50% the number of infected pigs and 98% the amount of cysticerci and, therefore, the amount of cysticerci potentially able to transform into taenias. Upon reevaluation in a different community of the State of Morelos similar results were obtained [37]. Thus, the effectiveness of S3Pvac in preventing naturally acquired porcine cysticercosis has been demonstrated.

S3Pvac is also suspected to have therapeutic properties in early infections [23]. Immunization with S3Pvac of pigs experimentally infected decreased from 94 to 38% the percentage of vesicular cysticerci, and 95 to 100% of the parasites in 4 of the 5 treated pigs were found calcified

Table 4. Therapeutic Effect of the S3Pvac on the Number and the Viability of Cysticerci Recovered from Pigs Infected with *Taenia solium*

Status of the infected pigs	Calcified cysticerci (%)	*Evagination (%)	**Tapeworms transformation (%)
Saponine	6.41 % (59/1039)	70 %	58 %
S3Pvac+Saponine	61.1 % (344/563)	38 %	19 %

5 piglets per group were orally infected with 20,000 of *T. solium* eggs and 1 month later treated with saponine (control) or S3Pvac, three times each at a 30-day interval. Four months after the last immunization animals were euthanized and the total number of cysticerci found in half of the carcass, plus heart, diaphragm and brain and their macroscopical aspect were recorded. In vitro evagination capacity from a total of 269 (controls) and 50 (S3Pvac) cysticerci sampled. In vivo transformation of cysticerci to tapeworms in immunodepressed hamsters orally infected with 5 cysticerci each in a total of 20 (control pigs) and 10 (S3Pvac) hamsters [23].

(Table 4). The possible therapeutic activity S3Pvac would add interest to its use in the control of teniasis/cysticercosis.

Much remains to be explored in the mechanisms of protection induced by vaccination. Most of the studies have focused on the evaluation of the antibody response induced and much less have been explored in their ability to damage the parasite [72]. Vaccines can also stimulate a specific cellular proliferative response with the production of inflammatory cytokines that could participate in controlling the installation as well as the development of the parasite [72]. However, the relevance of components of the cellular immunity in the resistant mediated by vaccination are even more scarcely explored, with a couple of exceptions [41, 72].

#### ALTERNATIVES FOR THE PRODUCTION OF A VACCINE FOR MASSIVE APPLICATION

Once the protective capacity of an immunogen in natural conditions of transmission is evaluated, the feasibility of its production and usage is the next and formidable obstacle indeed. The controlled production of total antigens purified from the parasite presents serious difficulties in reproducibility because of the differences among parasite lots and by their irregular availability. On the other hand, the recombinant and synthetic antigens can be systematically produced in controlled conditions and mass produced. Several vaccine candidates recombinantly produced have been identified (Table 1). S3Pvac has been recombinantly expressed using for antigen delivery filamentous phages [41] and transgenic plants [73]. Both systems clearly enhance the first synthetic version of the vaccine because both delivery systems increase its efficiency and greatly reduce production costs. The filamentous phages, which are administered by systemic or oral intake, have demonstrated to be highly effective against porcine cysticercosis at least in experimental conditions of evaluation [41] and are being tested in the field. There is also evidence of orally induced effective protection against experimental murine cysticercosis by S3Pvac recombinantly bound to the polymeric Lumazine synthase protein from *Brucella spp.* [74, 75] and by S3Pvac transgenic papaya clones [73]. Some efforts have been also done in experimental models as well against pig cysticercosis, albeit under experimental conditions using DNA vaccination, with successfully results [42-46, 61, 76-78]. However the requirement for DNA of high quality for genetic immunization limits nowadays its extensive usefulness. The use of adjuvants and/or novel forms of delivery to improve the immunogenicity of the vaccines are being explored for many purposes and are barely considered in

anti-cysticercosis vaccines. Thus, these possibilities can offer new formulations to improve efficiency and reduce vaccination costs.

The logistics and costs of vaccine administration to free ranging pigs in wide and variable penetrable country are immense and impractical if the vaccine is to be injected. The ideal vaccine must be of very low unit cost; it must be fed to the pigs and must be easily delivered to the pigs by their owners. This combination of the anticysticercosis vaccine for pigs is the only one that meets with the required cost-effectiveness and feasibility posed by naturally acquired porcine cysticercosis in poor endemic countries. Nobody has yet climbed that peak.

The application of a vaccine requires of the approval of the biological product by sanitary authorities, as well as the observance of the requirements of innocuousness. In this respect, albeit many experimental vaccines against cysticercosis are available in the literature, none of them have been approved for use.

#### IMMUNITY AND VACCINATION

While different vaccine candidates have been successfully reported and their antiparasite immunity assessed much of their mechanisms remain obscure or unexplored. Immunization with many of these proteins induces specific, complement-fixing antibodies against the total, purified, recombinant or synthetic antigens that are believed to be associated with vaccine-induced protection against *T. solium* infection. It has been argued that vaccine-Abs may destroy *T. solium* oncospheres by fixing complement [55, 79] but the vulnerability of these early larval phases of the parasite has not been explored yet. Later on, it was observed that vaccination of mice and pigs with a parasite epitope (GK1) induces the synthesis of antibodies that are capable of interfering with the cysticerci transformation into tapeworms in the intestines of hamsters [72, 80]. It is argued that an exacerbated inflammatory response may also damage the larval stage of the parasite and/or interfere with the establishment of the cysticerci. However, up to date only the increased specific pro-inflammatory cytokines have been studied in the case of S3Pvac [41, 72], but their relevance in parasite establishment and/or destruction has not been explored.

#### POSSIBILITIES OF VACCINATION AGAINST CYSTICERCOSIS IN HUMANS

There is evidence hinting to the possibilities of vaccination against human neuro-cysticercosis (NC), particularly

against its severe forms. Among the hints is the very low frequency of symptomatic neurocysticercosis present in endemic communities, and even where 9 to 10% of the population has clinically silent neurocysticercosis [17-19], and over 90% of them show immunological traces compatible with previous contacts with parasite's antigens [27]. These observations suggest that the contact with the parasite may generate a degree or type of immunity capable of protecting the individual against severe symptomatic forms of NC.

#### TOWARDS A MULTIEPITOPE VACCINE AGAINST CESTODIASIS

*T. solium*, *Taenia saginata* and *Echinococcus* are of the greatest medical and veterinary importance [81-84]. The extensive similarities in their natural history, pathology, and antigenic composition among cestodes [48, 85, 86] often permit the use of protective antigens for one species to be applied to a different one [10, 32, 54, 58]. These inter-species shared antigens offer a common target of interest for vaccine design.

#### PREVENTION OF INTESTINAL TAENIASIS AND CYSTICERCOSIS BY VACCINATION

Many antigens are also shared among the different stages of cestodes (i.e. eggs, cysticerci, tapeworms) [59, 60, 87, 88]. Some of these antigens are being considered to develop multipurpose vaccine to prevent both cysticercosis and the tapeworm intestinal infection [89].

#### CAN CYSTICERCOSIS BE ERADICABLE?

In spite of the prevailing optimism in technology resolving many a disease [90], it is advisable to consider that cysticercosis is transmitted by a complex network of biological, historical, cultural, economical factors and, then, realize that its control may require of at least as complex an approach as that of the parasite to survive in modern times [64].

*Taenia solium* cysticercosis has been theoretically considered easy to control and has been declared to be an eradicable disease [91-95]. Optimism prevails based on the important advances in its diagnosis [96], the effectiveness of anti-cysticidal treatment [97, 98] and the high protective capacity of many vaccine candidates reported (Table 1 and 2). Unfortunately, such optimism is unwarranted [99]. The eradication of *Taenia solium* will likely remain as a major challenge for many years in underdeveloped countries, where the parasite's life-cycle is firmly established in complex social, cultural, political and economic contexts [64]. Some success has been obtained by control programs focused in rural villages and aimed to locally improve health education and treatment of some tapeworm carriers [90, 97, 100-106]. Unfortunately, experience shows that these actions are insufficient to achieve wide and long-term control due to the complex social and biological networks that underlie cestode transmission, which rapidly re-establish the infection after such transient interventions in minute sites [37, 100]. The more so, if the prevention programs continue to disregard the growing and massive migration of rural peoples, together with their parasites, into urban areas of

endemic and non-endemic countries [107, 108] and then back, thus escaping control, spreading the disease to naïve sites and reinstalling parasite transmission upon their return to their rural towns of origin (Larraide and Sciutto, 2005; <http://www-lab.biomedicas.unam.mx/cistimex/>). Besides the above, health authorities of endemic countries have their hands full and their burses emptied with the many other diseases that affect their populations to even think of investing to prevent ancient diseases that mostly embarrass them. So, notwithstanding the potential use of cost-effective technology, *T. solium* will not yield until the affected civil societies of endemic countries upgrade their will to live healthy and act strongly upon their infection prone behaviors and environmental conditions. "The pigs are not the culprits; it's the humans" (Aline S. de Aluja).

#### REFERENCES

- [1] Pathak, C.G. and Kuhn R.J. Development of novel antivirals against flaviviruses *Novartis Found Symp.* 2006, 277, 41-52.
- [2] Okada M. Novel vaccines against *M. tuberculosis*. *Kekkaku* 2006, 81(12), 745-51.
- [3] Joseph, J., Saubi, N., Pezzat, E. and Gatell, J.M. Progress towards an HIV vaccine based on recombinant bacillus Calmette-Guérin: failures and challenges. *Expert Rev. Vaccines* 2006, 5(6), 827-38.
- [4] Teitelin, H., Medini, D., Donati, C. and Masignani, V. Towards a universal group B *Streptococcus* vaccine using multistain genome analysis. *Expert Rev. Vaccines* 2006, 5(5), 687-94.
- [5] Tongren, J. E.; Zavala, F.; Roos, D. S.; and Riley, E. M. Malaria vaccines: if at first you don't succeed. *Trends Parasitol* 2004, 20, 604-10.
- [6] Harrison, L.J.; Garate, T.; Bryce, D. M.; Gonzalez, L. M.; Foster-Cuevas, M.; Wamae, L. W.; Onyango-Abuye, J. A. and Parkhouse, R. M. Ag-ELISA and PCR for monitoring the vaccination of cattle against *Taenia saginata* cysticercosis using an oncosphere adhesion protein (HP6) with surface and secreted localization. *Trop. Anim. Health Prod.* 2005, 37, 103-20.
- [7] Johnson, K.S.; Harrison, G.B.; Lightowers, M. W.; O'Hoy, K. L.; Cogle, W. G.; Dempster, R. P.; Lawrence, S. B.; Vunou, J. G.; Heath, D. D. and Rickard, M. D. Vaccination against ovine cysticercosis using a defined recombinant antigen. *Nature* 1989, 338, 585-7.
- [8] Kwa, B. H. and Liew, F.Y. Immunity in taeniasis-cysticercosis: Vaccination against *Taenia taeniarformis* in rats using purified antigen. *J. Exp. Med.* 1977, 146, 118-31.
- [9] Molinari, J. L.; Meza, R.; Suarez, B.; Palacios, S.; Tato, P. and Retana, A. *Taenia solium* immunity in hogs to the Cysticercus. *Exp. Parasitol.* 1983, 55, 340-57.
- [10] Sciutto, E.; Fragoso, G.; Trueba, L.; Lemus, D.; Montoya, R. M.; Diaz, M. L.; Govezensky, T.; Lomeli, C.; Tapia, G. and Larraide, C. Cysticercosis vaccine: cross protecting immunity with *T. solium* antigens against experimental murine *T. crassiceps* cysticercosis. *Parasite Immunol.* 1990, 12, 687-96.
- [11] Restrepo, B.I.; Laguno, P.; Sandoval, M.A.; Enciso, J.A. and Teale, J.M. Analysis of immune lesions in neurocysticercosis patients: central nervous system response to helminth appears Th1-like instead of Th2. *J. Neuroimmunol.* 1998, 89(1-2), 64-72.
- [12] Restrepo, B. I.; Alvarez, J. I.; Castano, J. A.; Arias, L. F.; Restrepo, M.; Trujillo, J.; Colegial, C. H. and Teale, J. M. Brain granulomas in neurocysticercosis patients are associated with a Th1 and Th2 profile. *Infect. Immun.* 2001b, 69, 4554-60.
- [13] Aluja A. and Vargas G. The Histopathology of Porcine Cysticercosis. *Vet. Parasitol.* 1988, 28, 65-77 65
- [14] Londono, D.P.; Alvarez, J.I.; Trujillo, J.; Jaramilla, M.M. and Restrepo, B.I. The inflammatory cell infiltrates in porcine cysticercosis: immunohistochemical analysis during various stages of infection. *Vet. Parasitol.* 2002, 109(3-4), 249-59
- [15] Alvarez, J.I.; Colegial, C.H.; Castano, C.A.; Trujillo, J.; Teale, J.M. and Restrepo, B.I. The human nervous tissue in proximity to granulomatous lesions induced by *Taenia solium* metacestodes displays an active response. *J. Neuroimmunol.* 2002, 127(1-2), 139-44.

- [16] Senzun, F.; Osorio, A.M.; Morales, J.P.; Isaacs, R.; Cerdona, E.; Moncayo, L.C.; Villota, G.E.; Zapata, O.T.; Palacio, C.A.; Arbelaez, M.P. and Restrepo, B.I. Serological screening for cysticercosis in mentally altered individuals. *Trop. Med. Int. Health* 2002, 7(6), 532-8.
- [17] Sanchez, A.L.; Lindback, J.; Schantz, P.M.; Sone, M.; Sakai, H.; Medina, M.T. and Ljungstrom, I. A population-based, case-control study of *Taenia solium* taeniasis and cysticercosis. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 1999, 93(3), 247-58.
- [18] Fleury, A.; Gomez, T.; Alvarez, I.; Meza, D.; Huerta, M.; Chavarria, A.; Carrillo-Mezo, R. A.; Lloyd, C.; Dessen, A.; Preux, P. M.; Dumas, M.; Larralde, C.; Sciutto, E. and Fragoso, G. High prevalence of calcified silent neurocysticercosis in a rural village of Mexico. *Neuroepidemiology* 2003, 22, 139-45.
- [19] Fleury, A.; Morales, J.; Dobes, R.J.; Dumas, M.; Yanez, O.; Pina, J.; Carrillo-Mezo, R.; Martinez, J.J.; Fragoso, G.; Dessen, A.; Larralde, C. and Sciutto, E. An epidemiological study of familial neurocysticercosis in an endemic Mexican community. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2006, 100(6), 551-8.
- [20] Saenz, B.; Ruiz-Garcia, M.; Jimenez, E.; Hernandez-Aguilar, J.; Saastegui, R.; Larralde, C.; Sciutto, E. and Fleury, A. Neurocysticercosis: clinical, radiologic, and inflammatory differences between children and adults. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2006, 25, 801-803.
- [21] Aluja, A.S.; Villalobos, A.N.; Plancarte, A.; Rodarte, L.F.; Hernandez, M. and Sciutto, E. Experimental *Taenia solium* cysticercosis in pigs: characteristics of the infection and antibody response. *Vet. Parasitol.* 1996, 61(1-2), 49-59.
- [22] Aluja, A. S.; Villalobos, A. N.; Plancarte, A.; Rodarte, L. F.; Hernandez, M.; Zamora, C. and Sciutto, E. *Taenia solium* cysticercosis: immunity in pigs induced by primary infection. *Vet. Parasitol.* 1999, 81, 129-35.
- [23] Aluja, A. S.; Villalobos, N.; Nava, G.; Toledo, A.; Martinez, J. J.; Plancarte, A.; Rodarte, L. F.; Fragoso, G. and Sciutto, E. Therapeutic capacity of the synthetic peptide-based vaccine against *Taenia solium* cysticercosis in pigs. *Vaccine* 2005, 23, 4062-9.
- [24] Pescovitz, M. D.; Lunzey, J. K. and Sachs, D. H. Murine anti-swine T4 and T8 monoclonal antibodies: distribution and effects on proliferative and cytotoxic T cells. *J. Immunol.* 1988, 134, 37-44.
- [25] Saalmuller, A.; Reddehase, M. J.; Buhning, H. J.; Jenjic, S. and Koszinowski, U. H. Simultaneous expression of CD4 and CD8 antigens by a substantial proportion of resting porcine T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 1987, 17, 1297-301.
- [26] Yang, H. and Parkhouse, R. M. Phenotypic classification of porcine lymphocyte subpopulations in blood and lymphoid tissues. *Immunology* 1996, 89, 76-83.
- [27] Chavarria, A.; Roger, B.; Fragoso, G.; Tapia, G.; Fleury, A.; Dumas, M.; Dessen, A.; Larralde, C. and Sciutto, E. TH2 profile in asymptomatic *Taenia solium* human neurocysticercosis. *Microbes Infect.* 2003, 5, 1109-15.
- [28] Chavarria, A.; Fleury, A.; Bobes, R.J.; Morales, J.; Fragoso, G. and Sciutto, E. A depressed peripheral cellular immune response is related to symptomatic neurocysticercosis. *Microbes Infect.* 2006, 8(4), 1082-9.
- [29] Bueno, E.C.; Vaz, A.J.; Machado, L.R.; Livramento, J.A.; Avila, S.L. and Ferreira, A.W. Antigen-specific suppression of cultured lymphocytes from patients with neurocysticercosis. *Clin. Exp. Immunol.* 2001, 126(2), 304-10.
- [30] Pathak, K. M. and Gaur, S. N. Immunization of pigs with culture antigens of *Taenia solium*. *Vet. Parasitol.* 1990, 34, 353-6.
- [31] Fan, P. C.; Chung, W. C.; Lin, C. Y. and Wu, C. C. Vaccination trials against *Taenia solium* eggs in pigs injected with frozen oncospheres of *T. solium* or *Taenia saginata asiatica*. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 2003, 36, 96-100.
- [32] Sciutto, E.; Aluja, A.; Fragoso, G.; Rodarte, L. F.; Hernandez, M.; Villalobos, M. N.; Padilla, A.; Keilbach, N.; Baca, M.; Govezensky, T.; Govezensky, T.; Diaz, S. and Larralde, C. Immunization of pigs against *Taenia solium* cysticercosis: factors related to effective protection. *Vet. Parasitol.* 1995, 60, 53-67.
- [33] Molinari, J. L.; Soto, R.; Tato, P.; Rodriguez, D.; Retana, A.; Sepulveda, J. and Pulet, A. Immunization against porcine cysticercosis in an endemic area in Mexico: a field and laboratory study. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1993, 49, 502-12.
- [34] Molinari, J. L.; Rodriguez, D.; Tato, P.; Soto, R.; Arechavaleta, F. and Solano, S. Field trial for reducing porcine *Taenia solium* cysticercosis in Mexico by systematic vaccination of pigs. *Vet. Parasitol.* 1997, 69, 55-63.
- [35] Nascimento, E.; Costa, J. O.; Guimaraes, M. P. and Tavarca, C. A. Effective immune protection of pigs against cysticercosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1998, 45, 127-37.
- [36] 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, O.; Martinez, J. J.; Larralde, C. and Sciutto, E. Synthetic peptide vaccine against *Taenia solium* pig cysticercosis: successful vaccination in a controlled field trial in rural Mexico. *Vaccine* 2001, 20, 262-6.
- [37] Sciutto, E.; Morales, J.; Martinez, J.J.; Toledo, A.; Villalobos, M.N.; Cruz-Revilla, C.; Meneses, G.; Hernandez, M.; Diaz, A.; Rodarte, L.F.; Acero, G.; Gevorkian, G.; Manoucharian, K.; Paniagua, J.; Fragoso, G.; Fleury, A.; Larralde, R. De. Aluja, A. S. and Larralde, C. Further evaluation of the synthetic peptide vaccine S3Pvac against *Taenia solium* cysticercosis in pigs in an endemic town of Mexico. *Parasitology* 2007, 137(Pt 1), 129-33.
- [38] Flisser, A.; Gaudi, 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 Lightowers, M. W. Induction of protection against porcine cysticercosis by vaccination with recombinant oncosphere antigens. *Infect. Immun.* 2004, 72, 5292-7.
- [39] Gonzalez, A.E.; Giluci, C.G.; Barber, D.; Gilman, R.H.; Tsang, V.C.; Garcia, H.H.; Verastegui, M. and Lightowers, M.W. Vaccination of pigs to control human neurocysticercosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2005, 72(6), 837-9.
- [40] Manoucharian, K.; Rosas, G.; Hernandez, M.; Fragoso, G.; Aluja, A.; Villalobos, N.; Rodarte, L. F. and Sciutto, E. Cysticercosis: identification and cloning of protective recombinant antigens. *J. Parasitol.* 1996, 82, 250-4.
- [41] Manoucharian, K.; Diaz-Orea, A.; Gevorkian, G.; Fragoso, G.; Acero, G.; Gonzalez, E.; De Aluja, A.; Villalobos, N.; Gomez-Conde, E. and Sciutto, E. Recombinant bacteriophage-based multipitope vaccine against *Taenia solium* pig cysticercosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2004, 99, 11-24.
- [42] Cai, X.; Chal, Z.; Jing, Z.; Wang, P.; Luo, X.; Chen, J.; Dou, Y.; Feng, S.; Su, C. and Jin, J. Studies on the development of DNA vaccine against *Cysticercus cellulosa* infection and its efficacy. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 2001, 32 Suppl. 2, 105-10.
- [43] Wang, Q. M.; Sun, S. H.; Hu, Z. L.; Wu, D.; Wang, Z. C. Immune response and protection elicited by DNA immunization against *Taenia cysticercosis*. *Vaccine* 2003, 21, 1672-80.
- [44] Wu, L.; Diao, Z.; Deng, X.; Guo, J.; Zhou, Z.; Liu, Y.; Wung, Y. DNA vaccine against *Taenia solium* cysticercosis expressed as a modified hepatitis B virus core particle containing three epitopes shared by *Taenia crassiceps* and *Taenia solium*. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2005, 5, 1204-10.
- [45] 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.; Zhu, W. J. Protection of pigs against *Taenia solium* cysticercosis using recombinant antigen or in combination with DNA vaccine. *Vaccine* 2004, 22, 3841-7.
- [46] Guo, A.; Jin, Z.; Zhang, Y.; Hai, G.; Yuan, G.; Li, H. Induction of protection against porcine cysticercosis in growing pigs by DNA vaccination. *Vaccine* 2007, 25, 170-5.
- [47] Valdez F, Hernandez M, Govezensky T, Fragoso G, Sciutto E. Immunization against *Taenia crassiceps* cysticercosis: identification of the most promising antigens in the induction of protective immunity. *J. Parasitol.* 1994, 80(6), 931-6.
- [48] Larralde, C.; Montoya, R. M.; Sciutto, E.; Diaz, M. L.; Govezensky, T.; Corti, E. 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.* 1989, 40, 282-90.
- [49] Cruz-Rivera M, Reyes-Torres A, Reynoso-Ducuing O, Flisser A, Ambrosio JR. Comparison of biochemical and immunochemical properties of myosin II in taeniid parasites. *Cell Biol. Int.* 2006, 30(7), 598-602.
- [50] Arruda GC, da Silva AD, Quagliato EM, Marchi MA, Rossi CL. Evaluation of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* cysticercal antigens for the serodiagnosis of neurocysticercosis. *Trop. Med. Int. Health* 2005, 10(10), 1005-12.



- [51] Espindola, N. M.; Iha, A. H.; Vaz, A. J.; Fernandez, I.; Takayanagi, O. M.; Machado, L. R.; Livramento, J. A.; Masa, A. M.; Peralta, J. M. Cysticercosis immunodiagnosis using 18- and 14-kilodalton proteins from *Taenia crassiceps* cysticercus antigens obtained by immunoaffinity chromatography. *J. Clin. Microbiol.* 2005, **43**, 3178-84.
- [52] Maruyilla, P.; Souza, V.; Valera, A.; Romero-Valdovinos, M.; Lopez-Vidal, Y.; Dominguez-Alpizar, J. L.; Ambrosio, J.; Kawa, S.; Flisser, A. Detection of genetic variation in *Taenia solium*. *J. Parasitol.* 2003, **89**, 1250-4.
- [53] Vega, R.; Pintero, D.; Ramenankandrisana, B.; Dumas, M.; Bouteille, B.; Fleury, A.; Sciutto, E.; Larralde, C.; Frago, G. Population genetic structure of *Taenia solium* from Madagascar and Mexico: implications for clinical profile diversity and immunological technology. *Int. J. Parasitol.* 2003, **33**, 1479-85.
- [54] Plancarte, A.; Flisser, A.; Gauci, C. G.; Lightowers, M. W. Vaccination against *Taenia solium* cysticercosis in pigs using native and recombinant oncosphere antigens. *Int. J. Parasitol.* 1999, **29**, 643-7.
- [55] Kyngdon CF, Gauci CG, Rolfe RA, Velasquez Guzman JC, Farfan Salazar MJ, Verastegui Pimentel MR, Gonzalez AF, Garcia HH, Gilman RH, Strugnell RA, Lightowers MW. *In vitro* oncosphere-killing assays to determine immunity to the larvae of *Taenia pisiformis*, *Taenia ovis*, *Taenia saginata*, and *Taenia solium*. *J. Parasitol.* 2006, **92**(2), 273-81.
- [56] Bonay P, Gonzalez LM, Benitez L, Foster M, Harrison LJ, Parkhouse RM, Garite T. Genomic and functional characterization of a secreted antigen of *Taenia saginata* ocospheres. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2002, **121**(2), 269-73.
- [57] Lightowers, M. W.; Rolfe, R.; Gauci, C.G. *Taenia saginata* vaccination against cysticercosis in cattle with recombinant oncosphere antigens. *Exp. Parasitol.* 1996, **84**, 330-8.
- [58] Rosas, G.; Frago, G.; Garite, T.; Hernandez, B.; Ferrero, P.; Foster-Cuevas, M.; Parkhouse, R. M.; Harrison, L. J.; Briones, S. L.; Gonzalez, L. M.; Sciutto, E. Protective immunity against *Taenia crassiceps* murine cysticercosis induced by DNA vaccination with a *Taenia saginata* tegument antigen. *Microbes Infect.* 2002, **4**, 1417-26.
- [59] Toledo, A.; Frago, G.; Rosas, G.; Hernandez, M.; Gevorkian, G.; Lopez-Casillas, F.; Hernandez, B.; Acero, G.; Huerta, M.; Larralde, C.; Sciutto, E. Two epitopes shared by *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* confer protection against murine *T. crassiceps* cysticercosis along with a prominent T1 response. *Infect. Immun.* 2001, **69**, 1766-73.
- [60] Toledo, A.; Larralde, C.; Frago, G.; Gevorkian, G.; Manoutchian, K.; Hernandez, M.; Acero, G.; Rosas, G.; Lopez-Casillas, F.; Garfias, C. K.; Vazquez, R.; Terrazas, I.; Sciutto, E. Towards a *Taenia solium* cysticercosis vaccine: an epitope shared by *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* protects mice against experimental cysticercosis. *Infect. Immun.* 1999, **67**, 2522-30.
- [61] Solis, C. F.; Ostoa-Saloma, P.; Lugo-Martinez, V. H.; Johnston, S. A.; Laclette, J. P. Genetic vaccination against murine cysticercosis by using a plasmid vector carrying *Taenia solium* paramyosin. *Infect. Immun.* 2005, **73**, 1895-7.
- [62] Huerta, M.; Sciutto, E.; Garcia, G.; Villalobos, N.; Hernandez, M.; Frago, G.; Diaz, J.; Diaz, A.; Ramirez, R.; Luna, S.; Garcia, J.; Aguilar, E.; Espinoza, S.; Castilla, G.; Bobadilla, J. R.; Avila, R.; Jose, M. V.; Larralde, C.; de Aluja, A. S. Vaccination against *Taenia solium* cysticercosis in underfed rustic pigs of Mexico: roles of age, genetic background and antibody response. *Vet. Parasitol.* 2000, **90**, 209-19.
- [63] Sciutto, E.; Martinez, J. J.; Huerta, M.; Avila, R.; Frago, G.; Villalobos, N.; de Aluja, A.; Larralde, C. Familial clustering of *Taenia solium* cysticercosis in the rural pigs of Mexico hints of genetic determinants in innate and acquired resistance to infection. *Vet. Parasitol.* 2003, **116**, 223-9.
- [64] Morales, J.; Martinez, J.J.; Garcia-Castilla, J.; Peña, N.; Meza, V.; Villalobos, N.; Aluja, A.S.; Fleury, A.; Frago, G.; Larralde, C.; Sciutto, E. *Taenia solium*: the complex interactions, of biological, social, geographical and commercial factors, involved in the transmission dynamics of pig cysticercosis in highly endemic areas. *Ann Trop. Med. Parasitol.* 2006, **100**(2), 123-35.
- [65] Morales, J.; Velasco, T.; Tovar, V.; Frago, G.; Fleury, A.; Beltran, C.; Villalobos, N.; Aluja, A.; Rodarte, L. F.; Sciutto, E.; Larralde, C. Castration and pregnancy of rural pigs significantly increase the prevalence of naturally acquired *Taenia solium* cysticercosis. *Vet. Parasitol.* 2002, **108**, 41-8.
- [66] Santamaría, E.; Plancarte, A.; de Aluja, A.S. The experimental infection of pigs with different numbers of *Taenia solium* eggs, immune response and efficiency of establishment. *J. Parasitol.* 2002, **88**(1), 69-73.
- [67] Gonzalez, A. E.; Cama, V.; Gilman, R. H.; Tsang, V. C.; Pilcher, J. B.; Chavera, A.; Castro, M.; Montenegro, T.; Verastegui, M.; Miranda, E.; Bazalar, H. Prevalence and comparison of serologic assays, necropsy, and tongue examination for the diagnosis of porcine cysticercosis in Peru. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1990, **43**, 194-9.
- [68] Quroz, R. H. Parasitología y Enfermedades parasitarias de animales domésticos. Grupo Noriega editores. *Lanusa*, 2002, pp 355-365.
- [69] Sciutto E, Martínez JJ, Villalobos NM, Hernández M, Jose MV, Beltran C, Rodarte F, Flores I, Bobadilla JR, Frago G, Parkhouse MF, Harrison LJ, de Aluja AS. Limitations of current diagnostic procedures for the diagnosis of *Taenia solium* cysticercosis in rural pigs. *Vet. Parasitol.* 1998, **79**(4), 299-313.
- [70] Viljoen, N. F. Cysticercosis in swine and bovines with special reference to South African conditions. *Onderstepoort J. Vet. Sci. Animal Indust.* 1937, **9**, 337-570.
- [71] Sciutto E, Hernandez M, Garcia G, de Aluja AS, Villalobos AN, Rodarte LF, Parkhouse M, Harrison L. Diagnosis of porcine cysticercosis: a comparative study of serological tests for detection of circulating antibody and viable parasites. *Vet. Parasitol.* 1998, **78**(3), 185-94.
- [72] Diaz, M. A.; Villalobos, N.; de Aluja, A.; Rosas, G.; Gomez-Conde, E.; Hernandez, P.; Larralde, C.; Sciutto, E. 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.* 2003, **91**, 81-90.
- [73] Hernandez, M.; Cabrerá-Ponce, J. L.; Frago, G.; Lopez-Casillas, F.; Guevara-García, A.; Rosas, G.; Leon-Ramirez, C.; Juárez, P.; Sánchez-García, G.; Cervantes, J.; Acero, G.; Toledo, A.; Cruz, C.; Bojalil, R.; Herrera-Estrella, L.; Sciutto, E. A new highly effective anticysticercosis vaccine expressed in transgenic papaya. *Vaccine* 2007, **25**, 4252-4260.
- [74] Sciutto E, Toledo A, Cruz C, Rosas G, Meneses G, Laplagne D, Ainciut N, Cervantes J, Frago G, Goldbaum FA. *Brucella* spp. lumazine synthase: a novel antigen delivery system. *Vaccine* 2005, **23**(21), 2784-90.
- [75] Rosas, G.; Frago, G.; Ainciut, N.; Esquivel-Guadarrama, F.; Santana, A.; Bobes, R. J.; Ramirez-Pliego, O.; Toledo, A.; Cruz-Revilla, C.; Meneses, G.; Berguer, P.; Goldbaum, F.A.; Sciutto, E. *Brucella* spp. lumazine synthase: a novel adjuvant and antigen delivery system to effectively induce oral immunity. *Microbes Infect.* 2006, **8**, 1277-86.
- [76] Rosas G, Cruz-Revilla C, Frago G, Lopez-Casillas F, Perez A, Bonilla MA, Rosales R, Sciutto E. *Taenia crassiceps* cysticercosis: humoral immune response and protection elicited by DNA immunization. *J. Parasitol.* 1998, **84**(3), 516-23.
- [77] Cruz-Revilla C, Rosas G, Frago G, Lopez-Casillas F, Toledo A, Larralde C, Sciutto E. *Taenia crassiceps* cysticercosis: protective effect and immune response elicited by DNA immunization. *J. Parasitol.* 2000, **86**(1), 67-74.
- [78] Cruz-Revilla C, Sonabend AM, Rosas G, Toledo A, Meneses G, Lopez-Casillas F, Hernandez B, Frago G, Sciutto E. Intrahepatic DNA vaccination: unexpected increased resistance against murine cysticercosis induced by non-specific enhanced immunity. *J. Parasitol.* 2006, **92**(3), 655-7.
- [79] Molinari, J. L.; Tato, P.; Lara-Aguilera, R.; White, A. J. Jr. Effects of serum from neurocysticercosis patients on the structure and viability of *Taenia solium* oncospheres. *Parasitol.* 1993, **79**, 124-7.
- [80] Garcia G, Sciutto E, Frago G, Cruz-Revilla C, Toledo A, Villalobos N, Flores I, Aluja A, Jose MV, Larralde C. Inhibitory role of antibodies in the development of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* toward reproductive and pathogenic stages. *J. Parasitol.* 2001, **87**(3), 582-6.
- [81] Sciutto, E.; Frago, G.; Fleury, A.; Laclette, J. P.; Sotelo, J.; Aluja, A.; Vargas, L.; Larralde, C. *Taenia solium* disease in humans and pigs: an ancient parasitosis disease rooted in developing countries and emerging as a major health problem of global dimensions. *Microbes Infect.* 2000, **2**, 1875-90.



- [82] Ito, A. Brief historical remarks as an introduction for the international symposium on taeniasis/cysticercosis and echinococcosis. *Parasitol Int* 2006, 55, Suppl. S3-5.
- [83] Ito, A.; Nakao, M.; Wandra, T.; Suroso, T.; Okamoto, M.; Yamasaki, H.; Sako, Y.; Nayaka, K. Taeniasis and cysticercosis in Asia and the Pacific: present state of knowledge and perspectives. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 2005, 36, Suppl. 4, 123-30.
- [84] Ito, A.; Wandra, T.; Yamasaki, H.; Nakao, M.; Sako, Y.; Nakaya, K.; Margono, S. S.; Suroso, T.; Gauci, C.; Lightowers, M.W. Cysticercosis/taeniasis in Asia and the Pacific. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2004, 4, 95-107.
- [85] Gemmell, M. A. Immunological responses of the mammalian host against tapeworm infections. XI. Antigen sharing among *Taenia pisiformis*, *T. hydatigena*, and *T. ovis*. *Exp. Parasitol.* 1969, 26(1), 67-72.
- [86] Harrison, L. J.; Parkhouse, R. M. *Taenia saginata* and *Taenia solium*: reciprocal models. *Acta Leidens.* 1989, 57, 143-52.
- [87] Onyango-Abuje, J. A.; Wanyeki, P. G.; Githuma, J. M. Specific and shared antigenic components of *Taenia saginata* oncospheres. *Res. Vet. Sci.* 1989, 47, 236-40.
- [88] Garcia-Allan, C.; Martinez, N.; Flisser, A.; Aluja, A.; Allan, J. C.; Craig, P. S. Immunocharacterization of *Taenia solium* oncosphere and metacestode antigens. *J. Helminthol.* 1996, 70, 271-80.
- [89] Cruz-Revilla C., Toledo, G. Rosas A., Huerta M., Flores-Perez I., Peña N., Morales J., Cisneros-Quilones J., Meneses G., Díaz-Orea A., Anciarri N., Goldbaum F., Aluja A., Larraide C., Fragoso G., E Sciutto. Effective protection against experimental *Taenia solium* tapeworm infection in hamsters by pruno-infection and by vaccination with recombinant or synthetic heterologous antigens. *J. Parasitol.* 2006, 92, 864-7.
- [90] Gonzalez, A. E.; Davidia, C.; Falcon, N.; Bernal, T.; Verastegui, M.; Garcia, H. H.; Gilman, R. H.; Tsang, V. C.; Cysticercosis Working Group in Peru. Protection of pigs with cysticercosis from further infections after treatment with oxfendazole. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2001, 65, 15-8.
- [91] Willingham AL 3rd, Engels D. Control of *Taenia solium* cysticercosis/taeniasis. *Adv. Parasitol.* 2006, 61, 509-66.
- [92] Garcia IIIH, Del Bruto OH; Cysticercosis Working Group in Peru. Neurocysticercosis: updated concepts about an old disease. *Lancet Neurol* 2005, 4(10), 653-61.
- [93] Lightowers MW. Vaccination for the prevention of cysticercosis. *Dev. Biol. (Basel)* 2004, 119, 361-8.
- [94] Eddi, C.; Nani, A.; Amanfu, W. *Taenia solium* cysticercosis/taeniasis: potential linkage with FAO activities: FAO support possibilities. *Acta Trop.* 2003, 87, 145-8.
- [95] Engels, D.; Urbani, C.; Belotto, A.; Meslin, F.; Savioli, L. The control of human (neuro) cysticercosis: which way forward? *Acta Trop.* 2003, 87, 177-82.
- [96] Serpa JA, Yancey LS, White AC Jr. Advances in the diagnosis and management of neurocysticercosis. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2006, 4(6), 1051-61.
- [97] Pawlowski, Z. S. Control of *Taenia solium* taeniasis and cysticercosis by focus-oriented chemotherapy of taeniasis. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 1991, 22, Suppl. 284-6.
- [98] Pawlowski, Z. S. Role of chemotherapy of taeniasis in prevention of neurocysticercosis. *Parasitol Int.* 2006, 55, Suppl. S105-9.
- [99] Pawlowski, Z. S.; Allan, J.; Sarti, E. Control of *Taenia solium* taeniasis/cysticercosis: from research towards implementation. *Int J Parasitol.* 2005, 35, 1221-32.
- [100] Keilbach, N. M.; de Aluja, A. S.; Sarti-Gutierrez, E. A programme to control taeniasis-cysticercosis (*T. solium*): experiences in a Mexican village. *Acta Leidens.* 1989, 57, 181-9.
- [101] Diaz-Camacho, S. P.; Candil Ruiz, A.; Suarez-Peraza, V.; Zazueta Ramos, M. L.; Felix Medina, M.; Lozano, R.; Williams, K. Epidemiologic study and control of *Taenia solium* infections with praziquantel in a rural village of Mexico. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1991, 45, 522-31.
- [102] Allan, J. C.; Velásquez-Tohom, M.; Fletes, C.; Torres-Alvarez, R.; Lopez-Virula, G.; Tyrina, P.; Soto de Alfaro, H.; Rivera, A.; Garcia-Naval, J. Mass chemotherapy for intestinal *Taenia solium* infection: effect on prevalence in humans and pigs. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1997, 91, 595-8.
- [103] Sarti, E.; Flisser, A.; Schantz, P. M.; Glezer, M.; Loya, M.; Placarte, A.; Avila, G.; Allan, J.; Craig, P.; Bronfman, M.; Wijeyaratne, P. Development and evaluation of a health education intervention against *Taenia solium* in a rural community in Mexico. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1997, 56, 127-32.
- [104] Sarti, E.; Schantz, P. M.; Avila, G.; Ambrosio, J.; Medina-Santillan, R.; Flisser, A. Mass treatment against human taeniasis for the control of cysticercosis: a population-based intervention study. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2000, 94, 35-9.
- [105] Boa, M.; Mukaratirwa, S.; Willingham, A. L.; Johansen, M. V. Regional action plan for combating *Taenia solium* cysticercosis/taeniasis in Eastern and Southern Africa. *Acta Trop.* 2003, 87, 183-6.
- [106] Serutto E, Rosas G, Hernandez M, Morales J, Cruz-Revilla C, Toledo A, Manoucharian K, Gevorkian G, Blancas A, Acero G, Hernandez B, Cervantes J, Bobes RJ, Goldbaum FA, Huerta M, Diaz-Orea A, Fleury A, de Aluja AS, Cabrera-Ponce JL, Herrera-Estrella L, Fragoso G, Larraide C. Improvement of the synthetic tri-peptide vaccine (S3Pvac) against porcine *Taenia solium* cysticercosis in search of a more effective, inexpensive and manageable vaccine. *Vaccine* 2007, 25(3), 1368-78.
- [107] Wallin MT, Kurtzke JF. Neurocysticercosis in the United States: review of an important emerging infection. *Neurology* 2004, 63(9), 1559-64.
- [108] DeGiorgio CM, Sorvillo F, Escueta SP. Neurocysticercosis in the United States: review of an important emerging infection. *Neurology* 2005, 64(8), 1486.

## XVII. APÉNDICE I

### Actividad antihelmíntica, inmunomoduladora y antiinflamatoria del látex y el extracto de papaya (*Carica papaya L.*)



Árbol de papaya. Tomado de <http://www.agronet.com.mx>

Las alternativas terapéuticas de la medicina alopática para infecciones contra helmintos (praziquantel, albendazol y oxfendazol) han comenzado a generar individuos resistentes. Esta situación señala la importancia de desarrollar tratamientos alternativos contra parásitos gastrointestinales para uso en humanos y ganado en riesgo de infección (cabras, ovinos, bovinos, cerdos). En este sentido, el

uso de las semillas, el látex y el fruto de la papaya se han reportado como una estrategia de la herbolaria tradicional contra infecciones por helmintos, ya que poseen propiedades antimicrobiana y antiparasitaria (antihelminto) (Stepek *et al.*, 2004). Dichas propiedades son atribuidas a su alto contenido de cuatro enzimas proteolíticas, quimopapaína, papaína (aprox. 8%), caricaína y glicil endopeptidasa, las cuales poseen actividad de cistein-proteinasas y se encuentran almacenadas en células laticíferas, a una concentración aproximada de 1 mM (Hammond *et al.*, 1997; Stepek *et al.*, 2004). Estas enzimas son sintetizadas y conservadas como precursores inactivos; sin embargo, cuando la planta sufre algún daño, el látex es liberado y la concentración de proteasas se incrementa rápidamente, hasta alcanzar el máximo de actividad en menos de 2 min (Azarkan *et al.*, 2003). Las cistein-proteinasas constituyen fuertes candidatos para el tratamiento de infecciones por nemátodos gastrointestinales de humanos y animales, ya que su actividad proteolítica es capaz de digerir la cutícula de nemátodos, con pocos o sin efectos colaterales (Hounzangbe-Adote *et al.*, 2005; Okeniyi *et al.*, 2007). Estudios realizados por Berger y Asenjo (1940) mostraron en ensayos *in vitro* que la papaína purificada causaban ampollas en la cutícula del parásito adulto *Heligmosomoides polygyrus* y que el látex de la papaya era efectivo contra ascáridos, tenias, tricocéfalos, ancilostomas y uncinarias (Berger y Asenjo, 1940).

Estudios *in vitro* han mostrado que incubando individuos adultos de *Ascaridia galli*, nemátodo intestinal del pollo, con el látex de la papaya, en menos de 24 hrs se logra la destrucción completa del parásito (Purwati y He, 1991).

Satrija en 1994, reporta que en cerdos infectados con *Ascaris suum* la administración de 4 a 8 g/kg del látex de la papaya reduce significativamente la carga parasitaria (número de huevos en muestras de heces) al día 7 post-tratamiento (Satrija *et al.*, 1994). Asimismo, en ratones infectados experimentalmente con *Heligmosomoides polygyrus* también se redujo significativamente el número de huevos y parásitos, sin efectos colaterales (Satrija, F. 1995). Ambos estudios han demostrado el potencial del látex de papaya para el tratamiento de infecciones con nemátodos gastrointestinales en hospederos monogástricos. Sin embargo, otros datos indican que el látex de papaya no tuvo efecto contra la infección de *Hymenolepis diminuta* en ratas y el tremátodo *Echinostoma caproni* en ratones, lo cual sugiere que el tratamiento con látex podría no tener efecto contra todos los tipos de helmintos.

La actividad antihelmíntica de la papaya ofrece la posibilidad de evaluar otras frutas que contengan cistein-proteinasas, como el kiwi y la mora, que aún no han sido investigados en su capacidad antihelmíntica. Los tratamientos basados en plantas con capacidad medicinal podrían ser de bajo costo y fácil obtención, convirtiéndose en un tratamiento alternativo que beneficiaría a las poblaciones de bajos recursos, frecuentemente afectadas por parásitos intestinales. Además, las plantas podrían presentar menor riesgo en la producción de efectos colaterales, ya que son productos naturales que forman parte de la dieta del humano y los animales. Si bien las perspectivas del uso de plantas medicinales para el tratamiento contra helmintos intestinales es de gran interés, se requiere promover su evaluación para consolidar su futura aplicación; por ejemplo, en la producción de plantas transgénicas

con actividad antihelmíntica, a través de un posible aumento en su contenido de cistein-proteinasas (Hammond *et al.*, 1997; Lans, C. *et al.*, 2000).

Por otra parte, a la papaya también se le han atribuido propiedades inmunomoduladoras, antiinflamatorias y antioxidantes similares a las de los bioflavonoides y la superóxido dismutasa. Estudios previos reportan que el extracto crudo de semillas de papaya y algunas de sus fracciones bioactivas presentan capacidad para estimular la proliferación de linfocitos humanos sensibilizados con fitohemaglutinina y suprimen la lisis celular mediada por la vía clásica del complemento, indicando una posible inhibición de la respuesta inflamatoria (Mojica-Henshaw *et al.*, 2003). Sin embargo, a la fecha no se ha llevado a cabo la identificación y caracterización de los componentes responsables del efecto inmunoestimulante o antiinflamatorio. Por otra parte, Rimbach *et al.* (2000) reportan que la incubación de la línea de macrófagos RAW 264.7 con preparaciones fermentadas de papaya de bajo y alto peso molecular e interferón gamma (IFN- $\gamma$ ), inducen un aumento en la secreción de la forma inducible de la óxido nítrico (ON) sintasa, nitrito y una acumulación de nitrato. Considerando que la producción de ON es relevante en la actividad antimicrobiana, antiviral y antitumoral de los macrófagos, sería relevante la identificación de los componentes responsables de dicha actividad para el desarrollo de un agente terapéutico con capacidad para regular la producción de ON (Rimbach *et al.*, 2000), y por consiguiente, la respuesta antimicrobiana y antitumoral de los macrófagos.

Por último, se ha reportado que la papaína ha sido utilizada como antiinflamatorio, para el reemplazo de glucocorticoides y antirreumáticos no

esteroides. Sin embargo, hasta el momento sólo existe un reporte al respecto, por lo que es necesario realizar una amplia investigación en el tema, a fin de verificar su posible uso terapéutico (Stepek *et al.*, 2004).

## BIBLIOGRAFÍA

Azarkan, M., El Moussaoui, A., Van Wuytswinkel, D., Dehon, G., Looza, Y. 2003. Fractionation and purification of the enzymes stored in the latex of *Carica papaya*. *Journal Chromatography B Analytical Technologies Biomedical & Life Sciences*, 790:229-238

Berger, J and Asenjo, C. F. 1940. Anthelmintic activity cristallyne papain. *Science*, 91: 387-388.

Hammond, J. A., Fielding, D. and Bishop, S. C. 1997. Prospects for plant anthelmintics in tropical veterinary medicine. *Veterinary Research Communications*, 21: 213-228.

Hounzangbe-Adote, S., Fouraste , I., Moutairou, K., Hoste, H. 2005. *In vitro* effects of four tropical plants on the activity and development of the parasitic nematode, *Trichostrongylus colubriformis*. *Journal Helminthology*, 79:29-33.

Lans, C., Harper, T., Georges, K., Bridgewater, E. 2000. Medicinal plants used for dogs in Trinidad and Tobago. *Preventive Veterinary Medicine*, 45:201-220.

Mojica-Henshaw, M. P., Francisco, A, D, 2003. Possible immunomodulatory actions of *Carica papaya* seed extract. *Clinical Hemorheology & Microcirculation*, 29: 219-229.

Okeniyi, J. A., Ogunlesi, T. A., Oyelami, O. A., Adeyemi, L. A. 2007. Effectiveness of dried *Carica papaya* seeds against human intestinal parasitosis: a pilot study. *Journal Medicinal Food*, 10:194-196.

Purwati, E., He, S. 1991. Pengaruh getah papaya (*Carica papaya* L.) terhadap infektivitas telur *Ascaridia galli* pada ayam. *Hemera. Zoa*, 74:1-5.

Rimbach, G., Park, Y. C., Guo, Q., Moini, H., Qureshi, N., Saliou, C., Takayama, K., Virgili, F., Packer L. 2000. Nitric oxide synthesis and TNF-alpha secretion in RAW 264.7 macrophages: mode of action of a fermented papaya preparation. *Life Sciences*, 67:679-694.

Satrija, F., Nansen, P., Biorn, H., Murtini, S., He, S. 1994. Effect of papaya latex against *Ascaris suum* in naturally infected pigs. *Journal Helminthology*, 68: 343-334.

Satrija, F. 1995. Anthelmintic activity of papaya latex against patent *Heligmosomoides polygyrus* infections in mice. *Journal Ethnopharmacology*. 45, 161-164.

Steppek, G., Behnke, J. M., Buttle, D. J., Duce, L. R. 2004. Natural plant cysteine proteinases as anthelmintics? *Trends Parasitology*, 20: 322-327



## **XVIII. APÉNDICE II.**

### **Citocinas humanas: expresión en plantas transgénicas y aplicación terapéutica**

#### **RESUMEN**

Las citocinas son proteínas o péptidos solubles secretadas en respuesta a diferentes estímulos antigénicos. Actualmente se reportan aproximadamente cien clases de citocinas, mismas que se clasifican en interferones (IFNs), interleucinas (ILs), factores estimulantes de colonias (CSFs) y otras citocinas. En la respuesta inmune innata y adaptativa, las citocinas actúan de forma pleiotrópica, redundante, sinérgica e inducen la actividad en cascada de una o más citocinas. La variación genética o en los niveles de producción de las citocinas se ha asociado con diferentes enfermedades. Las citocinas recombinantes se están utilizando para modular procesos inflamatorios y de la respuesta inmune durante cirugías de trasplante, para controlar el desarrollo del cáncer y cuadros de alergias; sin embargo, su utilización ha sido limitada debido a su alto costo. En este sentido, su producción a gran escala en plantas transgénicas permitiría reducir su costo y favorecer su aplicación a nivel clínico. En esta revisión se da un breve panorama de las citocinas, haciendo mención de su clasificación, participación en la respuesta inmune, en la enfermedad, su expresión en plantas transgénicas y su aplicación terapéutica a nivel clínico.

## **Las citocinas**

Las citocinas son proteínas o péptidos con peso molecular de 8-80 kDa que son secretadas por diferentes tipos de células sanguíneas en respuesta a un estímulo antigénico; presentan las funciones de pleiotropía, redundancia, sinergismo e inducción en cascada de una o más citocinas. Además, regulan la comunicación entre las células de la respuesta inmune innata y adaptativa, actúan a concentraciones picomolares a través de la unión a su receptor con gran afinidad y especificidad, y regulan la intensidad y duración de la respuesta inmune a través de la estimulación o inhibición de la activación, proliferación o diferenciación de diversos tipos celulares (Kuby, J. 2001).

## **Clasificación**

Actualmente se han descrito más de cien diferentes citocinas humanas, que se han clasificado de la siguiente manera:

- a) Interferones (IFNs)
- b) Interleucinas (ILs)
- c) Factores estimulantes de colonias (CSFs)
- d) Otras citocinas.

Las características principales de cada grupo se describen brevemente a continuación.

#### a) Interferones (IFNs)

Los interferones son glicoproteínas producidas y secretadas por células que inducen un estado antiviral y una actividad antiproliferativa, inmunológica y enzimática. El principal grupo de interferones incluye al IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$ , que son producidos por leucocitos y fibroblastos, respectivamente, y al IFN- $\gamma$  que es secretado por las células activadas NK (natural killer), T<sub>H1</sub> (linfocitos T ayudadores T<sub>H1</sub>) y T<sub>C</sub> (linfocitos T citotóxicos).

#### b) Interleucinas (ILs)

Las interleucinas (IL-1 a IL-18) son secretadas por los leucocitos y actúan en el crecimiento y la diferenciación de las células del sistema inmune y varias células del sistema hematopoyético. Cada interleucina actúa de forma específica sobre su receptor y célula blanco.

#### c) Factores estimulantes de colonias (CSFs)

Estas citocinas son proteínas que actúan directamente sobre la división y diferenciación de células de la médula ósea. El balance de los precursores de los leucocitos depende de la producción y diferenciación de las líneas celulares que se encuentran fuera de la médula ósea. En este grupo se incluye al factor estimulante de colonias de la línea granulocito-macrófagos (GM-CSF), la línea de macrófagos (M-CSF) y de granulocitos (G-CSF).

#### d) Otras citocinas

En este grupo se incluye los Factores de Necrosis Tumoral (TNF)- $\alpha$ , TNF- $\beta$  y el Factor de Crecimiento Tumoral - $\beta$  (TGF- $\beta$ ). Dichos factores participan en la interacción célula-célula o célula-antígeno para controlar la respuesta inmune innata y adaptativa, la respuesta inflamatoria, la defensa contra virus y la proliferación y regulación específica de células T y B.

### **Participación de las citocinas en la respuesta inmune**

#### Respuesta inmune innata.

Es la respuesta primaria del hospedero que se induce ante su exposición a un antígeno. Las citocinas que participan en la respuesta inmune innata son producidas por macrófagos, células dendríticas, linfocitos T, células NK y otros tipos celulares. Son producidas en respuesta a patógenos que contienen lipopolisacáridos (LPS), monómeros de peptidoglicanos, ácido teicoico y ADN de doble cadena, a través de los mecanismos de endocitosis, fagocitosis e inflamación, donde los leucocitos y las células endoteliales son las responsables de promover y controlar la respuesta inflamatoria temprana. En la Tabla I se compilan las citocinas que se producen durante la respuesta inmune innata.

#### Respuesta inmune adaptativa (inmunidad humoral y celular).

Es una respuesta adquirida y específica mediada a través receptores membranales antígeno-específicos (inmunoglobulinas de superficie en los linfocitos B

y receptores para los linfocitos T). Los mecanismos de la respuesta inmune adaptativa se caracterizan por tener diversidad, memoria y capacidad de reconocimiento entre lo propio y no propio. Cada vez que el hospedero se exponga al patógeno que indujo la respuesta adquirida, la memoria inmunológica del hospedero actuará inmediatamente. En la Tabla I se compilan las citocinas que participan en la respuesta inmune adaptativa.

### Hematopoyesis.

Las citocinas que promueven la hematopoyesis son producidas en su mayoría por las células localizadas en el estroma de la médula ósea, son responsables de la estimulación, crecimiento y diferenciación de los leucocitos inmaduros, para la producción de las líneas celulares que constituyen la población de células sanguíneas. Las citocinas que estimulan la hematopoyesis se indican en la Tabla II.

### **Las citocinas en la enfermedad**

Las citocinas son las responsables de llevar a cabo la homeostasis de la respuesta inmune, inflamación y reparación de tejidos. La variación en sus niveles de producción (genética o adquirida) se ha asociado con diferentes enfermedades; por ejemplo, el incremento en la producción de TNF- $\alpha$  induce un aumento en la susceptibilidad al SIDA, choque séptico, *diabetes mellitus*, hepatitis, linfoma y esclerosis múltiple (Theze, J. 1999); el aumento de IL-1 e IL-6 se ha asociado con la enfermedad de Castleman, mieloma múltiple y enfermedades autoinmunes

(glomerulonefritis) (Kishimoto, T. 1993). La sobreproducción de GM-CSF y quimiocinas se asocia a la leucemia mieloide, artritis reumatoide y neumonía, asma, enfermedad respiratoria del adulto (ARDS) y choque séptico.

### **Uso terapéutico de citocinas recombinantes**

Las enfermedades ocasionadas por causa de una desregulación o sobreproducción de citocinas pueden ser tratadas o controladas a través de la administración de citocinas recombinantes o anticuerpos anti-citocinas, respectivamente. Dentro de las enfermedades en las que se administran citocinas recombinantes se encuentran los procesos inflamatorios, el desarrollo del cáncer, la regulación de la respuesta inmune en el trasplante, el control de las enfermedades infecciosas y las alergias. En la Tabla III se muestran algunos reportes sobre el uso terapéutico de las citocinas recombinantes en estudios preclínicos en humanos (Kuby, J. 2001; Aok, N., Xing, Z. 2004).

### **Producción de citocinas recombinantes en plantas transgénicas para uso terapéutico**

El sistema de plantas transgénicas tiene un elevado potencial para ser usado como biorreactor para la producción de proteínas recombinantes de interés terapéutico, como vacunas, proteínas para diagnóstico, anticoagulantes, anticuerpos, proteínas plasmáticas, factores de crecimiento y citocinas (Fisher, R., Emans, N., 2000; Goldstein, D. A., Thomas, J. A., 2004), por lo que se considera un sistema alternativo

al de la expresión de proteínas en procariotes, baculovirus, levaduras y células de mamífero, que presenta las siguientes ventajas:

- a) Las proteínas pueden ser expresadas de forma nuclear, en organelo (mitocondria o cloroplasto), órgano específico (fruto) o en alguna etapa específica del crecimiento de la planta (germinación).
- b) Diferencias mínimas en su patrón de glicosilación en comparación con las células animales.
- c) Las proteínas pueden ser administradas por vía oral, evitando su degradación a través del tracto gastrointestinal debido a la presencia de la pared celular.
- d) Producción a gran escala, en cultivo de células en suspensión, por propagación *in vitro* o en campo.
- e) Bajo riesgo de contaminación con endotoxinas, como ocurre en cultivos bacterianos.
- f) Producción y almacenamiento de bajo costo.
- g) Alto potencial con valor comercial (Fisher, R., Emans, N., 2000).

Sin embargo, este sistema de expresión también presenta las siguientes desventajas:

- a) Bajo a moderado nivel de expresión.
- b) Controversia en la seguridad biológica para su uso (Ma, J. *et al.*, 2003; Yin *et al.*, 2007).

Actualmente el uso terapéutico de las citocinas recombinantes es limitado debido a su alto costo de producción. Sin embargo, su producción en plantas transgénicas ofrece la posibilidad de utilizarlas a nivel clínico, por las ventajas previamente mencionadas. Además, estudios *in vitro* sobre la evaluación de la actividad de las citocinas recombinantes expresadas en plantas transgénicas muestran que conservan su funcionalidad (Tablas IV-VIII). Por lo tanto, esta estrategia se vislumbra como una nueva alternativa factible para el tratamiento de pacientes.

### **Perspectivas**

En la actualidad existe una gran necesidad de desarrollar nuevas estrategias profilácticas y terapéuticas para el tratamiento de varias enfermedades de interés clínico. De tal manera, la producción de citocinas recombinantes en plantas transgénicas para uso terapéutico debería considerarse seriamente, en el entendido de que también deberá ser controlado bajo las mismas normas de producción que requieren los productos farmacéuticos (BIO, Organización Industrial Biotecnológica). Además, su distribución, seguridad y eficacia deberán analizarse caso por caso, validándose a través de estudios inmunológicos, fisiológicos y terapéuticos, que permitan determinar la existencia de un posible riesgo o inducción de efectos colaterales.



Tabla I. Citocinas que participan en la respuesta inmune innata y adaptativa.

Citocina	Célula productora	Célula blanco	Función
IL-6 <sup>†</sup>	Monocitos, macrófagos, células TH2 y células estomales.	Células B activadas, plasmáticas, de médula ósea y otros tipos celulares.	Diferenciación de células plasmáticas, secreción de anticuerpos, diferenciación y respuesta de fase aguda.
IL-10 <sup>†</sup>	Células TH2.	Macrófagos y células B.	Producción y activación de citocinas.
IL-12 <sup>†</sup>	Macrófagos y células B.	Células T citotóxicas activadas y células B.	Diferenciación en linfocitos T citotóxicos (CTL) (con IL-2).
IL-15 <sup>†</sup>	Macrófagos y células T.	Proliferación de células NK y T.	Proliferación con mitógenos y diferenciación de células B activadas.
IL-18 <sup>†</sup>	Macrófagos.	Células NK y T	Aumento de la citotoxicidad de las células NK.
IL-1 $\alpha$ <sup>†</sup> , IL-1 $\beta$ <sup>†</sup>	Macrófagos, monocitos, células B y dendríticas.	Células TH, B y NK.	Maduración y proliferación, activación e inflamación de respuesta en fase aguda.
IFN- $\gamma$ <sup>†*</sup>	Células TH1, T, citotóxicas y NK.	Macrófagos, células B activadas y células TH2.	Inhibición de la replicación viral, expresión de moléculas del MHC. Expresión de anticuerpos IgG, cambio de expresión de IgG a IgG <sub>2</sub> .
TNF- $\alpha$ <sup>†</sup>	Macrófagos, mastocitos y células NK.	Macrófagos y neutrófilos.	Expresión de citocinas y CAM.
Quimioquinas <sup>†</sup>	Leucocitos, fibroblastos y células Epiteliales.	Leucocitos.	Migración de leucocitos, células T, B y dendríticas al sitio de inflamación.
IL-2 <sup>†</sup>	Células TH1, linfocitos CD4 y CD8.	Células T y B activadas y células NK.	Activación, proliferación y crecimiento.
IL-4 <sup>†</sup>	Células TH2, NK y mastocitos.	Células B activadas, macrófagos y células T.	Proliferación y diferenciación, síntesis de IgG1 e IgE.
IL-5 <sup>†</sup>	Células TH2 y mastocitos.	Células B activadas y eosinófilos.	Proliferación y diferenciación de linfocitos B activados, síntesis de IgA.
IL-13 <sup>†</sup>	Células TH2.	Neutrófilos.	Regulación de la respuesta inmune inflamatoria e IgE.
TGF- $\beta$ <sup>†</sup>	Macrófagos, plaquetas, mastocitos, células T y monocitos.	Monocitos, macrófagos activados y células B activadas.	Reparación de tejidos, quimiotaxis, síntesis de IL-1, síntesis de IgA y proliferación celular.

<sup>†</sup> Citocinas de la respuesta inmune innata; <sup>†</sup> Citocinas de la respuesta inmune adaptativa; \* Citocinas producidas en ambas respuestas innata y adaptativa. IL: Interleucina; IFN: Interferón; TNF: Factor de Necrosis Tumoral; Tc: Linfocitos T citotóxicos; NK: Células Natural Killer; CTL: Linfocitos T citotóxicos; CAM: Marginación de neutrófilos; GF- $\beta$ : Factor de Crecimiento Tumoral- $\beta$ .

Tabla II. Citocinas que estimulan la hematopoyesis.

Citocina	Célula productora	Célula blanco	Función
IL-3	Células TH, NK y mastocitos.	Células progenitoras, mastocitos.	Crecimiento y diferenciación de células progenitoras, liberación de histamina de mastocitos.
Factor de células progenitoras	Células estromales de la médula ósea.	Células progenitoras.	Aumento en la producción de células progenitoras.
GM-CSF	Macrófagos, linfocitos T, células TH.	Células progenitoras.	Crecimiento y diferenciación de monocitos y células dendríticas.
M-CSF	Células del mesénquima.	Monocitos y macrófagos.	Estimula la supervivencia, proliferación y diferenciación de células hematopoyéticas de la línea celular monocito-macrófágica.
G-CSF	Monocitos, macrófagos, células endoteliales y estromales, fibroblasto.	Neutrófilos.	Induce la supervivencia, proliferación y diferenciación de células progenitoras de granulocitos y neutrófilos.
Linfotoxina	Linfocitos T.	Neutrófilos.	Mediador de la respuesta aguda inflamatoria.

GM-CSF: Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos-Monocitos; M-CSF: Factor Estimulante de Colonias de Macrófagos; G-CSF: Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos.

Tabla III. Uso terapéutico de citocinas recombinantes en estudios preclínicos en humanos.

Citocina recombinante	Enfermedad	Efectos colaterales	Referencia
INF- $\alpha$	Enfermedades infecciosas (por <i>Condylomata acuminata</i> , rinovirus, protozoarios, parásitos u hongos). Enfermedades virales (hepatitis B). Alergia maligna. Cáncer de hígado, cirrosis, trasplante. Linfomas y verrugas genitales.	No reportado.	Hidemann et al., 1998 Balcells et al., 1998
Epo	Enfermedades crónicas de riñón. Anemia. Infección crónica consecutiva. Tratamiento o terapia de radiación con fármacos citostáticos.	Aparición o agravamiento por Hipertensión.	Theze, J. 1999.
IL-12	Enfermedades infecciosas. Alergia severa. Tumores (melanoma), linfoma celular cutáneo, asma, infección por VIH. Hepatitis crónica B y C.	No reportado.	Trichieri, G and Scott, P. 1999
Quimiotocinas	Enfermedades relacionadas con cáncer e infecciones.	No reportado.	Hogaboam et al., 2000
TNF- $\alpha$	Agente antineoplásico, terapia para cáncer. Metástasis de melanoma, sarcomas de tejidos blandos.	Fiebre, dolor de cabeza y fatiga. En el tratamiento de melanomas con metástasis y en sarcomas de tejidos blandos no se presentaron efectos colaterales.	Saks, S and Rosenblum, M. 1992 Chya et al., 2002
IL-2	Melanoma o carcinoma renal. Terapia tumoral.	Síndrome de rompimiento vascular, edema, anemia, hipotensión.	Nissim et al., 2004
IL-10	Enfermedad inflamatoria o autoinmune.	No reportado.	Zhou et al., 2005.

Tabla IV. Tipos de Interferón recombinante expresado en plantas transgénicas

Citocina	Planta transgénica	Método de transformación	Nivel de expresión	Tipo de tejido analizado	Evaluación de citocina recombinante	Referencia
IFN- $\beta$	Tabaco.	<i>Agrobacterium</i> cepa <i>EHA101</i> .	17 $\mu$ g/ 100gr	Hoja fresca.	Inhibición del efecto citopático del virus de la estomatitis vesicular (VSV) en células amnióticas humanas.	Edelbaum et al., 1992
	Protoplastos de arroz.	Lipofectina.	512-2048 U/gr de hoja.	Células en suspensión.	Inhibición del efecto patogénico del virus de la estomatitis en células amnióticas.	Zhu et al., 1994
IFN- $\alpha$ 2b IFN- $\alpha$ 8	Papa.	<i>Agrobacterium</i> cepa <i>LBA4404</i> .	560 U/lgr de tejido	Hoja.	Inhibición de la replicación del virus de la estomatitis vesicular (VSV) en una línea celular amniótica.	Chya et al., 2001
IFN- $\alpha$	Papa.	Lipofectina.	923-3029 unidades de actividad/lgr de peso fresco.	Hoja y células en suspensión.	Determinación de la actividad del interferón por el método de Hou.	Sawahel, W. A. 2002
IFN- $\gamma$	Callos embriogénicos de arroz.	<i>Agrobacterium</i> cepa <i>LBA4404</i> .	11.1 ng/ml secretado ó 699.79 ng/lgr Intracelular en el día 7 de cultivo.	Células en suspensión.	Evaluación de su actividad antiviral mediante ensayos de infectividad del virus del dengue en células humanas A54.	Chen et al., 2004

Tabla V. Interleucinas recombinantes expresadas en plantas transgénicas

Citocina	Planta Transgénica	Método de transformación	Nivel de expresión	Tipo de tejido analizado.	Evaluación de citocina Recombinante.	Referencia
IL-2 IL-4	Tabaco.	<i>Agrobacterium</i> cepa LBA4404.	IL-2 secretada 5.2-8.2 ng/mL. IL-4 secretada 13.9-44.3 ng/mL	Células en suspensión al día 6 de cultivo.	Capacidad de la IL-2 para estimular la proliferación de la línea celular CTLL-2 dependiente de IL-2. Para IL-4 se utilizó la línea celular humana CT.M5.	Magrason et al., 1998
IL-10 (pHL-10C)	Cultivo de tabaco bajo en alcaloides	<i>Agrobacterium</i> .	55 ng/mg proteína total soluble.	Apoplasto.	Capacidad de la IL-10 para inhibir la secreción de IL-6 de la línea de macrófagos PU5-1.8 estimuladas con LPS y la proliferación de la línea celular de mastocitos MC/9 (ATCC) dependiente de IL-4.	Menassa et al., 2001
IL-2	Papa.	<i>Agrobacterium</i> cepa AGL1.	115 unidades/g peso fresco.	Microtubérculos de 2 semanas.	Proliferación de la línea celular CTLL-2 dependiente de IL-2.	Park, Y. y Cheon, H. 2002
IL-12	Tabaco.	<i>Agrobacterium</i> cepa LBA4404.	175 µg/ L al día 5 de cultivo.	Células de callos en suspensión	No determinado.	Kwon et al., 2003
IL-18	Tabaco.	<i>Agrobacterium</i> cepa LBA4404.	351 ng/g.	Tejido de hoja.	Inducción de la secreción de INF-γ de la línea celular (leucemia) J6-1 estimulada con IL-18.	Zhang et al., 2003.
Cadena sencilla de IL-12	Tabaco.	<i>Agrobacterium</i> cepa LBA4404.	En hoja 28, 40 y 17.5 ng/g de peso fresco en las líneas, IL-12-1, IL-12-2 y IL-12-3, respectivamente.	Hoja.	Evaluación de la capacidad de la IL-12 para estimular células NK para producir de INF-γ.	Guilierrez-Ortega et al., 2004
IL-18	Tabaco.	<i>Agrobacterium</i> cepa LBA4404.	Más de 0.01% de proteína total o 1.3 mg/kg de peso fresco.	Hoja.	No determinado.	Turchinovich et al., 2004
IL-4	Tabaco. Papa.	<i>Agrobacterium</i> .	0.1% proteína total soluble 0.08% proteína total soluble.	Hoja. Tubérculos.	Ensayo de proliferación celular.	Ma et al., 2005

Tabla VI. Factor estimulante de colonias granulocito-macrófago (GM-CSF) recombinante expresado en plantas transgénicas.

Planta Transgénica	Método de transformación	Nivel de expresión	Tipo de tejido analizado.	Evaluación de citocina recombinante	Referencia
Tabaco.	<i>Agrobacterium</i> cepa LBA4404.	250 µg/L cultivo.	Células en suspensión.	Análisis por Western blot.	James et al., 2000
Tabaco.	<i>Agrobacterium</i> cepa LBA4404.	980.1 µg/L al día 5 de cultivo.	Células en suspensión de hojas con 9% de manitol.	No determinado.	Lee et al., 2002
Tabaco.	<i>Agrobacterium</i> cepa LBA4404.	783 µg/L al día 5 de cultivo.	Células en suspensión de callos de hoja con gelatina al 5%.	No determinado.	Lee et al., 2002
Tabaco.	<i>Agrobacterium</i> cepa PGV3101/PM90.	287 ng/mg de extracto proteico.	Semillas.	Proliferación de células TF-1.	Sardana et al., 2002
Tomate.	<i>Agrobacterium</i> cepa LBA4404.	45 µg/L al día 10 de cultivo.	Células en suspensión derivadas de callos de hojas.	No determinado.	Kwon et al., 2003
Arroz.	Bombardeo con microparticulas.	150 µg /L al día 5 de cultivo.	Células en suspensión.	Proliferación de células TF-1.	Shin et al., 2003
Tabaco.	<i>Agrobacterium</i> cepa LBA4404.	102 µg/L al día 5 de cultivo.	Células en suspensión con manitol al 9% y gelatina al 2%.	No determinado.	Soderkis, R. G. y Lee, J. M., 2006
Tabaco.	<i>Agrobacterium</i> .	76-130 µg/L cultivo extracelular 150 µg/L proteína intracelular.	Células en suspensión.	No determinado.	Soderkis, R. G. y Lee, J. M., 2005
Caña de azúcar variedades H62-4671 y Q117.	Bombardeo con Microparticulas.	0.02% proteína total soluble.	Callos u hoja.	División y proliferación de células de médula ósea de humano dependientes de GM-CSF.	Wang et al., 2005
Nicotiana benthamiana.	Virus X de la papa (PVX).	19.8 mg/L proteína soluble.	Hoja.	Análisis por ELISA y Western blot. Ensayo de estimulación y crecimiento de células humanas TF-1.	Zhou et al., 2006.

Tabla VII. Otras citocinas expresadas en plantas transgénicas

Citocina.	Planta transgénica.	Método de transformación.	Nivel de expresión.	Tipo de tejido analizado.	Evaluación de citocina recombinante.	Referencia.
TNF- $\alpha$ .	Papa.	<i>Agrobacterium</i> ,	15 $\mu$ g/g	Hoja.	Efecto citotóxico en células de ratón L929.	Ohya et al., 2002.
	Tabaco y <i>Arabidopsis</i> .	<i>Agrobacterium</i> cepa EH4105.	0.0026%	Callos o células en suspensión.	No determinada.	Cheon et al., 2004.

Tabla VIII. Citocinas expresadas en organelos de plantas transgénicas

Citocina.	Planta transgénica.	organelo.	Nivel de expresión.	Tipo de tejido analizado.	Evaluación de citocina recombinante.	Referencia.
ct-prIL-10. 6 His (C-terminal)	Tabaco.	Cloroplasto.	43 ng/mg de proteína total soluble.	Tercera hoja del ápice de plantas con 6-7 hojas.	Ensayos de proliferación de mastocitos MC/9.	Menassa et al., 2004.
IL-10. 6	Tabaco.	Cloroplasto.	7 ng/mg de proteína total soluble.			
IL-10	Tabaco.	Mitocondria.	0.1 ng/mg de proteína total soluble.	Tercera hoja del ápice de plantas con 6-7 hojas.	Ensayos de proliferación de mastocitos MC/9.	Menassa et al., 2004.
IFN- $\alpha$ 2b	Tabaco.	Cloroplasto.	Aprox. 20% de proteína total soluble o 3 mg/g	Hoja fresco). (peso	Ensayos de inhibición de la replicación del virus de la estomatitis y la capacidad de expresión de antígenos clase I del MHC en esplenocitos y células Natural Killer. Evaluación de su capacidad protectora en ratones inoculados con una línea celular tumoral metastásica.	Arten et al., 2007.

## BIBLIOGRAFÍA

Aok., N., Xing, Z. 2004. Use of cytokines in infections. *Expert in Opinion on Emerging Drugs*, 9:223-236.

Arlen, P. A., Falconer, R., Cherukumilli, S., Cole, A., Cole, A. M., Oishi, K. K., Daniell, H. 2007. Field production and functional evaluation of chloroplast-derived interferon-alpha2b. *Plant Biotechnology, J.* 5: 511-525.

Bajcetic, M., Zigon, N., Samardzic, R., Belesliji, D. B. 1998. Alpha interferons- new therapeutic modalities. *Med. Pregl*, 51:135-139.

Chen, T. L., Lin, Y. L., Lee, Y. L., Yang, N. S., Chan, M.T. 2004. Expression of bioactive human interferon-gamma in transgenic rice cell suspension cultures. *Transgenic Research*, 13: 499-510.

Cheon, B. Y., Kim, H. J., Oh, K. B., Bahn, S. C., Ahn, J.H., Choi, J.W., Ok, S. H., Bae, J.M., Shin, J. S. 2004. Overexpression of human erythropoietin (EPO) affects plant morphologies: retarded vegetative growth in tobacco and male sterility in tobacco and *Arabidopsis*. *Transgenic Research*, 13:541-549.

Edelbaum, O., Stein, D., Holland, N., Gafni, Y., Livneh, O., Novick, D., Rubinstein, M., Sela, I. 1992. Expression of active human interferon-beta in transgenic plants. *Journal Interferon Research*, 12: 449-453.



Fisher, R., Emans, N. 2000. Molecular farming of pharmaceutical proteins. *Transgenic Research*, 9:279-299.

Goldstein, D. A., Thomas, J. A. 2004. Biopharmaceuticals derived from genetically modified plants. *Quarterly Journal Medicine*, 97:705-716.

Gutiérrez-Ortega, A., Ávila,-Moreno, F., Saucedo-Arias, L. J., Sánchez-Torres, C., Gómez-Lim, M. A. 2004. Expression of a single-chain human interleukin-12 gene in transgenic tobacco plants and functional studies. *Biotechnology & Bioengineering*, 85:734-740.

Hiddemann, W., Griesinger, F., Unterhalt, M. 1998. Interferon alfa for the treatment of follicular lymphomas. The *Cancer Journal from Scientific American*. *Suppl.* 2:S13-8.

Hogaboam, C. M., Bone-Larson, C., Matsukawa, A., Steinhäuser, M. L., Blease, K., Lukacs, N. W., Kunkel, S. L. 2000. Therapeutic use of chemokines. *Current Pharmaceutical Design*, 6: 651-663.

James, E. A., Wang, C., Wang, Z., Reeves, R., Shin, J. H., Magnuson, N. S., Lee, J. M. 2000. Production and characterization of biologically active human GM-CSF secreted by genetically modified plant cells. *Protein Express. Purification*, 19:131-8.

Kishimoto, T. 1993. Diseases associated with cytokine dysregulation. *Nippon Sanka Fujinka Zasshi*, 45: 724-734.

Kuby, J. 2001. Immunology. 4<sup>th</sup>. Edition. W.H. Freeman and Company-New York, United States. Pp. 304-305.

Kwon, T. H., Seo, J. E., Kim, J., Lee, J. H., Jang, Y. S., Yang, M. A. 2003. Expression and secretion of the heterodimeric protein interleukin-12 in plant cell suspension culture. *Biotechnology & Bioengineering*, 81:870-875.

Kwon, T. H., Kim, Y. S., Lee, J. H., Yang, M. S. 2003. Production and secretion of biologically active human granulocyte-macrophage colony stimulating factor in transgenic tomato suspension cultures. *Biotechnology Letters*, 25:1571-1574.

Lee J. H., Kim, N. S, Kwon, T. H., Jang, Y. S., Yang, M. S. 2002. Increased production of human granulocyte-macrophage colony stimulating factor (hGM-CSF) by the addition of stabilizing polymer in plant suspension cultures. *Journal Biotechnology*, 96:205–211.

Lee, J. H, Kim, N. S., Kwon, T. H., Yang, M. S. 2002. Effects of osmotic pressure on production of recombinant human granulocyte-macrophage colony stimulating factor in plant cell suspension culture. *Enzyme Microbial Technology*., 30:768–773.

Ma, J. K. C., Drake, P. M. W., Christou, P. 2003. The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. *Nature Reviews Genetic*, 4: 794-805.

Ma, S., Huang, Y., Davis, A., Yin, Z., Mi, Q., Menassa, R., Brandle, J. E., Jevnikar, A. M. 2005. Production of biologically active human interleukin-4 in transgenic tobacco and potato. *Plant Biotechnology Journal*, 3: 309-318.

Magnuson, N. S., Linzmaier, P.M., Reeves, R., An, G., HayGlass, K., Lee, J. M. 1998. Secretion of biologically active human interleukin-2 and interleukin-4 from genetically modified tobacco cells in suspension culture. *Protein Expression & Purification*, 13:45-52.

Menassa, R., Nguyen, V., Jevnikar, A., Brandle, J. 2001. A self-contained system for the field production of plant recombinant interleukin-10. *Molecular Breeding*, 8:177-185.

Menassa, R., Kennette, W., Nguyen, V., Rymerson, R., Jevnikar, A., Brandle, J. 2004. Subcellular targeting of human interleukin-10 in plants. *Journal Biotechnology*, 108:179-183.

Nissim, A., Gofur, Y., Vessillier, S., Adams, G., Chernajovsky, Y. 2004. Methods for targeting biologicals to specific disease sites. *Trends Molecular Medicine*, 10:269-274

Ohya, K., Matsumura, T., Ohashi, K., Onuma, M., Sugimoto, C. 2001. Expression of two subtypes of human IFN-alpha in transgenic potato plants. *Journal Interferon Cytokine Research*, 21:595-602.

Ohya, K., Itchida, N., Ohashi, K., Onuma, M., Sugimoto, C. Matsumura, T. 2002. Expression of biologically active human tumor necrosis factor-alpha in transgenic potato plant. *Journal Interferon Cytokine Research*, 22:371-378.

Park, Y. and Cheong, H. 2002. Expression and production of recombinant human interleukin-2 in potato plants. *Protein Expression & Purification*, 25:160-165

Saks, S and Rosenblum, M. 1992. Recombinant human TNF-alpha: preclinical studies and results from early clinical trials. *Immunology Series*, 56:567-587.

Sardana, R.K., Alli, Z., Dunadi, A., Tackaberry, E. Panahi, M., Narayanan, M., Ganz, P., Altosaar, I. 2002. Biological activity of human granulocyte-macrophage colony stimulating factor is maintained in a fusion with seed glutelin peptide. *Transgenic Research*, 11:521-531.

Sawahel, W. A. 2002. The production of transgenic potato plants expressing human alpha-interferon using lipofectin-mediated transformation. *Cellular Molecular Biology Letters*, 7:19-29

Shin, J. Y., Hong, S. Y., Kwon, T. H., Jang, Y. S., Yang, M. S. 2003. High level of expression of recombinant human granulocyte-macrophage colony stimulating factor in transgenic rice cell suspension culture. *Biotechnology & Bioengineering*, 82:778-783.

Soderkis, R. G. and Lee, J. M. 2005. Enhanced production of recombinant proteins from plant cells by the application of osmotic stress and protein stabilization. *Plant Cell Reports*, 24:127-132

Theze, J. 1999. The cytokine network and immune functions. Edited: Jacques Theze. Oxford. Oxford University.

Trichieri, G. and Scott, P. 1999. Interleukin-12: Basic principles and clinical applications. *Current Topics in Microbiology & Immunology*, 238:57-78.

Turchinovich, A. A., Deineko, E. V., Filipenko, M. L., Khrapov, E. A., Zagorskaya, A. A., Filipenko, E. A., Sennikov, S. V., Kozlov, V. A., Shumnyi, V. K. 2004. Transgenic tobacco plants producing human interleukin-18. *Dokl Biochem Biophys*, 395:104-107.

Wang, M. L., Goldstein, C., Su, W., Moore, P.H., Albert, H. H. 2005. Production of biologically active GM-CSF in sugarcane: a secure biofactory. *Transgenic Research*, 14:167-178.

Yin, J., Li, G., Ren, X., Herrier, G. 2007. Selected what you need: A comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes. *Journal Biotechnology*, 127: 335-341.

Zhang, B., Yang, Y. H., Lin, Y. M., Rao, Q., Zheng, G. G., Wu, K. F. 2003. Expression and production of bioactive human interleukin-18 in transgenic tobacco plants. *Biotechnology Letters*, 25:1629-1635.

Zhou, X., Schmidtke, P., Mayer, C. U. 2005. Boosting interleukin-10 production: Therapeutic effects and mechanisms. *Current Drugs Targets-Immune Endocrine Metabolic Disorders*, 5:465-475.

Zhou, F., Wang, M. I., Albert, H. H., Moore, P. H., Zhu, Y. J. 2006. Efficient transient expression of human GM-CSF protein in *Nicotiana benthamiana* using potato virus X vector. *Applied Microbiology Biotechnology*, 72: 756-762.

Zhu, Z., Hughes, K. W., Huang, L., Sun, B., Liu, C., Li, Y. 1994. Expression of human alfa-interferon cDNA in transgenic rice plants. *Plant Cell, Tissue Organ Culture*, 36: 197-204.

## **XIX. GLOSARIO DE TÉRMINOS**

**ADN complementario:** El ADN complementario o ADNc es un ADN de cadena sencilla que se sintetiza a partir del ARNm maduro.

**Acetogeninas:** Sustancias cerosas que se encuentran en las hojas de la guanábana (*Annona muricata*). Estas sustancias tienen la propiedad de actuar selectivamente sobre las células cancerígenas, principalmente de tejidos blandos; de esa forma disminuyen y desaparecen los tumores. Sin embargo, no actúan sobre las células normales. Por eso se les considera una excelente quimioterapia natural que no conlleva los efectos indeseables de la quimioterapia tradicional.

**Alergia:** Es la hipersensibilidad a una sustancia específica que, si se inhala, se ingiere o se toca, produce síntomas con efecto perjudicial al organismo.

**Alimento transgénico:** Alimento proveniente de un organismo al que, a través de ingeniería genética, se le han incorporado genes de otras especies para producir una característica deseada.

**Angiosperma:** Plantas con flor, arbustivas, herbáceas, en cuyo consumo el ser humano y otros mamíferos basan su subsistencia.

**Anticuerpo:** Proteína (inmunoglobulina), que consiste de dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras idénticas, expresadas en la superficie de las células B. Cuando no han interactuado con un antígeno, son producidos y secretados por las células plasmáticas.

**Anticuerpo monoclonal:** Anticuerpo producido por una célula híbrida, producto de la fusión de un clon de linfocitos B descendiente de una célula madre única y una célula plasmática tumoral, que reconoce solamente una proteína o antígeno.

**Antígeno:** Sinónimo de inmunógeno, sustancia (extraña) que se une específicamente a un anticuerpo o a un receptor de células T.

**Antígeno recombinante:** Proteínas biológicamente activas sintetizadas por un organismo heterólogo, a través de técnicas de ingeniería genética, con un bajo o casi nulo riesgo de contaminación con proteínas tóxicas.

**Antihelmíntico:** Sustancia antiparasitaria que previene o destruye parásitos, helmintos.

**Antioxidante:** Elementos que tienen como función eliminar del organismo los radicales libres que se producen como resultado de la oxidación celular, también son capaces de eliminar microorganismos patógenos. Cuando el número de radicales libres aumenta, se desestabiliza el organismo y alteran el ADN de las células, impidiendo la renovación celular o alterando su funcionamiento. Los radicales libres se han asociado a enfermedades degenerativas del sistema circulatorio, cáncer y envejecimiento precoz.

**Apoplasto:** En las células vegetales, es el espacio entre la pared y el espacio intercelular, por el que circulan el agua y los solutos.

***Ascaris suum*:** Endoparásito nemátodo del cerdo, de color amarillo, que mide aproximadamente 30 cm de longitud, se aloja en el intestino delgado y puede migrar al estómago o las vías biliares.

***Ascaris galli*:** Nemátodo que se aloja y desarrolla en la mucosa intestinal de aves de corral (pollo, pavo, ganso) y silvestres (perdiz, urogallo, pato, faisán y buitre común).



**Baculovirus:** Grupo de virus específicos de artrópodos, con actividad bioinsecticida. Los baculovirus poseen ADN de doble cadena de aproximadamente 130 kb, son utilizados como vectores de expresión de genes eucarióticos.

**Biobalística:** Método por el cual el ADN es introducido en las células por medio de micropartículas aceleradas a velocidades supersónicas, que atraviesan la pared y la membrana celular de cualquier tipo de célula. Es un método ampliamente utilizado en la transformación genética de plantas.

**Bioflavonoides:** Dos de las formas más activas son la hesperidina y la rutina. El ascorbato de calcio es una forma estabilizada (menos ácida) de la vitamina C.

**$\beta$ -glucuronidasa:** Enzima que separa las moléculas de ácido glucorónico a través del rompimiento de enlaces glucosídicos.

**BLS-KETc1:** Quimera recombinante del péptido protector KETc1 del cisticerco de *Taenia crassiceps* fusionado a la enzima lumazina sintetasa de *Brucella abortus*.

**Callos embriogénicos:** Tejido desdiferenciado y desorganizado, a partir del cual las células pueden volverse a diferenciar en presencia de los reguladores de crecimientos adecuados.

**Cardiotónico:** Agente o medicamento que posee propiedades estimulantes sobre el corazón.

**Células competentes:** Células que se encuentran en un estado fisiológico que les permite captar ADN del medio exterior. Dicho estado es diferente para cada especie bacteriana y es determinado por la densidad celular del cultivo, la temperatura, el pH y los nutrientes del medio (fuentes de carbono, nitrógeno, iones).

**Células en suspensión:** Se refiere a cuando las células crecen sin anclaje a alguna superficie sólida.

**Céstodo:** Endoparásitos que se alojan en el tubo digestivo de los vertebrados, presentan un cuerpo largo y plano, en forma de cinta, constituido por segmentos o proglótidos, que carecen de un aparato digestivo.

**Cistein-proteinasas:** Grupo de enzimas proteolíticas lisosomales que desempeñan un papel importante en diversos procesos celulares.

**Citocinas:** Proteínas de bajo peso molecular que regulan la intensidad y duración de la respuesta inmune. Inducen una variedad de efectos sobre los linfocitos y otras células de la respuesta inmune.

**Clona:** Grupo de células originadas a partir de divisiones sucesivas de una sola célula progenitora.

**Cloroplasto:** Orgánulo celular que presentan una cubierta constituida por dos membranas concéntricas. En su espacio interno contienen los tilacoides, donde se realiza la fotofosforilación.

**Codón de iniciación:** Secuencia de ADN o ARN de tres nucleótidos (codón) donde inicia la traducción del ARN mensajero. En el ADN se encuentra el codón «ATG» (adenosina-timidina-guanosina) y en el ARN mensajero es «AUG» (adenosina-uridina-guanosina). Todas las proteínas eucariotas primarias poseen en su extremo amino terminal una metionina, aminoácido correspondiente al codón de inicio.

**Codón de terminación:** Es el codón de termino, sin sentido o “stop” que en el código genético no codifica para aminoácido alguno. Su función es acotar el mensaje descifrado por el ADN que dará lugar al ARN mensajero. De este modo se limita la

síntesis del ARNm en el extremo 3' (marco abierto de lectura de los genes). Existen tres codones de terminación, «UAG» (codón ámbar); «UGA» (codón ópalo); y «UAA» (codón ocre).

**Cromoplasto:** Orgánulos de las células vegetales que almacenan los pigmentos de los colores, anaranjado o rojo, de flores, raíces o frutos. Cuando son rojos se denominan rodoplastos.

**Co-transformación:** Proceso que involucra la transformación con dos o más agentes transformantes, de forma simultánea.

**Dalton:** Unidad de masa molecular. Un dalton =  $1.67 \times 10^{-24}$  g y corresponde al peso atómico del átomo de hidrógeno.

**Dicotiledónea:** Grupo de plantas de clase angiosperma, caracterizadas porque el embrión presenta dos cotiledones o un par de hojas primarias del embrión, que se encuentra dentro de la semilla. Las hojas casi siempre son pecioladas y con la nervación reticulada.

**Endotoxinas:** Componentes lipopolisacáridos de la pared celular de bacterias gramnegativas, funcionan como superantígenos y son responsables de efectos patogénicos.

**Efecto citotóxico:** Término utilizado para describir a algún agente o proceso que es tóxico a las células, suprime las funciones de la célula o le provoca la muerte.

**Efecto colateral:** Efecto no deseado de una medida terapéutica o medicina, provocada como consecuencia de una medicación o tratamiento.

**Embrión somático:** Embrión originado a partir de una o un grupo de células somáticas. Se comportan como un cigoto con la capacidad para formar una planta completa, pero no es el producto de la fusión de gametos.

**Emenagogo:** Sustancia que por sus efectos congestivos sobre los órganos pelvianos se emplea para provocar o aumentar la menstruación.

**Explantos:** Porciones de tejido, células en suspensión, protoplastos, esporas, granos de polen o semillas. Explantos como los meristemos apicales y las yemas axilares son genéticamente muy estables y se utilizan para producir múltiples clones de una forma o variedad. Las yemas adventicias son genéticamente inestables y producen un alto grado de variabilidad.

**Extracto soluble total:** Fracción soluble de un extracto celular obtenido por homogenización de células y posterior centrifugación, para eliminar los componentes particulados (membranas y organelos). Contiene tRNA con aminoácidos, ribosomas y factores proteicos solubles.

**Febrífugo:** Sustancia que hace disminuir la fiebre, por ejemplo: el ácido acetilsalicílico, la dipirona y el paracetamol.

**Fago filamentoso:** El fago M13 o F1 mantienen todas las características de los plásmidos y tiene la capacidad de producir ADN monocatenario.

**Fago M13:** Fago filamentoso de *E. coli*, contiene ADN de cadena sencilla (+) y está envuelto en proteínas virales. Durante la infección, la cadena (+) sirve de molde para la síntesis de la cadena (-). La doble cadena se sintetiza hasta alcanzar aproximadamente 200 copias. A partir de ahí, la cadena (-) no se replica más y la

cadena (+) es cubierta por las proteínas de la cápsula para formar nuevas partículas virales, hasta llevar a una lisis celular y su consecuente liberación.

**Fitohemaglutinina:** Conocida como PHA (*phytohemagglutinin*). Es una lectina distribuida entre la legumbres y algunas oleaginosas, como la soya (*Glycine max*), contienen un dominio tipo lectina y otro globular que "reconocen" a los carbohidratos y tiene la capacidad para aglutinar eritrocitos y leucocitos, además de estimular inespecíficamente la proliferación de células T.

**Gen reportero:** Gen cuyo producto es monitoreable o fácilmente cuantificable, por ejemplo; la cloramfenicol transacetilasa y la  $\beta$ -glucuronidasa.

**Hermafrodita:** Se denomina a un organismo que presenta ambos órganos sexuales, masculino y femenino, siendo capaz de producir gametos de ambos sexos al mismo tiempo. Rara vez se fecundan a sí mismos, pero llega a ocurrir, como en el caso de las tenias, que pueden autofecundarse.

***Hymenolepis diminuta*:** Parásito que en su estadio adulto se localiza en el intestino delgado de ratas y ratones, mide de 20 a 60 cm de longitud y el ancho aumenta en forma gradual, desde 0.5 a la región cervical, hasta 4 mm en el extremo distal. Posee un escólex con cuatro ventosas y un pequeño róstelo retráctil desprovisto de ganchos. Los proglótidos son cortos, anchos y poseen órganos genitales de ambos sexos que desembocan en un poro genital lateral. Los proglótidos grávidos se desprenden en el interior del intestino y salen al exterior por las heces, liberando los huevos.

**Incidencia:** Rapidez con la que ocurre una enfermedad, también es la frecuencia con que se agregan (desarrollan o descubren) nuevos casos de una

enfermedad/afección durante un período específico de tiempo y en un área determinada.

**Inflamación:** Respuesta inespecífica que ocurre en los tejidos conectivos vascularizados para aislar y destruir a un agente dañino, así como reparar el tejido u órgano dañado.

**Inmunización:** Proceso para producir un efecto de inmunidad en un individuo.

**Inmunoestimulante:** Sustancia que aumenta las defensas inmunes inespecíficas.

**Inmunomodulador:** Sustancia que activan o debilitan su función.

**Inspección en lengua:** Palpación en la parte ventral de la lengua de los cerdos para detectar a los cisticercos de *T. solium*. Este método de diagnóstico debe realizarse por un veterinario experto, presenta un 50% de sensibilidad, debido a que puede confundirse con otras lesiones.

**Látex de papaya:** Líquido denso que exuda al ser sesgado o puncionado el epitelio del árbol de la papaya. Contiene una alta concentración de la enzima papaína.

**Macrófago:** Leucocito fagocito mononuclear que participa en la respuesta inmune innata y adaptativa. Hay diferentes tipos de macrófagos, algunos migran y otros permanecen fijos a los tejidos.

**Microtubérculo:** Fragmento obtenido *in vitro* a partir de un tubérculo inicial.

**Morbilidad:** Se refiere a los efectos de una enfermedad en una población en el sentido de la proporción de personas que la padecen en un sitio y tiempo determinado. Existe la tasa de morbilidad, que es determinada por la frecuencia de la enfermedad en proporción a una población y requiere se especifique el periodo y el

lugar donde se determinará. Las tasas de morbilidad más frecuentemente usadas son la prevalencia y la incidencia.

**Necropsia:** Disección anatómica de cadáveres para identificar la causa de su muerte.

**Nemátodos:** Gusanos redondos pseudocelomados. Existen especies de vida libre, marina, terrestre y especies parásitas de plantas y animales, incluyendo el hombre.

**Neurocisticercosis:** Enfermedad del sistema nervioso central causada por el cisticerco de *T. solium*, puede producir síntomas como la epilepsia crónica o ser asintomática.

**Niclosamida:** Medicamento del grupo denominado antihelmínticos se usa en el tratamiento infecciones causadas por lombrices.

**Panalérgenos:** Proteínas ampliamente extendidas en el reino vegetal, implicadas en funciones biológicas importantes (generalmente de defensa), por lo cual sus secuencias y estructuras están altamente conservadas. Los tres grupos mejor conocidos son los alérgenos homólogos de Bet v 1, las profilinas y las proteínas transportadoras de lípidos (PTL). Son quitinasas de clase I, que al poseer un dominio heveína N-terminal reaccionan de forma cruzada con el alérgeno principal del látex, Hev b 6.

**Pantropical:** Se refiere a un área de ocurrencia geográfica. Para que la distribución de un taxón sea pantropical debe aparecer en regiones tropicales en todos los continentes mayores.

**Péptido:** Consiste en la unión de un bajo número de aminoácidos para formar un oligopéptido o polipéptido, si es menor o mayor a 10 aminoácidos, respectivamente. Generalmente tienen un peso molecular de diez a doce mil daltones.

**Pleiotropía:** Fenómeno por el cual un solo gen es responsable de efectos fenotípicos o caracteres distintos y no relacionados. Ejemplo de ello es la fenilcetonuria, en la cual un solo gen varía la producción de una enzima y esto produce deficiencia intelectual, problemas en la coloración de la piel, etc.

**Praziquantel:** Medicamento que se utiliza para tratar infecciones causadas por algunos parásitos intestinales.

**Prevalencia:** Es la frecuencia de todos los casos (antiguos y nuevos) de una enfermedad patológica en un momento dado del tiempo (prevalencia de punto) o durante un periodo definido (prevalencia de periodo).

**Procariote:** Tipo de célula que no posee sistemas membranales internos.

**Promotor:** Sitio de reconocimiento de la RNA polimerasa en las células procariotes o en eucariotes por factores transcripcionales, para el inicio de la transcripción.

**Proteína:** Cadena que consta de la unión de más de 100 aminoácidos. Existen dos clases de proteínas, las monoméricas y las multiméricas, que consisten de una cadena o en la unión de varias cadenas polipeptídicas, respectivamente.

**Protoplasto:** Célula vegetal o bacteriana desprovista de pared celular.

**Sarcotesta:** Es la cubierta externa de la semilla.

**Semiperenne:** Planta, árbol o arbustos que no pierden sus hojas en todo el año, lo contrario a lo que le pasa con las especies caducifolias, que pierden sus hojas en determinadas épocas del año y luego les nacen otras nuevas.



**Sinergismo:** Acción combinada de varias sustancias químicas.

**T-DNA:** Secuencia de ADN del plásmido Ti que es transferida al genoma de la célula vegetal durante el proceso de infección por *Agrobacterium tumefaciens*.

**Taenia ovis:** Parásito de la clase céstoda. La forma adulta o tenia infecta a perros y zorros y, la forma larvaria o cisticerco se encuentra en el músculo de las ovejas, causa severas pérdidas económicas debido al decomiso de las canales infectadas.

**Taenia saginata:** Parásito de la clase céstoda, cuya forma adulta vive en la primera porción del intestino delgado del ser humano, donde pueden llegar alcanzar hasta los 10-12 m de longitud. Junto con *T. solium*, es una de las especies conocidas como lombriz solitaria; produce la teniasis, cuya fase larvaria ocasiona la cisticercosis, generalmente asintomática, localizada en la musculatura del ganado vacuno.

**Transferencia horizontal de genes (TGH):** También conocida como transferencia de genes lateral (TGL), proceso en el que un organismo transfiere material genético a otra célula que no es descendiente. Por el contrario, la transferencia vertical ocurre cuando un organismo recibe material genético de sus ancestros, por ejemplo de sus padres o de una especie de la que ha evolucionado. La transferencia artificial de genes horizontal es una forma de ingeniería genética.

**Transgénico:** Se refiere a organismos que han sido modificados genéticamente, mediante la introducción de nuevas secuencias de ADN en la línea germinal.

**Tremátodo:** Gusanos platelmintos, algunos de los cuales infectan al hombre y tienen ciclos de vida complejos con estadíos que afectan a una o más especies (hospedadores).

**Vacuna:** Preparación de material antigénico utilizado para inducir inmunidad contra organismos patógenos.

**Vacunación:** Administración intencional de parte de un patógeno, para inducir una respuesta inmune específica que proteja al individuo ante una subsiguiente exposición al mismo patógeno.

**Variedad:** Se denomina variedades a los grupos que provienen de una misma especie, con características comunes y rasgos de diferenciación secundarios: Ej: el almendro tiene variedades de fruto dulce y amargo.

**Virus de la mancha anular:** Pertenece al grupo de los potyvirus. Es transmitido de plantas infectadas a plantas sanas, no requiere un periodo de incubación para ser transmitido a través de insectos chupadores del grupo de los áfidos, como *Myzus persicae*, *Aphis gossypii*, *A. neeri*, *A. citricola* y *A. spiraecola*. Las plantas infectadas tienen un menor número de frutos y presentan manchas en forma de anillos, que merman su calidad comercial.