



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL



**ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN**

**EVALUACION DE LA CAPACIDAD INMUNOGENICA DE LA VACUNA
ORAL S3Pvac - PAPAYA CONTRA LA CISTICERCOSIS PORCINA**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS EN INVESTIGACION CLÍNICA

PRESENTA:

OLIVIA FUENTES RÍOS

DIRECTOR DE TESIS: DR. EDGAR ABARCA ROJANO

TUTOR EXTERNO: DRA. MIRNA A. HUERTA OREA



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

SIP-14-BIS

En la Ciudad de México siendo las 8:00 horas del día 28 del mes de Julio del 2011 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de la E.S.M para examinar la tesis titulada:

"EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD INMUNOGENICA DE LA VACUNA ORAL S3Pvac-papaya CONTRA LA CISTICERCOSIS PORCINA"

Presentada por la alumna:

Fuentes	Ríos	Olivia
Apellido paterno	Apellido materno	Nombre(s)
		Con registro:
		A 0 7 0 5 0 1

aspirante de:

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN INVESTIGACIÓN CLÍNICA

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

Dr. Edgar Abarca Rojano

Dra. Mirna Aurea Huerta Orea

Dra. María del Carmen Castillo Hernández

Dr. Eleazar Lara Padilla

Dr. José Leopoldo Aguilar Faisal

Dr. Rafael Campos Rodríguez

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

Dr. Eleazar Lara Padilla



SUPERIOR DE MEDICINA
I.P.N.
SECCION DE ESTUDIOS DE POSGRADO
E INVESTIGACION
CONTROL ESCOLAR



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México el día 28 del mes julio del año 2011, el que suscribe Olivia Fuentes Ríos alumna del Programa de MAESTRÍA EN CIENCIAS EN INVESTIGACIÓN CLÍNICA con número de registro A070501 adscrito a La Escuela Superior De Medicina, manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dr. Edgar Abarca Rojano, Dra. Mirna Aurea Huerta Orea y cede los derechos del trabajo intitulado, “EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD INMUNOGENICA DE LA VACUNA ORAL S3Pvac-papaya CONTRA LA CISTICERCOSIS PORCINA”, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección oliviafuentes@gmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.


Olivia Fuentes Ríos

Nombre y firma



AGRADECIMIENTOS

A mis directores de tesis Dr. en C. Abarca Rojano Edgar y la Dra. en C. Huerta Orea Mirna A. por el apoyo brindado y por creer en mí.

Agradezco de manera muy especial a mi asesora experta la Dra. en C. Díaz y Orea Alicia M. Por apoyarme en todo momento en mi proyecto y en mi vida personal, por guiarme y asesorarme.

Al PhD. Quet Fabrice por su apoyo incondicional y siempre oportuno como profesional y como amigo, asesorándome en la parte estadística de esta tesis, así mismo por sus comentarios y sugerencias en la misma.

A las doctoras Sciutto Conde Edda y Hernández Marisela por proporcionarnos la vacuna S3Pvac-papaya y su apoyo metodológico.



DEDICATORIAS

A la estrella de mi vida, mi padre, quien me ha dado las bases necesarias para seguir a delante día a día y cumplir con mis objetivos, luchando por lo que deseo.

A mi hermana Lilia Fuentes Ríos por apoyarme siempre, por aconsejarme, escucharme y estar a mi lado en cada momento, también a mi maravillosa sobrina Ma. Nazareth por ser el rayo de sol que llena mi vida de alegrías.

A mis amigos y personas especiales, que simplemente por el hecho de estar en mi vida la hacen más feliz, por apoyarme y darme palabras de aliento.



INDICE

RESUMEN	16
ABSTRACT	18
I. INTRODUCCIÓN	20
II. ANTECEDENTES	22
1. Antecedentes generales	22
A. Morfología del parásito	23
B. Ciclo biológico	27
2. Antecedentes específicos	30
A. Desarrollo de un modelo experimental para la identificación de los antígenos para su posible aplicación contra la cisticercosis	31
B. La inmunización con antígenos de <i>T. crassiceps</i> o de <i>T. solium</i> protege contra la cisticercosis murina	32
C. La inmunización con antígenos de cisticercos de <i>T. crassiceps</i> protege en contra de la cisticercosis porcina	33
D. Identificación de fracciones de antígenos protectores del cisticerco de <i>Taenia</i> <i>crassiceps</i>	34
E. Identificación de antígenos recombinantes protectores contra cisticercosis. .	35
F. Evaluación en el modelo murino de la capacidad protectora de los antígenos recombinantes.	36



G. Identificación de epítopes para el diseño de una vacuna sintética constituida por 3 péptidos.....	37
H. Identificación de los péptidos protectores KETc1 y KETc12.....	38
I. Inmunolocalización de los epítopes protectores.....	38
J. Evaluación de la capacidad protectora de la vacuna compuesta por los tres epítopes identificados en cerdos expuestos al desafío natural.....	39
K. Expresión en Fagos Filamentosos.....	40
L. Expresión de vacunas en callos transgénicos de plantas.....	42
M. Expresión de la vacuna S3Pvac en clonas transgénicas embriogénicas de papaya (ETgpC).....	43
N. Diseño de vacunas genéticas y la eficiencia de transformación.....	44
O. Vacunación con S3Pvac-Papaya contra T. crassiceps en murinos.....	46
III. JUSTIFICACIÓN.....	48
IV. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	50
V. HIPOTESIS.....	50
VI. OBJETIVOS.....	50
1. Objetivo general.....	50
2. Objetivos específicos.....	51
VII. MATERIALES Y MÉTODOS.....	51
A. Tamaño de la Muestra.....	52



B. Método de recolección de datos.....	52
C. Procedimientos.....	53
D. Procesamiento de las muestras.....	54
D.1. Evaluación de la Respuesta Inmune Humoral por medio de la determinación del título de anticuerpos IgG	54
D.2. Evaluación de la respuesta Inmune Celular por medio de proliferación celular de linfocitos.....	56
E. Descripción Operativa del Estudio.....	57
F. Procesamiento estadístico.....	58
G. Operalización de las variables.....	59
VIII. RESULTADOS.....	60
1. Organigrama.....	60
2. Comparación entre los grupos vacuna y placebo (control) a los diferentes tiempos del estudio.....	61
3. Porcentaje de porcinos con elevación de anticuerpos entre los grupos vacuna y control a los diferentes tiempos del estudio.	65
4. Proliferaciones entre los grupos vacuna y control a los diferentes tiempos del estudio, con diferentes antígenos	67
5. Comentarios sobre los resultados	70



A. Respuesta humoral	70
B. Respuesta celular.....	71
IX. DISCUSION	72
1. Limitaciones.....	75
2. Puntos positivos	76
X. CONCLUSIONES	77
XI. BIOÉTICA	78
XII. BIBLIOGRAFÍA	79
XIII. ANEXOS	91
1. DETERMINACION DE PREVALENCIA DE CISTICERCOSIS PORCINA EN EL ESTADO DE PUEBLA.....	91
2. CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN EL PROYECTO DE INVESTIGACION.....	92
3. BASE DE DATOS.....	93



INDICE DE FIGURAS, TABLAS Y GRAFICAS

Figura 1: Distribución Mundial de la Cisticercosis (OMS).....	23
Figura 2: a) Estructura de <i>T. solium</i> b) Escólex de la <i>Tenia solium</i> con ventosas, róstelo y corona de ganchos c) Escólex de la <i>Tenia solium</i>	24
Figura 3: Proglótidos. a) Proglótido maduro de <i>T. solium</i> teñido con colorante india b) Proglótido grávido de <i>T. solium</i> en donde se observa el conducto uterino.....	25
Figura 4: a) Huevecillo de <i>Taenia sp</i> b) cisticercos de <i>T. solium</i> c) Huevos viables y no viables de <i>Taenia sp</i>	26
Figura 5: Ciclo biológico de la <i>Taenia Solium</i>	28
Figura 6: Ciclo biológico de la <i>Taenia crassiceps</i>	32
Figura 7: Estructura de bacteriófago que muestra la hebra de DNA y las proteínas de cubierta (pIII, pVI, pVII, pVIII, pIX).....	41
Figura 8. Estrategia para la expresión de la vacuna S3Pvac y papaya (46).....	45
Tabla 1: Definición de la variable y escala de medición.....	59
Figura 9: Organigrama del estudio.....	60
Tabla 2: Características iniciales (a tiempo T0) de los lechones por grupo.....	62
Tabla 3: Resultados del análisis de la repuesta humoral y celular al tiempo T15 por grupo.....	63



Tabla 4: Resultados del análisis de la respuesta humoral y celular al tiempo T30 por grupo.....	64
Grafica 1. Porcentaje de título de anticuerpos positivos para el tiempo 0 con la vacuna como antígeno.....	65
Grafica 2. Porcentaje del número de porcinos con títulos de anticuerpos positivos y negativos en el tiempo 15.....	66
Grafica 3. Porcentaje de porcinos con títulos de Anticuerpos positivos y negativos al tiempo 30.....	66
Grafica 4. Densidades ópticas obtenidas por las células sin estimular a los diferentes tiempos en cada grupo.....	67
Grafica 5. Índices de estimulación y umbral de estimulación (línea) con Concanavalina A.....	68
Grafica 6. Índices de estimulación y umbral de estimulación (línea) con el AgTS a los diferentes tiempos en cada grupo.....	68
Grafica 7. Índices de estimulación (IS) obtenidos con VP a los diferentes tiempos en cada grupo y el umbral de estimulación (línea).....	69
Grafica 8. Índices de estimulación para células estimuladas con NP y umbral de estimulación (línea) por grupo.....	69



GLOSARIO

Anticuerpo

Proteína protectora producida por la respuesta inmune del individuo, ante la estimulación inducida por un agente extraño.

Antígeno

Cualquier sustancia reconocida por el organismo como extraña, que estimula la respuesta inmune.

cADN

Es el ADN complementario, de cadena sencilla. Se sintetiza a partir de una hebra simple de ARNm maduro. No hay secuencias intrónicas ya que se han eliminado debido al proceso de maduración que sufre el mRNA primario. Por ello contienen una secuencia codificante continua.

Concanavalina A (Con A)

Es una proteína globular de origen vegetal, clasificada como una lectina, es una excelente inductor de la mitosis en linfocitos.

ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay)

Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas, es un examen de laboratorio comúnmente usado para detectar anticuerpos en la sangre.



Escólex

Primero de los segmentos de que está formado el cuerpo de los gusanos cestodos. Es más abultado que los que lo siguen inmediatamente, y está provisto de ventosas, y a veces también de ganchos, con los que el animal se fija al cuerpo de su huésped.

Fago filamentoso

Es un tipo de bacteriófago que tiene la forma de una barra filamentosa. Los fagos filamentosos por lo general contienen un genoma de una sola hebra de ADN y son capaces de infectar a las bacterias.

Inmunoglobulina

Anticuerpo sintetizado por los linfocitos especializados B en respuesta a un antígeno.

Linfocito

Leucocito formado en ganglios linfáticos. Se distinguen dos tipos: B, que producen anticuerpos circulantes y T, responsable de la respuesta inmune celular.

Proglótido

Segmentos que comprenden la tercera región del cuerpo de los céstodos adultos denominados estróbilo, cada segmento contiene órganos reproductores de ambos sexos.



Respuesta anamnesica o Respuesta inmune secundaria

Incremento del título de anticuerpos ante el segundo encuentro con el antígeno en cuestión.

Vector Uni-ZapXR

Es un vector de clonación, expresión y caracterización de genes.

Ventosa

Órgano de adhesión modificado según el grupo de organismo se encuentra situadas en el escólex del parásito.



ABREVIATURAS

Ag TS: Antígeno de *Taenia solium*

Con A: Concanavalina A

EmpCL: Línea de células embriogénicas de papaya (callos embriogénicos de papaya)

gen GUS: gen reportero β -glucuronidasa

HygR: gen de resistencia a higromicina

IgG: Inmunoglobulina G

KmR: gen resistente a kanamicina

NP: planta no transgénica

T.solium: *Taenia solium*

VP: vacuna S3Pvac-papaya



RESUMEN

INTRODUCCION: La Teniosis y cisticercosis son parasitosis causadas por *Taenia solium*, siendo endémicas en países subdesarrollados, en donde afectan principalmente a la salud humana y a porcinos criados en ambientes rústicos. Con el fin de controlar este parásito, se han desarrollado vacunas experimentales. La vacuna recombinante S3Pvac-papaya se basa en la expresión de tres péptidos; KETc12, KETc1 y KETc7 en callos embriogénicos de papaya, los cuales han demostrado inducir una respuesta inmune en murinos.

OBJETIVO: Evaluar la respuesta inmune celular y humoral en cerdos vacunados con S3Pvac-papaya, a través de la proliferación celular linfocítica y por ELISA.

MATERIAL Y METODOS: Se realizó un estudio experimental aleatorizado de una vacuna contra cisticercosis porcina vacuna S3Pvac-papaya, prospectivo, longitudinal con 30 porcinos de 2 a 3 meses de edad de la comunidad rural (San-Andrés Azumiatla) fueron incluidos: 16 porcinos en el grupo vacuna y 15 en el grupo placebo. La administración de la vacuna fue por vía oral, en 2 dosis de vacuna de 250 mg de cada péptido con intervalo de 15 días entre cada administración. Los cerdos fueron sangrados al tiempo 0 (basal), 15 y 30. Se determinó la capacidad proliferativa de las células linfoides periféricas, por la reducción de la sal de tetrazolio a formazan. La producción de anticuerpos específicos contra *Taenia solium* fue realizada por el ensayo inmunoenzimático revelado por medio de densidad óptica (ELISA).



RESULTADOS: La capacidad proliferativa de las células linfoides fué demostrada, con la prueba exacta de Fisher entre ambos grupos, en el día 15 ($p= 0.0085$) y 30 ($p=0.0192$), en donde encontramos una diferencia significativa. Así mismo en el día 15 aumento el titulo de anticuerpos en el grupo vacuna, en donde encontramos significancia estadística ($p= 0.0476$), pero no en el día 30.

CONCLUSIONES: La vacuna S3Pvac-papaya evaluada en porcinos demostró ser capaz de inducir una respuesta inmune celular, que en estudios futuros podríamos reevaluar con un tamaño de muestra más grande y con un seguimiento mayor. Planeando a futuro evaluar la capacidad protectora por medio de la infección con huevos de *T.solium* y así con certeza poderla considerar como una herramienta disponible para el control de la cisticercosis porcina

PALABRAS CLAVE: Cisticercosis, vacuna S3Pvac-papaya, respuesta inmune celular y humoral



ABSTRACT

INTRODUCTION: Taeniosis and cysticercosis caused by *Taenia solium*, are endemic in developing countries, where they mainly affect human health and rustic pig breeding. In order to control this parasite experimental vaccines have been developed. The recombinant S3Pvac-papaya vaccine, is based on the expression of three peptides; KETc12, KETc1 y KETc7, by embryogenic callus of papaya and has been shown to induce immune response in mice.

OBJECTIVE: Evaluate the cellular and humoral immune response in pigs vaccinated by S3Pvac-papaya, through lymphocytic cell proliferation and by ELISA.

MATERIALS AND METHODS: This work was a randomized vaccine trial against swine cysticercosis (candidate S3Pvac-papaya versus placebo). Thirty piglets from a rural community (San-Andrés Azumiatla) were included: sixteen in vaccine group and fifteen in placebo group. Administration of vaccine was done per os in pigs aged from 2 to 3 month in two dose of 250mg at 15 days of interval. Blood samples were collected at 0, 15 and 30 days after the last dose of vaccine. The peripheral T-Cell proliferative capacity was determined by the reduction of tetrazolium salt (tetrazolio a formazan). The production of specific antibodies directed against *Taenia solium* was evaluated by Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA).

RESULTS: The proliferative capacity of lymphoid cells, was found with Fisher's exact between groups, in day 15 ($p= 0.0085$) and day 30 ($p= 0.0192$), where we found



significant difference. Also on day 15 increased the antibody titer in the vaccine group, where we found statistical significance ($p = 0.0476$) but not at day 30.

CONCLUSIONS: S3Pvac-papaya vaccine is able to induce a cellular response, that future studies could assess a larger sample size and longer follow-up. Future plans to evaluate the protective capacity by infection with eggs and thus certainly *T.solium* that it can be considered as a tool available to control porcine cysticercosis.

KEY WORDS: Cysticercosis, S3Pvac-papaya vaccine, cellular and humoral immune response, *T. solium*



I. INTRODUCCIÓN

La *Taenia solium* es el platelminto responsable de la teniasis, siendo el hombre el único huésped definitivo natural del parásito en su forma adulta. Cuando se encuentran infectados humanos y porcinos por el metacestodo de la *T. solium*, ocasiona cisticercosis humana y a porcinos cisticercosis porcina. En México dichas parasitosis son endémicas, en el 2008 se informó de 360 casos de teniasis y 296 casos de cisticercosis humana, encontrándose en el estado de Jalisco 19% casos de cisticercosis humana y en Puebla 2.7% (1,2).

La cisticercosis humana y porcina son ocasionados por la ingesta de huevos (embrión hexacanto) de *T. solium*, la teniasis por su parte se origina al ingerir carne de cerdo contaminada con (el metacestodo de este parásito) el cisticerco (1,3).

La infección con huevos de *Taenia solium* se favorece con factores de riesgo como la exposición a las heces o la convivencia con un portador de la *Taenia*. La prevalencia y transmisión de la cisticercosis en humanos y porcinos está relacionada a factores sociales como la inadecuada higiene personal, bajas condiciones sanitarias, el bajo nivel económico de los individuos o comunidades, la falta de letrinas por lo que se ejerce el fecalismo al ras del suelo, así como la carencia de drenaje, la falta de tratamiento del agua potable, de calles pavimentadas, la incorrecta inspección en los rastros de la carne del porcino, aunado a la inadecuada



crianza de los cerdos de traspatio, los malos hábitos alimentarios del porcino y su ejercicio de la coprofagia que incrementan al dejarlos libres (4,5).

El indispensable rol que juegan los porcinos en el ciclo de vida del parásito, siendo el huésped intermediario ofrece la posibilidad de interferir con la transmisión a través de la vacunación en porcinos(5). Para tales propósitos se han desarrollado vacunas dirigidas a porcinos, entre las cuales se encuentra una vacuna basada en tres péptidos con capacidad protectora (KETc7, KETc1 y KETc12) que se encuentran extensamente distribuidos por las distintas fases del parásito, demostrando altos niveles de protección, la cual ofrece la posibilidad de explorar alternativas para el control y la prevención de teniosis/cisticercosis.



II. ANTECEDENTES

1. Antecedentes generales

La teniosis y cisticercosis ocasionadas por *Taenia solium* son problemas de salud pública que prevalecen tanto en áreas rurales como urbanas, encontrándose en África, Asia y en Latinoamérica particularmente en países en vías de desarrollo como México y Brasil, considerándose reemergente por la migración de individuos portadores de la *Taenia* en Estados Unidos y Europa. Asociándose en los países subdesarrollados a las prácticas tradicionales de crianza de cerdos, malas condiciones sanitarias e higiénicas, ignorancia y pobreza, así mismo una encuesta sugiere que un riesgo importante para adquirir la cisticercosis humana, es por medio del contacto cercano con un portador de *T. solium* y la auto-infección por carencia de medidas correctas de limpieza (6, 7, 8, 9).

La neurocisticercosis humana (NCC) es la infección del sistema nervioso central (SNC) causada por el metacestodo (el cisticerco) de *Taenia Solium*. En cuestiones de salud, se estima que cerca de 50 millones de habitantes en el mundo la padecen y 50 mil mueren al año por esta enfermedad. Esta parasitosis puede ser evitable y fue considerada en el 2000 como una prioridad de salud pública y una enfermedad a informar (10)

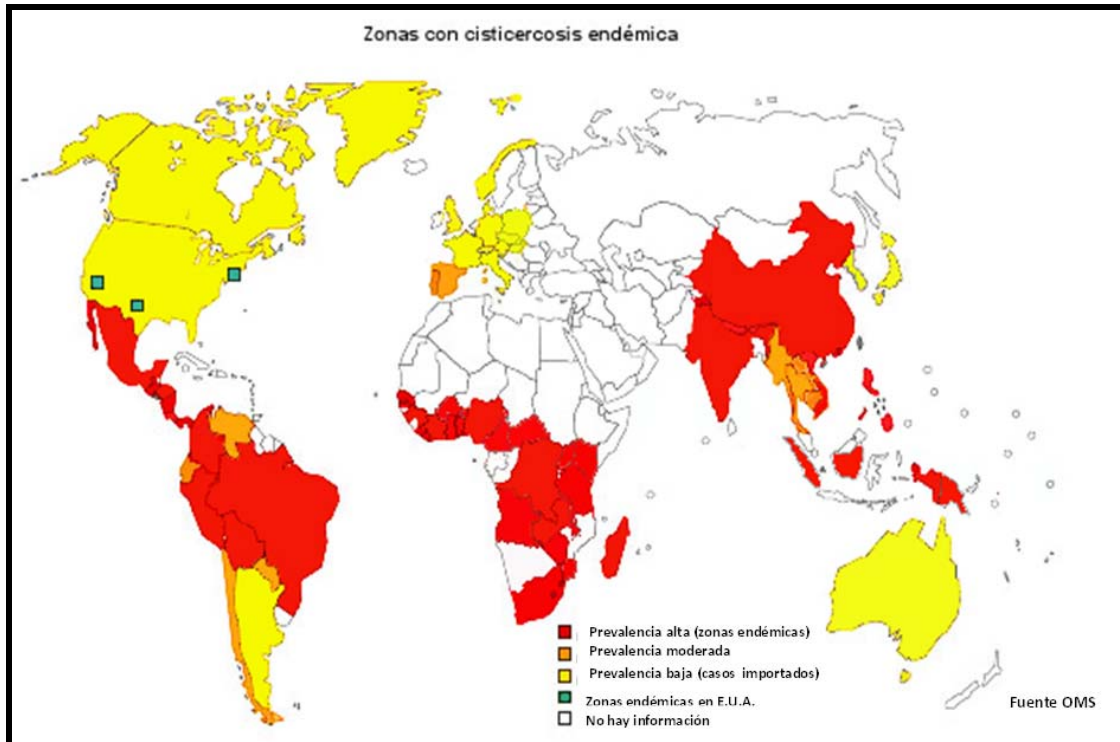


Figura 1: Distribución Mundial de la Cisticercosis (OMS)

A. Morfología del parásito

La *Taenia solium* es un cestodo hermafrodita, del *Phylum* de los *Platyhelminths*, clase *Cestoda*, orden *Cyclophyllidea*, familia *Taenidae*, genero *Taenia*, son gusanos aplanados, el cual en su estado adulto puede medir de 1.5-5 metros, es de color blanco-marfil (imagen 2a). Su escólex mide 1 mm de diámetro provisto de cuatro ventosas en forma de corona y un róstelo, con una doble corona de 22 a 32 ganchos que midiendo los pequeños de 110 a 140 micras y grandes de 160 a 180 micras (imagen 2b). (1)

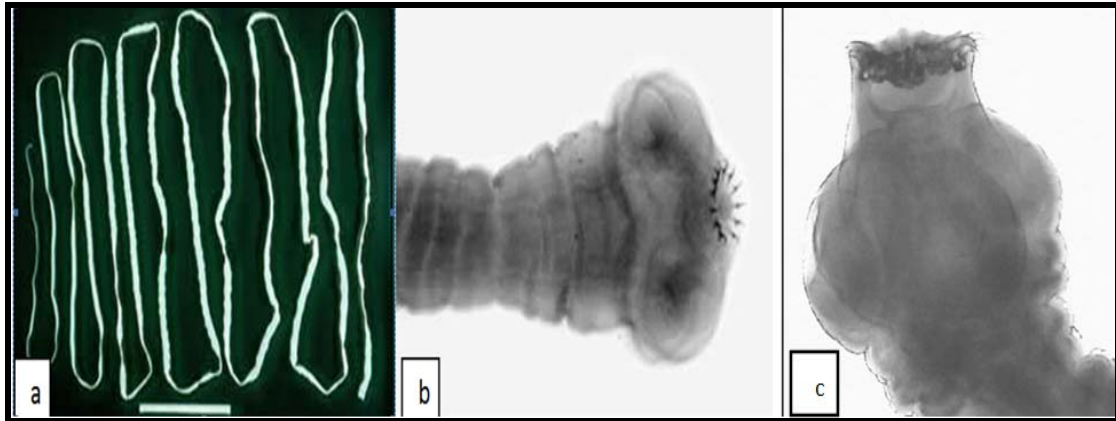


Figura 2: a) Estructura de *T. solium* adulta en donde se puede apreciar el color blanquecino y la cadena estrobilar.

b) Escólex de la *Tenia solium* con ventosas, róstelo y se aprecia la corona de ganchos. La figura 2b fue tomada de

http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Image_Library.htm

c) Escólex de la *Tenia solium*. Tomada de Laboratorio de Inmunoparasitología FM BUAP Huerta *et al* 2008.

La *Taenia solium* Posee un cuello corto y enseguida de este se encuentra el estróbilo constituido por tres tipos de proglótidos: inmaduros, maduros y grávidos (su maduración es conforme se alejan de la cabeza), encontrándose también a lo largo de esta cadena estrobilar los poros uterinos. En cada proglótido encontramos las ramas uterinas que frecuentemente son menos de doce. (1)

Los proglótidos maduros son cuadrangulares y presentan gónadas sexuales masculinas y femeninas, poros genitales unilaterales que se alternan en forma regular, los testículos confluyen por detrás de la glándula vitelógena, presentan un

ovario trilobulado, la bolsa del cirro alcanza el nivel del poro excretor y no existe esfínter vaginal (figura 3a).

Los proglótidos grávidos son más largos que anchos, presentan un útero grande con una rama a lo largo y puede tener de 7 a 12 ramificaciones laterales principales, que contienen de 50,000 a 100,000 huevos (figura3b). (1)

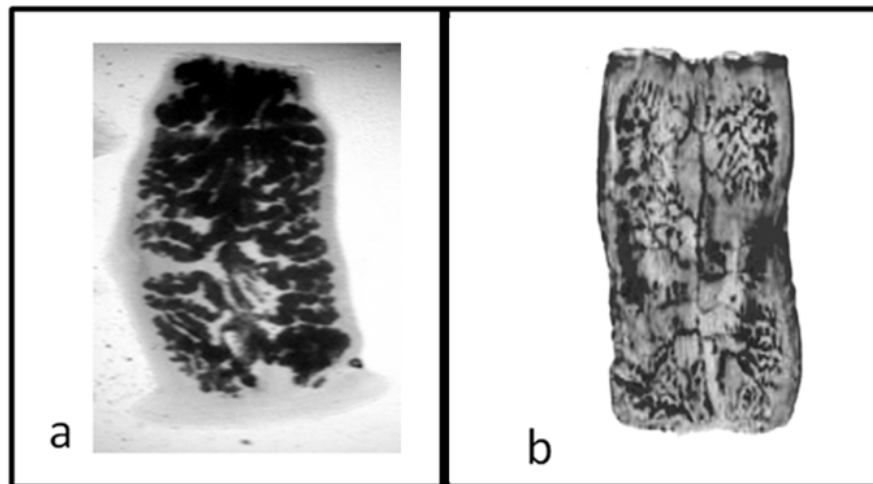


Figura 3: Proglótidos. a) Proglótido maduro de *T. solium* teñido con colorante india, en el cual se aprecian las ramas uterinas.

b) Proglótido grávido de *T. solium* en donde se observa el conducto uterino del que se desprenden las ramas uterinas en un número menor de 12. La figura 3a fue tomada de:

http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Image_Library.htm

Los huevos de *T. solium* son morfológicamente similares a los de otras especies de tenidos e idénticos a los de *T. saginata* incluyendo la *T. saginata asiática*, miden aproximadamente 40 μm de diámetro, son de paredes gruesas y radiadas que encierran al embrión hexacanto u oncósfera que es la forma infectante del parásito (figura 4a), el huevecillo eclosiona por acción de los jugos digestivos y se libera el hexacanto, desarrollándose a su fase larvaria o cisticerco. (1,11)

El cisticerco (*cysticercus cellulosae*) es una vesícula de color blanquecino, de forma esférica u ovalada, tiene membrana vesicular, su escólex se encuentra invaginado dentro de la vesícula, que mide de 0.4 – 3.5 cm (figura 4b).

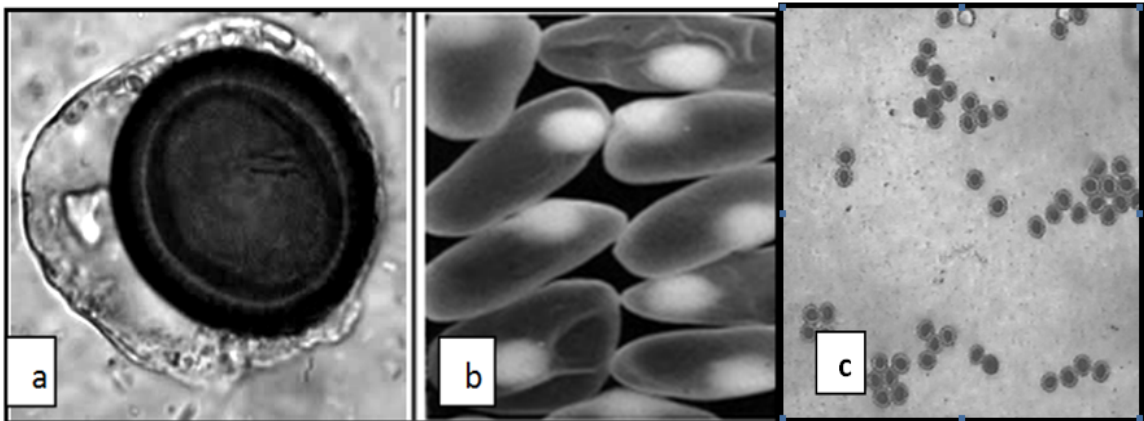


Figura 4: Del huevecillo hasta el metacestodo. a) Huevecillo de *Taenia sp* b) cisticercos de *T. solium* c) Huevos viables y no viables de *Taenia sp* (Huerta et al 2006).



B. Ciclo biológico

El ciclo de vida en la cisticercosis (Figura 5) tiene tres estados de desarrollo: parte de la ingestión del cisticerco por humanos al consumir carne de cerdo mal cocida infectada por el metacestodo (cisticerco) de la *Taenia solium*. Los cisticercos se transforman en el intestino humano, sitio en el que evagina su escólex, el cual se ancla a la mucosa intestinal, comenzando a desarrollar su cadena estrobilar constituida por unidades reproductivas llamadas proglótidos que se dividen en inmaduros, maduros, y grávidos, conformando el parásito adulto de la *T. Solium*, los proglótidos grávidos son eliminados diariamente en las heces fecales, liberando cerca de 300,000 huevos al día; los cuales van a encontrarse contaminando el medio ambiente.

Cuando el humano o el cerdo ingiere huevecillos, este se desarrollan a su forma larvaria, en el humano llegan a tubo intestinal en donde los huevecillos eclosionan por acción de los jugos digestivos, liberando al hexacanto, el cual atraviesa mucosa intestinal e ingresa a la vía hematogena o linfática para instalarse en músculos o sistema nervioso central, desarrollándose a cisticerco, provocando cisticercosis. El ciclo se completa cuando el hombre come carne de cerdo insuficientemente cocida o cruda que contiene cisticercos (12).

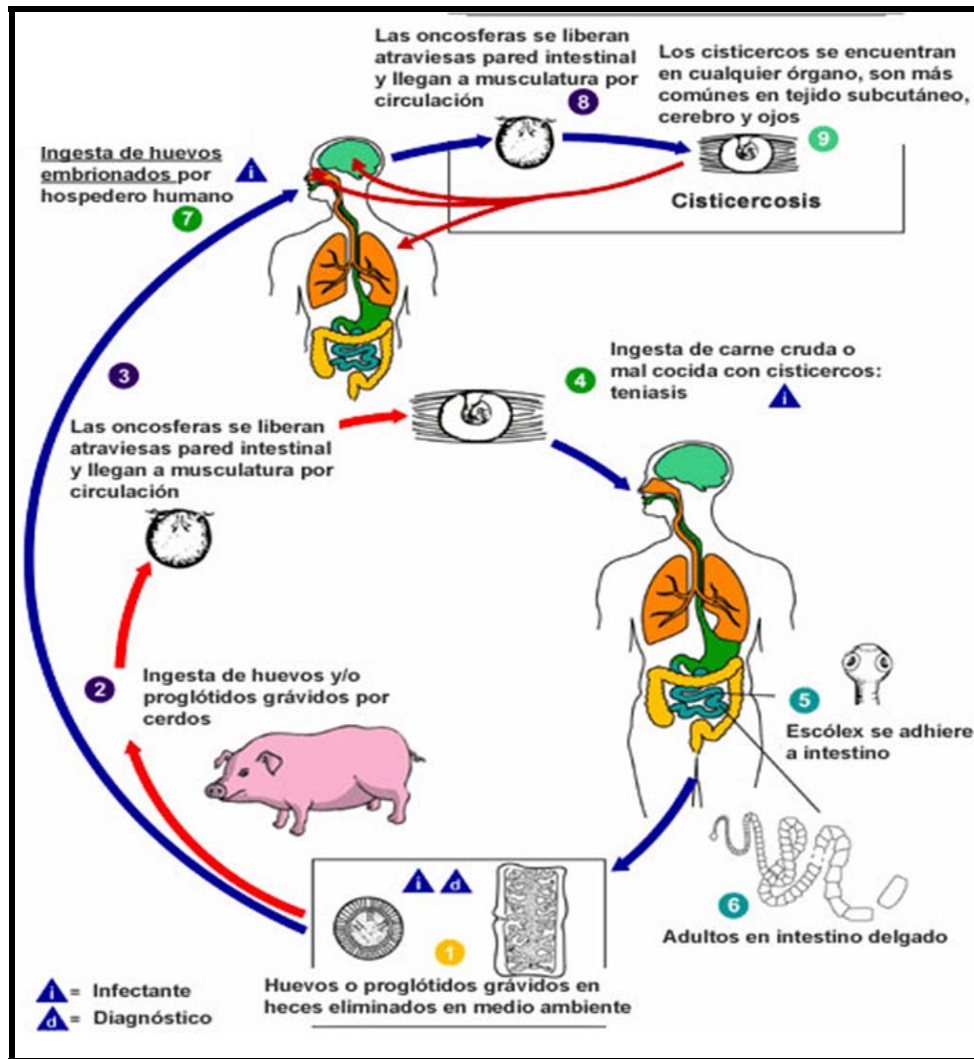


Figura 5: Ciclo biológico de la *Taenia Solium*.

El porcino es el único huésped intermediario de la *T. solium*. La cisticercosis porcina es una enfermedad que contrae el cerdo por la ingestión de los huevos de *Taenia solium* contenidos en materia fecal humana (12). En animales con infección masiva es posible observar que se mueven menos y están más tiempo echados, pero no existen informes de signos nerviosos. En el tratamiento para la cisticercosis porcina se ha demostrado que se obtienen buenos resultados con Praziquantel y Albendazol, pero el tratamiento no es costeable, ya que el poricultor tendría que



conservar sus animales varios meses después de la medicación, para que se eliminen los parásitos muertos de los músculos (13).

La magnitud de la cisticercosis porcina es mayor en cerdos criados rústicamente o en traspatio, que en los porcinos provenientes de los sistemas de producción tecnificada. La alimentación con desperdicios, basura contaminada, el fecalismo al ras del suelo, aunado a los hábitos coprófagos del cerdo, favorece importantemente el ciclo de vida del parásito (12).

La cisticercosis porcina puede detectarse en rastros durante la inspección sanitaria. Los cerdos criados rústicamente en condiciones libres o de traspatio frecuentemente no llegan a inspección sanitaria, en algunos rastros se ha detectado que se llegan a ocultar hasta el 90% de los cerdos cisticercosos (13). El diagnóstico de cisticercosis porcina ante mortem se lleva a cabo con un examen visual al cerdo y con la palpación de la lengua en búsqueda de cisticercos. Por este método sólo se tiene una sensibilidad y especificidad del 60% puede ser detectado un bajo número de animales afectados (14). Para un diagnóstico más específico se han desarrollado nuevas técnicas con el fin de detectar anticuerpos o incluso antígenos, destacando por su sensibilidad y especificidad ELISA y la Inmuno Electro Transferencia (enzyme-linked immunotransfer blotting o EITB) (15).

En estudios realizados a porcinos recién nacidos no se detectaron anticuerpos presentes, en lechones se ha comprobado que pueden infectarse en cuanto empiezan a salir con su madre y olean la tierra (16).



En el aspecto económico causa pérdidas, debido a que los cerdos cisticercosos son pagados muy baratos o son decomisados para su incineración, lo que implica pérdidas en porcicultura rustica. (11)

2. Antecedentes específicos

La neurocisticercosis es una causa importante de morbilidad y mortalidad humana. A pesar de la disponibilidad de antihelmínticos eficaces, la enfermedad sigue siendo frecuente en muchas partes del mundo y hay una necesidad de adoptar medidas nuevas y mejoradas para el control de la infección (17). Por su elevada frecuencia, sus consecuencias en salud y la repercusión económica son factores importantes para su prevención. Entre las medidas de intervención biotecnológicas se han desarrollado diversas vacunas, dirigidas al hospedero intermediario obligatorio (el cerdo) con el propósito de interrumpir el ciclo de vida y eventualmente disminuir la probabilidad de infectarse tanto el cerdo como el humano (17, 18, 19). La vacuna (S3Pvac) constituida por tres péptidos protectores identificados por un grupo de científicos en donde se incluyeron diferentes etapas de desarrollo (19). Las cuales constan de:



A. Desarrollo de un modelo experimental para la identificación de los antígenos para su posible aplicación contra la cisticercosis.

En el desarrollo del modelo experimental consideraron las limitaciones económicas y experimentales involucradas al trabajar con porcinos, por lo que decidieron emplear el protocolo de la cisticercosis murina causada por *Taenia crassiceps*, como modelo experimental de cisticercosis, debido a que tiene un ciclo de vida similar al de la *T. solium*, siendo sus hospederos intermediarios un conjunto extenso de roedores y sus hospederos definitivos los cánidos y felinos. Tanto los cisticercos como las tenias de ambas especies presentan una estructura macroscópica similar, con algunas diferencias: los cisticercos de *T. crassiceps* presentan una característica única que es su capacidad de dividirse por gemación múltiple (Figura 6). Este parásito se reproduce en la cavidad peritoneal de ratones rápidamente, brindando así una importante fuente de antígenos obtenidos en condiciones experimentales controladas (20).

Este hecho, aunado a que sus antígenos presentan reactividad cruzada con los antígenos de cisticercos de *T. solium*, alentó al empleo de los antígenos del cisticerco murino a fin de evaluarlos en su capacidad de prevenir la cisticercosis porcina. La utilización de los antígenos del cisticerco murino ha permitido además, avanzar en el inmunodiagnóstico de la parasitosis (21, 22, 23).

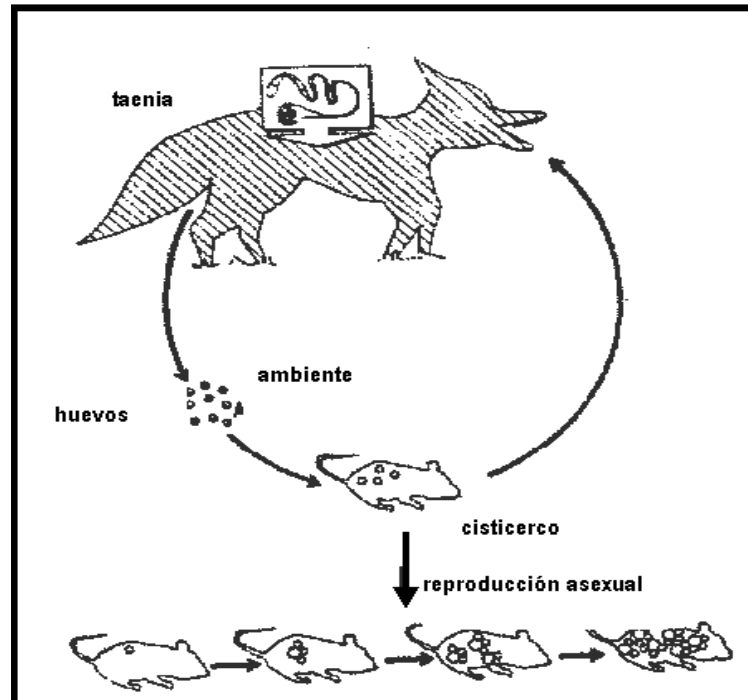


Figura 6: Ciclo biológico de la *Taenia crassiceps*.

B. La inmunización con antígenos de *T. crassiceps* o de *T. solium* protege contra la cisticercosis murina.

La capacidad protectora de los diferentes inmunógenos se evaluó utilizando ratones de la cepa BALB/cAnN los cuales se inmunizaron con los inmunógenos a evaluar. Quince días más tarde, los ratones se desafiaron intraperitonealmente con 10 cisticercos de *Taenia crassiceps* (cepa ORF) y 30 días después determinaron el número de cisticercos en la cavidad peritoneal de cada ratón infectado. Compararon el número de parásito en los ratones inmunizados con el de ratones no inmunizados.

En los primeros estudios evaluaron la capacidad protectora de los antígenos de los extractos totales de larvas de *T. crassiceps* y de *T. solium* en el modelo murino de



cisticercosis, los extractos antigénicos protegieron efectivamente a los ratones contra la cisticercosis por *T. crassiceps*, lo cual permitió proponer que los antígenos de *T. crassiceps* podrían conferir protección contra la cisticercosis porcina y en la cisticercosis causada por *T. crassiceps* como modelo idóneo para probar antígenos prometedores dirigidos al desarrollo de una vacuna contra la cisticercosis por *T. solium* (21, 23, 24).

C. La inmunización con antígenos de cisticercos de *T. crassiceps* protege en contra de la cisticercosis porcina.

Sciutto E. y colaboradores evaluaron en forma experimental si los antígenos de *T. crassiceps* eran capaces de proteger en contra de la cisticercosis porcina por *T. solium*. En donde vacunaron 56 porcinos con extractos totales del metacesodo de *T. crassiceps* con dosis de (400 µg/kg de peso), posteriormente desafiaron experimentalmente a los porcinos con huevos de *T. solium*. En donde observaron que redujo en un 58% la carga parasitaria de los cerdos desafiados, por lo que demostraron que los antígenos del cisticerco murino son capaces de proteger contra la cisticercosis porcina. Sin embargo, el empleo de antígenos totales para vacunación, no es un método ideal ya que el efecto de la inmunización en el desarrollo de la parasitosis depende de la dosis de antígeno empleada. Así, la dosis de 4 mg/kg de peso indujo la facilitación de la parasitosis, incrementándose la carga parasitaria en los animales vacunados “en más del 50% con respecto a los



controles”. Considerando lo anterior decidieron identificar los antígenos protectores presentes en el extracto antigénico (25).

D. Identificación de fracciones de antígenos protectores del cisticerco de *Taenia crassiceps*.

Con el fin de optimizar la vacuna, aislaron 12 fracciones antigénicas para identificar los antígenos más interesantes que participan en la protección. A partir de los antígenos solubles del cisticerco de *T. crassiceps*. Las fracciones antigénicas fueron evaluadas con respecto a su capacidad para inducir resistencia contra el desafío con 10 cisticercos de *T. crassiceps*. Los ratones que usaron fueron de la cepa BALB/cAnN machos de 4 a 6 semanas de edad, los cuales fueron inmunizados por vía intraperitoneal con 2 dosis de cada antígeno, 5 o 15 µg por ratón.

Las 12 fracciones del antígeno fueron clasificados como de protección (200, 123, 74, 66, 56, 40-50, 27 y 14.8 kDa), lo que facilita (220-205 kDa), o irrelevantes (150 a 160, 93, 108 kDa), de acuerdo a su efecto sobre la carga parasitaria. Posteriormente usaron de manera conjunta como inmunogeno las tres fracciones de antígenos (56, 66 y 74 kDa), para tratar de proteger al cerdo contra la cisticercosis por *T. solium*. Obtuvieron como resultados que la inmunización redujo la carga parasitaria y seis de siete porcinos inmunizados estaban completamente protegidos, con lo que se confirmó su capacidad protectora. Curiosamente, los antígenos con



pesos moleculares similares fueron detectados en las primeras etapas de diferenciación en la cisticercosis por *T. solium* los cuales podían ser útiles para el desarrollo de la síntesis de una vacuna recombinante contra la cisticercosis (16, 23).

Esta metodología permitió entonces identificar los antígenos protectores en el conjunto de antígenos de cisticercos de *T. crassiceps*. Sin embargo, esta metodología no es adecuada para la obtención de antígenos para ser utilizados en vacunación masiva, por lo que se produjo por métodos de DNA recombinante (16, 23, 26).

E. Identificación de antígenos recombinantes protectores contra cisticercosis.

En esta etapa construyeron una biblioteca de cDNA en el vector Uni-ZapXR utilizando ARNm de cisticercos de *T. crassiceps*. A partir de esta biblioteca se identificaron trece clonas recombinantes por inmunodetección utilizando anticuerpos policlonales específicos producidos en contra de las fracciones antigénicas protectoras de 56, 66 y 74 kDa. De las clonas identificadas seleccionaron 5 las cuales también fueron reconocidas por sueros de porcinos infectados con cisticercos de *T. solium*, asegurándose así que las clonas codifican antígenos de *T. crassiceps* que tienen homólogos en *T. solium* lo que los hace candidatos para la prevención contra la cisticercosis porcina. Las clonas seleccionadas fueron designadas como KETc1, KETc4, KETc11, KETc7 y KETc12 (26).



Posteriormente, anticuerpos contra los antígenos codificados por cada una de estas clonas se utilizaron para la detección de los antígenos específicos en el fluido vesicular de *T. crassiceps* por inmunoelectrotransferencia. Los anticuerpos reconocieron específicamente a los antígenos como proteínas nativas de cisticercos de *T. crassiceps* de 56 (clones KETc1, 4, 7), 74 y 78 kDa (clonas KETc11 y 12). Este resultado implica que los 5 antígenos recombinantes representan al menos parte de los antígenos nativos con los indicados pesos moleculares (26).

De los cinco antígenos el KETc7 es de potencial interés para la prevención de la cisticercosis. Este antígeno recombinante demostró ser eficaz como vacuna contra la cisticercosis murina experimental. Esos resultados proporcionaron información alentadora sobre el uso de KETc7 en la prevención de la cisticercosis, así fue la primera visión de la caracterización de la respuesta inmune inducida (26, 27, 28).

F. Evaluación en el modelo murino de la capacidad protectora de los antígenos recombinantes.

Evaluaron la eficacia de los antígenos recombinantes, en la prevención de la cisticercosis, en donde inmunizaron ratones de la cepa susceptible BALB/cAnN. Los ratones fueron vacunados con las proteínas recombinantes en los correspondientes lisados de *E. coli* emulsionadas en Adyuvante Completo de Freund (ACF). Como controles utilizaron animales inoculados con ACF y proteínas del lisado de *E. coli*



infectada con un fago sin inserto. En los ratones vacunados con lisados de las clonas KETc1, KETc7 y KETc12 observaron diferentes niveles de protección contra la cisticercosis murina causada por *T. crassiceps* que oscilaron entre el 30 al 90% de reducción de la cantidad de parásitos esperados (16, 26).

G. Identificación de epítopes para el diseño de una vacuna sintética constituida por 3 péptidos.

En la secuencia del antígeno KETc7, que codifica para un polipéptido de 100 aminoácidos, intentaron predecir las regiones de mayor antigenicidad de este polipéptido (19, 26), identificando tres péptidos GK-1, GK-2 y GK-3. De los tres péptidos, sólo GK-1 indujo protección contra la cisticercosis ocasionada por *T. crassiceps* del 40 al 70% de los ratones BALBcc/machos. Estudios de inmunofluorescencia revelaron que los anticuerpos anti-GK1 reaccionan fuertemente con la proteína nativa en el tegumento de *T. crassiceps* y de *T. solium*, también con las estructuras anatómicas de los huevos, oncósferas y cisticercos. Además demostraron que GK-1 contiene al menos un epítipo de células B demostrado por su capacidad de inducir una respuesta de anticuerpos a antígenos peptídicos y de *T. crassiceps* y un epítipo de células T capaz de estimular a proliferación de CD4+ y CD8+ en células con el péptido solo o con *T. crassiceps*.

La protección inducida por la notable GK-1, sus propiedades físico-químicas, y su presencia en todas las etapas del desarrollo de la *T. solium* hacen a este



péptido sintético un candidato fuerte en la construcción de una vacuna sintética contra la cisticercosis porcina *T. solium* (29).

H. Identificación de los péptidos protectores KETc1 y KETc12.

Con base en la secuencia completa codificada por las clonas KETc1 y KETc12, sintetizaron dos péptidos químicamente en forma lineal. Ambos péptidos fueron evaluados en el modelo de cisticercosis murina con resultados muy satisfactorios: La inmunización de ratones con KETc1 induce del 66,7 al 100% de protección y con KETc12 (dos dosis de 10µg/ratón) del 52.7 al 88.1 % de protección (30).

I. Inmunolocalización de los epítopes protectores.

Es importante señalar que los 3 epítopes protectores que constituyen la vacuna sintética desarrollada, se encuentran extensamente distribuidos en las distintas fases del parásito *T. solium*. Así, resulta un blanco accesible al ataque inmunológico. En este sentido es de especial interés su localización en la oncosfera, que según lo encontrado en otras cestodiasis (25), constituye la fase del parásito más susceptible al ataque inmunológico (30).



J. Evaluación de la capacidad protectora de la vacuna compuesta por los tres epítopes identificados en cerdos expuestos al desafío natural.

Esta evaluación se realizó en poblaciones rurales del estado de Puebla (Huatlatlauca y Tepetzintla), en donde inmunizaron a porcinos criollos con los tres péptidos sintéticos (basados en secuencias proteicas del parásito *Taenia crassiceps* en murinos), que en estudios previos demostraron inducir protección en los ratones contra el desafío homólogo con *Taenia crassiceps*, se probaron como una vacuna contra la cisticercosis por *T. solium* en cerdos.

Los porcinos criollos se inmunizaron con los tres péptidos en saponina o con saponina solamente (controles) Los porcinos se sacrificaron entre los 10 y 12 meses de edad, el efecto de la vacunación se evaluó en la necropsia, en donde registraron la presencia de cisticercos, el número y su aspecto macro y microscópico. Los resultados indicaron que la vacunación redujo la infección en un (52,6%) y el número total de cisticercos por *T. solium*, en el 98.7% de los cerdos enfermos los cisticercos fueron histopatológicamente no viables (27). Su efecto se comprobó con la disminución de porcinos infectados, de parásitos recuperados y en el aumento de la mortalidad de aquellos parásitos que lograron establecerse. Por lo que la vacuna desarrollada es capaz de proteger en contra de la cisticercosis porcina. Con base a eso propusieron que este desarrollo tecnológico es una herramienta capaz de interrumpir eficientemente la transmisión de la parasitosis (31).



K. Expresión en Fagos Filamentosos

Los fagos filamentosos recombinantes, virus que infectan a bacterias y que han sido modificados mediante ingeniería genética, ofrecen nuevas alternativas y amplias posibilidades para el diagnóstico y el desarrollo de vacunas moleculares que pueden utilizarse contra diferentes enfermedades. La técnica de despliegue en fagos (Phage Display) se basa en la expresión de hasta 10^{11} péptidos o proteínas en la superficie de fagos filamentosos (32). Esta herramienta permite a través de la manipulación *in vitro* e *in vivo* identificar y producir en gran escala los péptidos de interés en la superficie de los fagos. Actualmente, se han desarrollado numerosos sistemas de despliegue como el fago lambda λ y T4, y sistemas que incluyen virus de eucariotes (33).

M13 consiste de una cadena sencilla circular de DNA rodeado de cinco diferentes proteínas de cobertura (figura 6.0). La longitud del filamento se encuentra cubierta por 2700 copias de la mayor proteína de cubierta (pVIII) y está cerrada en los extremos por 4 ó 5 copias de cada una de las proteínas de menor cobertura pIII, pVI, pVII y pIX (34). La proteína de interés se asocia frecuentemente a la proteína 3 de la cubierta viral (cpIII) o proteína 8 (cpVIII) sobre la superficie del bacteriófago filamentosos M13. Otro aspecto del Phage Display ha sido el desarrollo de un sistema basado en un gen que permite la expresión de fragmentos de DNA o cDNA, derivados de genes individuales o del genoma completo, fusionados a cpIII o cpVIII de M13.

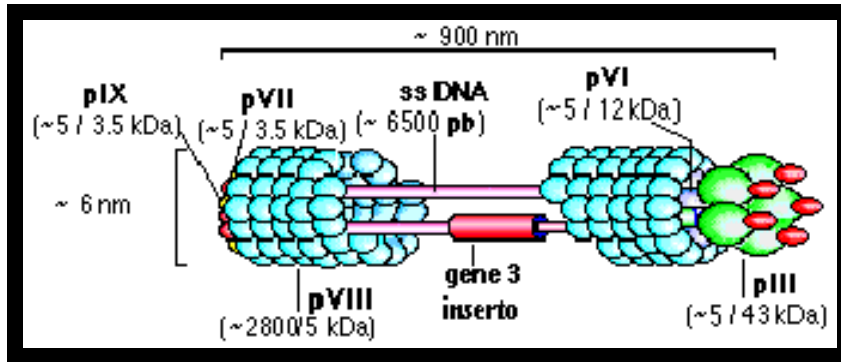


Figura 7: Estructura de bacteriófago que muestra la hebra de DNA y las proteínas de cubierta (pIII, pVI, pVII, pVIII, pIX)

La proteína III (43kDa, 424 aminoácidos) consta de tres dominios estabilizados por enlaces disulfuro. El dominio amino terminal es el responsable de la penetración a *Escherichia coli* mientras que el segundo dominio reconoce el pili bacterial. El dominio carboxilo actúa en el anclaje a la membrana además de participar en el ensamblaje del fago.

Entre las ventajas de utilizar fagos para la expresión de péptidos vacúnales se encuentra su capacidad inmunogénica *per se*, que se ha demostrado capaz de generar una respuesta inmune aún sin el uso de adyuvantes así como su alta estabilidad, bajo costo de producción y los datos que indican su potencial para inducir inmunidad protectora a través de inmunización oral (35).

Considerando estas características los péptidos (KETc1, KETc12, GK1 y un antígeno recombinante KETc7) de la vacuna sintética S3Pvac fueron expresados en fagos filamentosos recombinantes (M13) y se han encontrado capaces de inducir altos niveles de protección en contra de la cisticercosis experimental murina y



porcina, en donde se probó en campo que la vacunación reduce en un 70% la frecuencia de la cisticercosis en lengua, con base en la necropsia, el 54% de cisticercosis en músculo y en un 87% el número de cisticercos (35, 36).

La vacuna S3Pvac sintética compuesta de tres péptidos (GK1, KETc1 y KETc12) ayuda a proteger eficazmente contra la cisticercosis porcina. La vacuna S3Pvac expresada en fagos ha sido recientemente evaluada resultando altamente efectiva. Sin embargo, el requerimiento de aplicarse en forma inyectable dificulta la logística de su aplicación extensiva (37, 38).

Considerando esta limitación S3Pvac se ha expresado en células vegetales que se postulan como el vehículo idóneo para inducir inmunidad protectora por vía oral (39, 40).

Las plantas transgénicas son sistemas ideales para la producción de vacunas orales, ya que las paredes de las células vegetales puede proteger a las proteínas antigénicas de la digestión en el tracto intestinal, para la presentación efectiva a los tejidos linfoides asociados a mucosas (47).

L. Expresión de vacunas en callos transgénicos de plantas

Entre otros sistemas de presentación de vacunas subunitarias que ha comenzado a ser explorado para inmunización oral figuran las plantas transgénicas. Diferentes antígenos vacunales se han expresado en forma estable en el genoma de distintas plantas para la producción de vacunas en forma masiva así como para



su administración por vía oral (42). Los primeros estudios se realizaron en tabaco y papa. Algunos estudios realizados en plantas incluyen el virus del papiloma humano (VPH) en el cual se introdujo la proteína viral L1 (encargada de determinar los tipos de virus) en plantas de tabaco y papa obteniendo una respuesta inmune leve, posteriores estudios la administración oral de L1 derivado de papa presento una respuesta anamnésica (43, 44). El primer trabajo de un antígeno vacunal en plantas se realizó en 1990, con la expresión de la proteína A de superficie de *Streptococcus mutans* (SpaA) en tabaco. Posteriormente, han proseguido trabajos de expresión de antígenos protectores de patógenos bacterianos y virales en plantas como el antígeno de superficie de hepatitis B (HbsAg) (45), la enterotoxina termolábil de *E.coli*, las glicoproteínas del virus de la rabia.

M. Expresión de la vacuna S3Pvac en clones transgénicos embriogénicos de papaya (ETgpC)

La vacuna S3Pvac es altamente efectiva, pero su producción en forma sintética eleva su costo, lo que dificulta la capacidad de producirla para su aplicación extensa en campañas de control nacionales.

Considerando esta limitante expresaron los péptidos que constituyen la vacuna S3Pvac (KETc1, KETc12, KETc7), debido a la disponibilidad, experiencia en producción, propiedades antihelmínticas y por contar con la secuenciación del genoma de la planta, decidieron expresar la vacuna S3Pvac en la papaya (47).



N. Diseño de vacunas genéticas y la eficiencia de transformación

Se clonaron los péptidos KETc1, KETc12 o KETc7 en el vector de la planta, que conduce a la expresión de los transgenes en tejidos vegetales y contiene el gen de resistencia a la kanamicina (KmR). A los péptidos KETc1 y KETc12 les adicionaron seis residuos de histidina para aumentar su tamaño y ayudar a su identificación. Usaron para la co-transformación el plásmido pWRG1515, el cual contiene el gen reportero β -glucuronidasa (gen GUS) y el gen de resistencia a higromicina (HygR) como marcador genético. Para facilitar la detección y la selección de tejidos transgénicos.

Usaron semillas de papaya Tabasco Maradol, aisladas de frutos jóvenes verdes, como fuente de embriones cigotos para la inducción de la línea de células embriogénicas de papaya (callos embriogénicos de papaya) (EmpCL). EmpCL fue co-transformado mediante el sistema de bombardeo de partículas PDS-1000/He (BioRad).

La inducción, propagación y selección de los callos embriogénicos se llevó de acuerdo a lo reportado por Cabrera-Ponce et al 1995, 1997 (39, 40, 41, 47, 49) Con modificaciones. Medio con higromicina (50 mg / L) y kanamicina (100 mg / L) utilizaron como marcadores seleccionables.

Cuatro subcultivos (cada 45-60 días) en este medio se aplicaron para obtener ETgpC, resistente a HygR y KmR contados progresivamente. Algunos embriones

ETgpC se incubaron con X-GLUC (ácido D-glucurónico 5-bromo-4-cloro-3-indolil) por períodos que van desde unos pocos minutos a 24 horas a temperatura ambiente, y cuarenta y uno clones ETgpC mostraron expresión estable de el reportero β -glucuronidasa gen (Figura 8).

La presencia y expresión del transgen se determinaron por PCR y RT-PCR y el contenido de péptidos transgénicos en los diferentes clones se estimaron más utilizando PCR en tiempo real.

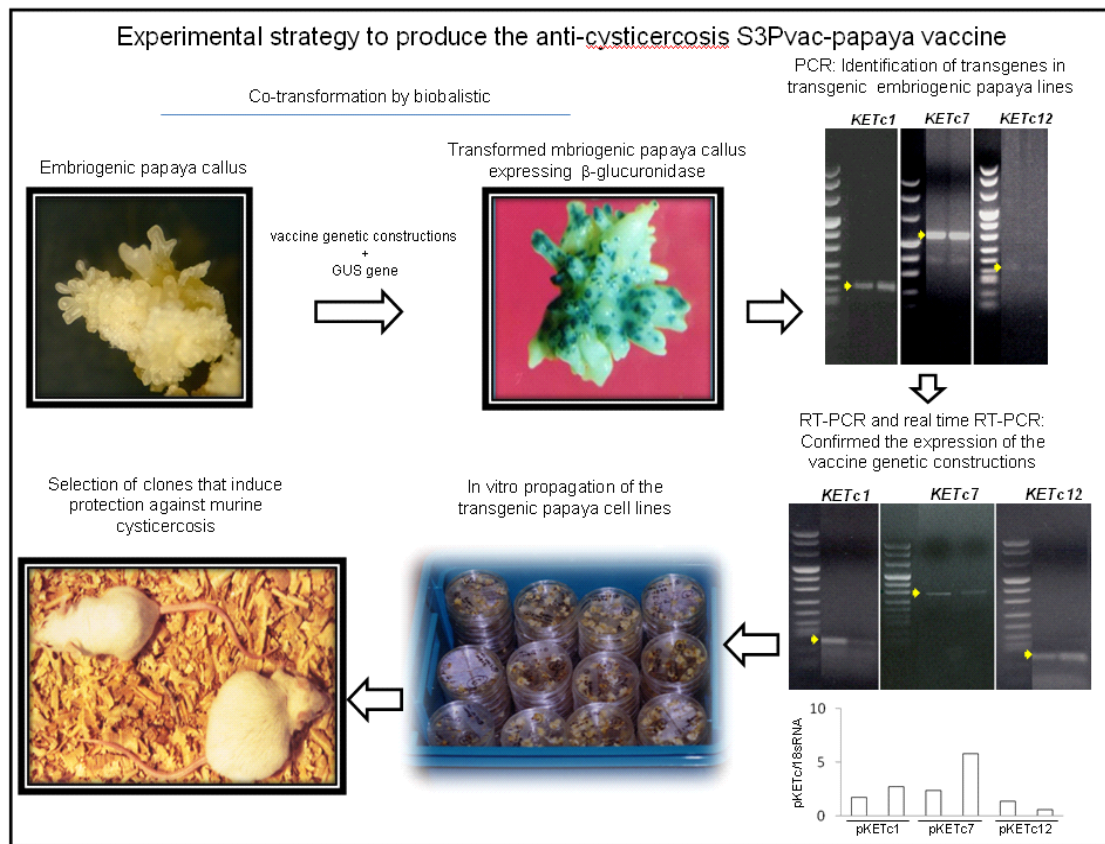


Figura 8. Estrategia para la expresión de la vacuna S3Pvac y papaya (46).



En la tabla 1 observamos el número de callos transformados, Como se observa, la eficiencia de transformación variada 5,2 a 13,5%, en donde se expresaron dos clonas de KETc7, dos de KETc12 y 15 clones de KETc1, en total 19 diferentes clonas transgénicas de papaya, demostrando que es un sistema de transformación efectivo y estable de rápido crecimiento (40, 47).

Tabla 1. La eficiencia de transformación de callos de papaya (46)..

pUI235-5.1 to express the peptide	Number of transformed callus	Number of clones obtained	Transformation efficiency (%)
KETc7	210	11	5.2
KETc1.6His	280	38	13.5
KETc12.6His	175	12	6.8

O. Vacunación con S3Pvac-Papaya contra T. crassiceps en murinos.

Esta nueva versión de vacuna expresada en papaya ha demostrado aumentar la resistencia a la cisticercosis murina tanto administrada en forma sintética como en forma oral induciendo una alta eficiencia de protección. La vacuna aplicada en dos dosis reduce la cantidad de parásitos en más del 90% y más del 70% de animales totalmente protegidos (40)



La vacuna S3Pvac expresada en papaya resulta de bajo costo de producción lo que aumenta la factibilidad de su aplicación. Adicionalmente, su administración por vía oral reduciría las limitaciones logísticas para su administración sostenida ofreciendo la posibilidad de ser administrada por los propios porcicultores rústicos (40).



III. JUSTIFICACIÓN

La cisticercosis y teniosis en México ocasiona grandes problemas de salud pública, afectando la vida de la población que sufre estas parasitosis. La teniosis generalmente es asintomática, no así la cisticercosis que puede afectar diferentes tejidos, cuando se localiza en el sistema nervioso central se le denomina neurocisticercosis que es la principal causa de padecimientos neurológicos producidos por un parásito, generando una gran variabilidad de manifestaciones clínicas, teniendo desde la ausencia total de signos, hasta poner el estado vital en peligro. El tipo y la intensidad de las manifestaciones dependen de la localización, número de parásitos, así como de la respuesta inflamatoria.

Por su parte la cisticercosis porcina ocasiona importantes pérdidas económicas por decomiso de carne de cerdo infectada, así como favorece el ciclo biológico de la *Tenia solium*, causando prevalencia de esta parasitosis principalmente en zonas rurales, lo cual aunado a la carencia de servicios sanitarios, la mala higiene y la crianza de porcinos en forma rústica proporcionan las condiciones idóneas para el desarrollo de la misma, el riesgo de infección aumenta en las zonas urbanas debido a la constante migración de los habitantes de las zonas rurales que se encuentren infectados con el parásito adulto.

Tales motivos hacen indispensable buscar alternativas para su prevención y control. Entre las medidas de intervención biotecnológica figura el desarrollo de una



vacuna dirigida al hospedero intermediario obligatorio (el cerdo) con el propósito de interrumpir el ciclo de vida y eventualmente disminuir la probabilidad de infectarse tanto el cerdo como el humano. La vacuna S3Pvac se encuentra constituida de 3 péptidos (KETC1, KETC12, KETC7) con capacidad protectora que se encuentran extensamente distribuidos en las fases del parásito, la reciente versión de esta vacuna se encuentra expresada en callos embriogénicos de papaya, la cual demostró inducir altos niveles de protección en contra de la cisticercosis murina experimental, administrada por vía oral.

Para poder establecer las bases necesarias para comenzar su evaluación en contra de la cisticercosis porcina en condiciones naturales de transmisión y de tratamiento, es necesario confirmar en una primera etapa la capacidad inmunogénica de la vacuna administrada oralmente en cerdos. Este proyecto pretende determinar si esta vacuna mantiene sus propiedades inmunogénicas en el cerdo, evaluando la respuesta inmune humoral y celular inducida específicamente con la vacuna, así mismo pretende establecer estas bases, para comenzar su evaluación en campo con el propósito final de disponer de una nueva vacuna oral, de bajo costo y fácil administración.



IV. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Es capaz la vacuna S3Pvac-papaya de inducir respuesta inmune celular y humoral específica administrada por vía oral en lechones?

V. HIPOTESIS

Las hipótesis de nuestro trabajo pueden ser formuladas así:

Hi: La vacuna S3Pvac-papaya administrada por vía oral induce la respuesta inmune celular y humoral, en lechones de 2 a 3 meses de edad.

Ho: La vacuna S3Pvac –papaya administrada por vía oral no induce respuesta inmune celular y humoral, en lechones de 2 a 3 meses de edad.

VI. OBJETIVOS

1. Objetivo general

Evaluar la capacidad inmunogénica de la vacuna oral S3Pvac-papaya contra la cisticercosis porcina en lechones de 2 a 3 meses de edad, en condición reales de campo, a los días 15 y 30 posteriores de la vacunación.



2. Objetivos específicos

- Evaluar la respuesta inmune humoral inducida por la vacunación por medio del título de anticuerpos IgG por ELISA.
- Evaluar la respuesta inmune celular inducida por la vacuna oral S3Pvac-papaya por medio de proliferación celular.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un estudio experimental con porcinos en condiciones naturales de exposición, tipo longitudinal, de cohorte, aleatorizado simple ciego, unicéntrico, prospectivo.

El estudio se efectuó en la comunidad rural de San Andrés Azumiatla en el estado de Puebla, comunidad que carece de condiciones de salubridad necesarias como lo son: drenaje, alcantarillado, sanitarios por lo que se da el fecalismo al ras del suelo y la crianza de porcinos en traspatio que en algunos casos tienen acceso a la materia fecal, hacen que esta sea una comunidad con las condiciones idóneas para el desarrollo del ciclo biológico de la *Tenia solium*, en donde con anterioridad se determinó la prevalencia de cisticercosis porcina por medio de serología.

Incluimos en el estudio a lechones de dos a tres meses de edad a los cuales se les dividió en dos grupos: un grupo control (placebo) y uno vacuna de acuerdo a una asignación equilibrada en bloques aleatorios. Incluyéndose aquellos que cumplieran con los criterios como lo son: que el dueño aceptara que sus porcinos entraran en el ensayo y que hayan firmado la hoja de consentimiento informado (anexo1), que



fueran porcinos de 2 a 3 meses de edad y que estuvieran sanos, por otra parte se excluyeron aquellos porcinos que tuvieran infecciones concurrentes y que estuvieran siendo tratados con antibióticos, antiparasitarios o que ingirieran alimento comercial que contuviera fármacos y que fueran animales de alguna comunidad diferente a San Andrés Azumiatla, así mismo se eliminaron a aquellos porcinos que se vendieran a otras comunidades y los animales que murieron por diversas causas.

A. Tamaño de la Muestra

Decidimos incluir en este estudio un total de 30 lechones y para compensar la probable pérdida de porcinos al momento de la evaluación, se aumento el 10% para llegar a un total de 32 lechones, 16 en el grupo control y 16 en el grupo vacuna.

B. Método de recolección de datos.

Se utilizo para la recolección de la información, una hoja de captación de datos (anexo 2), con registro individual para cada porcino incluido, posteriormente se creó una base de datos, en la cual se ejecuto el vaseado de la información y los resultados de los análisis realizados (anexo 3).



C. Procedimientos

- El estudio se realizó en las casas de habitantes de la comunidad de San Andrés Azumiatla que aceptaron participar, firmaron la hoja de consentimiento informado y que tuvieron por lo menos dos porcinos criollos de dos a tres meses de edad, que cumplieran con los criterios de inclusión, a los que se les realizó inspección de lengua, antes de incluirlos en el estudio.

- Se identificó a cada porcino colocando en una de sus orejas, un arete numerado, de acuerdo a la base previamente aleatorizada, teniendo 2 grupos: un grupo vacuna y un grupo placebo.

- A ambos grupos se les tomó muestras de sangre periférica de la yugular (para obtener la muestra basal, correspondiente al día cero), antes de administrarles la primera dosis de vacuna o placebo según lo que correspondiera a cada animal.

- Al grupo vacuna se le administró por vía oral 250mg/cada péptido de la vacuna S3Pvac-papaya en una primera dosis, este mismo día al grupo placebo se administró 1ml de solución salina, 15 días después de la primera inmunización se volvió a vacunar siguiendo el mismo esquema.



➦ Además de tomar la muestra de sangre periférica de la yugular el día cero y 15 se realizó una toma de muestras, al día 30 posterior a la primera inmunización.

D. Procesamiento de las muestras

Por cada porcino se tomaron dos muestras de sangre: en cada uno de los diferentes tiempos (0, 15 y 30 días), una muestra de sangre se tomó en tubos sin anticoagulante para la obtención de suero y una en tubos con anticoagulante ACD para la obtención de linfocitos, las muestras debidamente etiquetadas, se transportaban al laboratorio con red de frío los días en que fueron tomadas, para posteriormente realizar los análisis correspondientes.

D.1. Evaluación de la Respuesta Inmune Humoral por medio de la determinación del título de anticuerpos IgG

Las muestras sin anticoagulante fueron centrifugadas para la obtención de suero, se etiquetaron y se congelaron a -20°C hasta su procesamiento.

Por medio de la técnica de inmunoensayo de ELISA se determinó el título de anticuerpos IgG en los tiempos 0, 15 y 30, contra la vacuna S3Pvac-papaya producidos por la vacunación, en donde se usaron controles positivos y negativos, como referencia para el control de la prueba y para el posterior análisis de los resultados, se emplearon placas de microtitulación de 96 pozos (marca Nunc) las



cuales se sensibilizaron con 1 μg /pozo de la vacuna S3Pvac-papaya en buffer de carbonatos y se incubo la placa a 4°C toda la noche, se lavo tres veces la placa con PBS-TWEEN 1X 0.3%, posteriormente se bloqueo la placa con PBS-BSA1% por una hora, transcurrido este tiempo se lavo de nuevo tres veces la placa con PBS-TWEEN 1X 0.3%, los sueros se diluyeron en PBS-BSA 1%, en una relación de 1:100 por 1hr a 37°C, de nuevo se realizaron tres lavados con PBS -TWEEN 1X 0.3%, posteriormente se agregó anti-IgG (Fc) de cerdo acoplado a peroxidasa de rábano picante (HRP) (Serotec AA141B), en una dilución de 1:10,000 por 1hr a 37°C, la cual es usada como señal del complejo antígeno-anticuerpo. La reacción fue detectada con la 3, 3', 5, 5' tetrametilbencidina (TMB) por 15 minutos a temperatura ambiente, el TMB reacciona con las enzimas peroxidasa formando un producto coloreado de azul por medio de la oxidación del TMB con peróxido de hidrogeno (catalizada por la HRP). La reacción fue parada con ácido sulfúrico 0.2 M el cual torna al producto en un color amarillo y se realizó la lectura a una densidad óptica (D.O.) de 450 nm, por medio de un lector de placas de ELISA, los resultados obtenidos en densidad óptica, fueron transformados a datos cualitativos tomando los valores promedio de los controles positivos o negativos respectivamente y \pm dos desviaciones estándar para determinar si hay un aumento en el titulo de anticuerpos a los que definiremos como positivos o si no hay aumento los denominaremos como negativos.



D.2. Evaluación de la respuesta Inmune Celular por medio de proliferación celular de linfocitos

Las muestras de sangre que fueron tomadas con anticoagulante en los tiempos 0, 15 y 30 pre y postinmunización, se procesaron para la separación de linfocitos por medio de un gradiente de densidad de 1.070 g/ml usando Lymphoprep (compuesto formado por ficoll y metrizoato sódico, la función del ficoll es aglutinar a los eritrocitos, de manera que aumenta su velocidad de sedimentación y el metrizoato sódico es el compuesto que se encarga de dar la densidad adecuada) en donde antes de usar el gradiente se diluyó la sangre con solución salina en una relación de 1:1, la sangre diluida fue depositada con una pipeta lentamente en un ángulo de 45 grados, a un tubo falcón que contiene lymphoprep, la relación usada de sangre diluida y lymphoprep es de 1:2, posteriormente se centrifugó a 2500 rpm por 20 minutos, después de la centrifugación se visualizaron varias fases, en donde la fase inferior estaba formada por células rojas, la siguiente fase por el gradiente y sobre él se visualizaba una fase blanca en forma de anillo la cual estaba formada por linfocitos y la última fase, la fase superior estaba formada por plasma y plaquetas. Después de la centrifugación, se tomó con una pipeta de bulbo el anillo de linfocitos en movimiento circular se depositaron estas células en un tubo estéril y se les agregó solución salina para lavar las células, posteriormente se centrifugaron a 1500 rpm por 5 minutos, pasado ese tiempo se decantó la solución salina y se resuspendieron las células, se hicieron dos lavados más y en el último lavado después de decantar se agregó medio RPMI 1640 suplementado con suero fetal bovino al 10%, L-glutamina 2 mM, aminoácidos no esenciales 10%,



bicarbonato de sodio 2 gr, penicilina 100U/ml, estreptomina 100 µg/ml, a una concentración de 2×10^5 células viables/pozo, en placas de 96 pozos para cultivo (marca Corning), las células fueron cultivadas con medio solo, como control negativo, con concanavalina A (1 µg/ml) como control positivo, con antígeno de *T.solium* (10 µl) y con la vacuna S3Pvac-papaya (10 µg/ml), por 5 días a 37°C con 5% de CO₂ (47), posteriormente se efectuó la técnica de MTT para el ensayo de proliferación celular de acuerdo al protocolo, en donde se uso para este fin el Kit CellTiter 96® Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega) este ensayo se basa en la ruptura (reducción) de la sal de tetrazolium (3-(4,5 dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) en un producto coloreado azul (formazán) por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa, las placas se leyeron en un lector para placas de 96 pozos a una Densidad óptica (D.O.) de 570 nm. Los resultados fueron presentados en D.O. y transformados a índices de estimulación (I.S.) dividiendo el valor en D.O. de los resultados obtenidos de las células estimuladas con los diferentes antígenos entre los resultados de las células sin estimular, en donde se determino como valores positivos de I.S. a los que fueran mayores a 1 y como negativos a valores menores de 1.

E. Descripción Operativa del Estudio

El procesamiento de las muestras se llevo a cabo en el laboratorio de Inmunoparasitología de la Facultad de Medicina de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla y en el Centro de Investigación Biomédica de Oriente del Instituto Mexicano del Seguro Social del periodo de Enero de 2007 a Enero de 2009.



F. Procesamiento estadístico.

Los valores cualitativos fueron expresados en porcentajes (porcentaje de porcinos con resultado positivo o negativo en ambos grupos), con intervalo de confianza a 95%. Las comparaciones de los valores cualitativos independientes fueron analizadas por la prueba de χ^2 o la prueba exacta de Fisher en los casos en que la frecuencia esperada es menor que 5 en al menos una casilla.

Los programas estadísticos utilizados para las pruebas estadísticas fueron SPSS (IBM Corporation, New York USA) y StatView (SAS institute, Cary USA).

Para cada análisis el nivel de significancia estadística fue definido con un valor inferior a 5 por ciento (0.05).



G. Operalización de las variables

Tabla 1: Definición de la variable y escala de medición.

NOMBRE Y TIPO DE VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	ESCALA DE MEDICIÓN	ANÁLISIS ESTADÍSTICO
V. no Paramétrica Edad	Tiempo de cada uno de los periodos en que se halla dividida la vida.	Se va a seleccionar solo a cerdos menores de dos meses	Nominal	Porcentaje, Chi ²
V. no Paramétrica Sexo	Condición orgánica, masculina o femenina, de los animales y las plantas	Se determinara por grupo cuántos porcinos incluidos en el estudio son hembras y cuántos son machos	Nominal: Hembras y machos	Porcentaje, Prueba Exacta de Fisher
V. Independiente Vacuna S3Pvac – papaya por vía oral	Expresión de antígenos vacunales en forma estable en el genoma de distintas plantas, en este caso de la papaya. Está compuesta por 3 péptidos el Ktc1, Ktc12 y el Gk1	Grupo vacuna: Se van a suministrar por vía oral 250mg/c péptido de la vacuna al tiempo 0 y 15 en días. Grupo placebo: se suministrara 1ml de solución salina isotónica	Nominal	
V. Dependiente Titulo de Anticuerpos IgG	Antígeno es una molécula de superficie celular, que puede inducir la formación de anticuerpos. Inmunoglobulinas son proteínas anticuerpo altamente específicas que son producidas en respuesta a antígenos específicos	Los resultados obtenidos del título de anticuerpos medido por densidad óptica a diferentes tiempos por medio de un lector de ELISA y transformados a valores cualitativos determinando si son positivos o no a un aumento de anticuerpos, por medio del promedio de los controles ± 2 DE.	Nominal: positivo y negativo	Porcentaje, Prueba Exacta de Fisher
V. Dependiente Perfil Inmunológico Celular Proliferación celular	Inmunidad celular es una forma de respuesta inmunológica adaptativa mediada por células de linfocitos T. Actúa como mecanismo de defensa en contra de los microorganismos intracelulares capaces de sobrevivir y proliferar en el interior de los fagocitos y otras células del huésped, lugar al que no tienen acceso los anticuerpos circulantes.	Se evaluó la proliferación celular específica po medio de Densidad óptica (DO), la cual se transformo en IS, en donde se determino la presencia o ausencia de estimulación celular	Nominal: positivo y negativo	Porcentaje Prueba Exacta de Fisher



VIII. RESULTADOS

1. Organigrama

Se vacunaron un total de 32 porcinos hembras y machos de la comunidad de San Andrés Azumiatta, Puebla, de los cuales murieron durante el estudio 5 por diferentes causas (venta, accidente, etc.), en el presente organigrama podemos observar a los diferentes tiempos del estudio en el que se presentaron las pérdidas, contando al final del estudio con 27 porcinos de ambos grupos, de los cuales 15 fueron del grupo vacuna y 12 del grupo placebo. Así mismo cabe destacar que en algunas pruebas las muestras se encontraban hemolizadas o presentaron problemas a la hora de separar los linfocitos por lo que no se pudieron procesar.

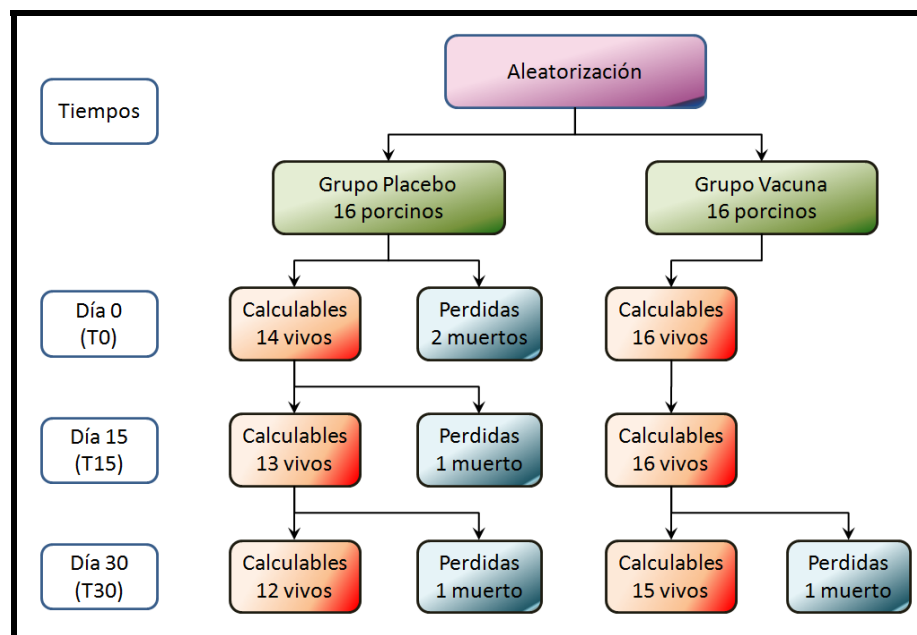


Figura 9: Organigrama del estudio.



2. Comparación entre los grupos vacuna y placebo (control) a los diferentes tiempos del estudio

En la tabla 2 presentamos los resultados obtenidos por ambos grupos en un estado basal (antes de la vacunación), en donde se evaluó la respuesta inmune celular (con el ensayo de proliferación celular) y la respuesta inmune humoral (con la técnica de ELISA), los resultados obtenidos se analizaron de acuerdo a lo mencionado en materiales y métodos, así mismo incluimos el análisis con la variable sexo, para ver si esta influye en los resultados.

Desde el tiempo T0 encontramos una diferencia significativa con respecto al sexo de los porcinos. Así los análisis cualitativos, fueron ajustados con esta variable para eliminar un eventual efecto del sexo sobre los niveles de respuesta celular o humoral.



Tabla 2: Características iniciales (a tiempo T0) de los lechones por grupo.

Características al tiempo T0	Grupo Placebo	Grupo Vacuna	P-Valor
Sexo, n (p%)			0,04
Hembra	8 (66,7%)	4 (26,7%)	
Macho	4 (33,3%)	11 (73,3%)	
REPUESTA CELULAR	N=12	N=15	
Antígeno Con A, n (p%)			NS
Positivos	10 (83,3%)	13 (86,7%)	
Negativos	2 (16,7%)	2 (13,3%)	
Antígeno Ag TS, n (p%)			NS
Positivos	9 (75,0%)	9 (60,0%)	
Negativos	3 (25,0%)	6 (40,0%)	
Antígeno VP, n (p%)			NS
Positivos	9 (75,0%)	12 (80,0%)	
Negativos	3 (25,0%)	3 (20,0%)	
Antígeno NP, n (p%)			NS
Positivos	5 (41,7%)	6 (40,0%)	
Negativos	7 (58,3%)	9 (60,0%)	
REPUESTA HUMORAL	N=14	N=16	
Antígeno VP, n (p%)			NS
Positivos	1 (7,1%)	1 (6,3%)	
Negativos	13 (92,9%)	15 (93,7%)	

m: promedio; de: desviación estándar; n: efectivos; p%: porcentaje; NS: No significativo.

Con A: Concanavalina A, Ag TS: antígeno de *Taenia solium*, VP: Vacuna S3Pvac-papaya, NP: Planta no transgénica



Al tiempo T15 (tabla 3) la respuesta celular y humoral con la vacuna (VP) como antígeno, fueron encontrados significativos, entre los grupos experimentales, respectivamente con $p=0.0085$ y $p=0.0476$.

Tabla 3: Resultados del análisis de la respuesta humoral y celular al tiempo T15 por grupo.

Características al tiempo T15	Grupo Placebo	Grupo Vacuna	P-Valor
REPUESTA CELULAR	N=12	N=15	
Antígeno Con A, n (p%)			NS
Positivos	11 (92%)	11 (73%)	
Negativos	1 (8%)	4 (27%)	
Antígeno Ag TS, n (p%)			NS
Positivos	8 (67.0%)	7 (47.0%)	
Negativos	4 (33.0%)	8 (53.0%)	
Antígeno VP, n (p%)			0.0085
Positivos	5 (42.0%)	14 (93.0%)	
Negativos	7 (58.0%)	1 (7.0%)	
Antígeno NP, n (p%)			NS
Positivos	2 (17.0%)	4 (27.0%)	
Negativos	10 (83.0%)	11 (73.0%)	
REPUESTA HUMORAL	N= 13	N=16	
Antígeno VP, n (p%)			0.0476
Positivos	0 (0%)	5 (69.0%)	
Negativos	13 (100%)	11(31.0%)	

m: promedio; de: desviación estándar; n: efectivos; p%: porcentaje; NS: No significativo.

Con A: Concanavalina A, Ag TS: antígeno de *Taenia solium*, VP: Vacuna S3Pvac-papaya, NP: Planta no transgénica



Al tiempo T30 (tabla 4), solo la respuesta inmune celular con la VP como antígeno fue encontrada estadísticamente significativamente diferente entre los grupos placebo y vacuna, con $p=0.0192$.

Tabla 4: Resultados del análisis de la respuesta humoral y celular al tiempo T30 por grupo.

Características al tiempo T30	Grupo Placebo	Grupo Vacuna	P-Valor
REPUESTA CELULAR	N=12	N= 15	
Antígeno Con A, n (p%)			NS
Positivos	9 (75%)	8 (53 %)	
Negativos	3 (25%)	7 (47%)	
Antígeno Ag TS, n (p%)			NS
Positivos	1 (9.0%)	2 (13.0%)	
Negativos	10 (91.0%)	13 (87.0%)	
Antígeno VP, n (p%)			0.0192
Positivos	1 (8.0%)	8 (53.0%)	
Negativos	11 (92.0%)	7 (47.0%)	
Antígeno NP, n (p%)			----
Positivos	----	-----	
Negativos	12 (100%)	15 (100%)	
REPUESTA HUMORAL	N=12	N=13	
Antígeno VP, n (p%)			NS
Positivos	4 (33.0%)	2 (15.0%)	
Negativos	8 (67.0%)	11(85.0%)	

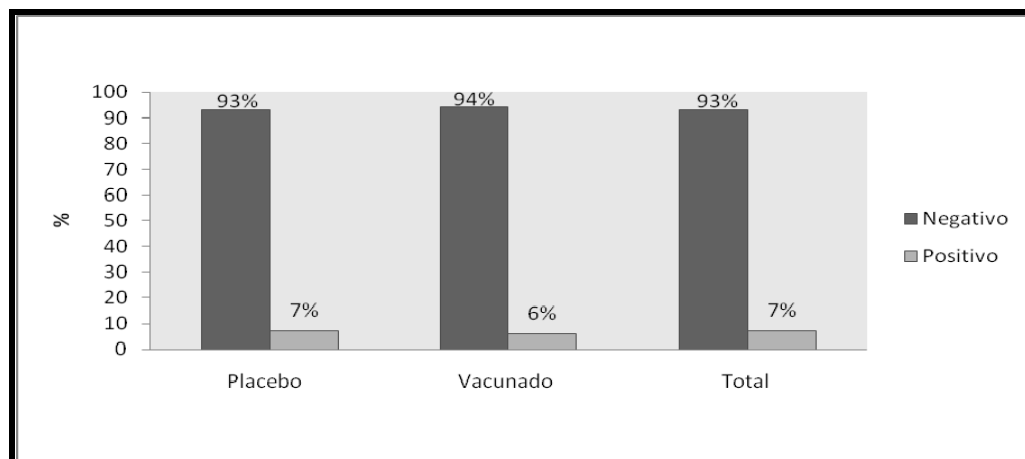
m: promedio; de: desviación estándar; n: efectivos; p%: porcentaje; NS: No significativo.

Con A: Concanavalina A, Ag TS: antígeno de *Taenia solium*, VP: Vacuna S3Pvac-papaya, NP: Planta no transgénica,



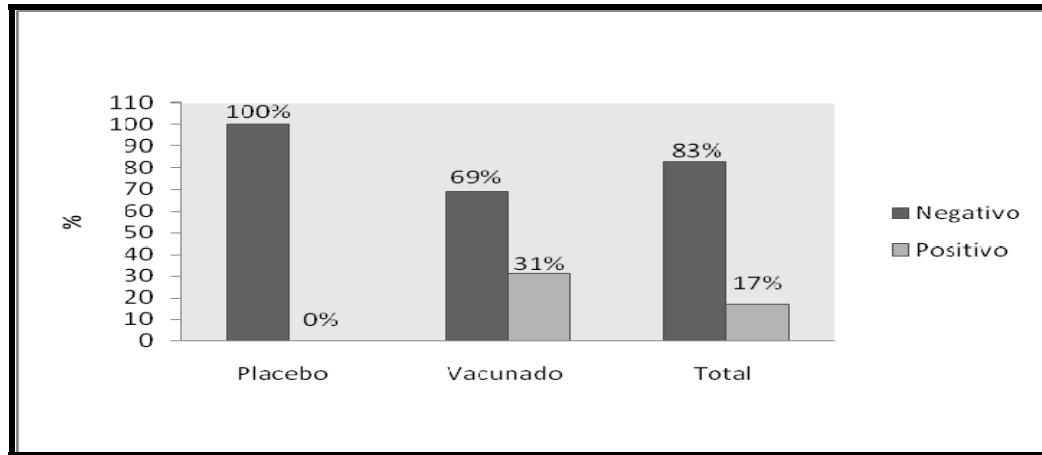
3. Porcentaje de porcinos con elevación de anticuerpos entre los grupos vacuna y control a los diferentes tiempos del estudio.

En las graficas que a continuación se muestran se encuentran presentados por grupo y expresados en porcentaje los porcinos que tuvieron una elevación en el titulo de anticuerpos positivos con respecto a los controles de la prueba de ELISA y cuántos de ellos fueron negativos a los diferentes tiempos del estudio.



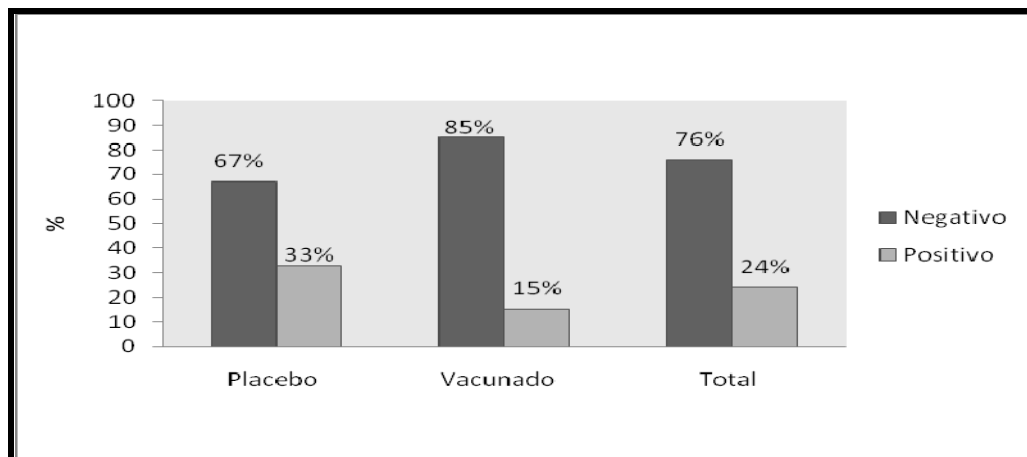
Grafica 1. Porcentaje de titulo de anticuerpos positivos para el tiempo 0 con la vacuna como antígeno.

En donde se puede observar que ambos grupos se encuentran en situaciones similares, sin tener un cambio significativo.



Grafica 2. Porcentaje del número de porcinos con títulos de anticuerpos positivos y negativos en el tiempo 15.

En donde observamos en el grupo vacuna aumento con respecto al grupo placebo en el número de porcinos que tuvieron elevación en el título de anticuerpos.



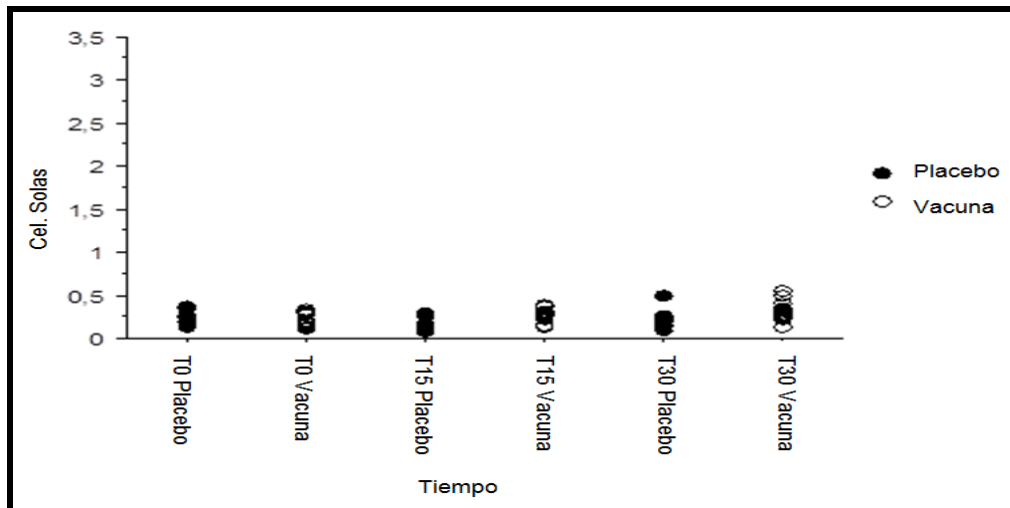
Grafica 3. Porcentaje de porcinos con títulos de Anticuerpos positivos y negativos al tiempo 30.

En donde en el grupo vacuna en comparación del grupo placebo se encuentran en menor porcentaje el número de porcinos con anticuerpos elevados.

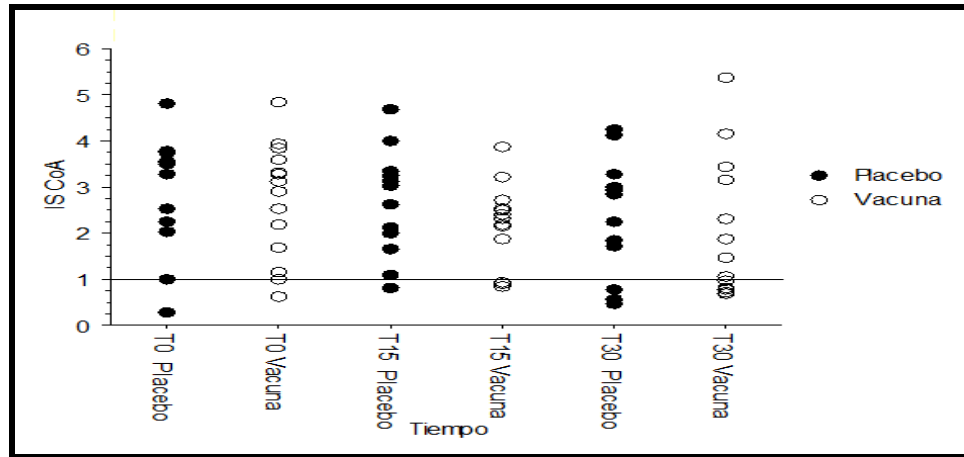


4. Proliferaciones entre los grupos vacuna y control a los diferentes tiempos del estudio, con diferentes antígenos

Las graficas siguientes muestran los resultados obtenidos por densidad óptica así mismo el nivel de estimulación (los resultados encima del umbral reflejan una positividad).

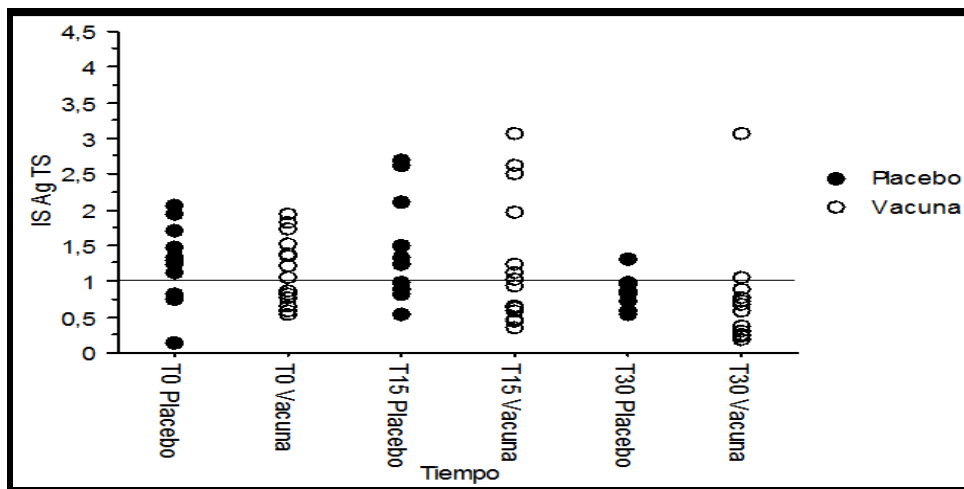


Grafica 4. Densidades ópticas obtenidas por las células sin estimular a los diferentes tiempos en cada grupo.



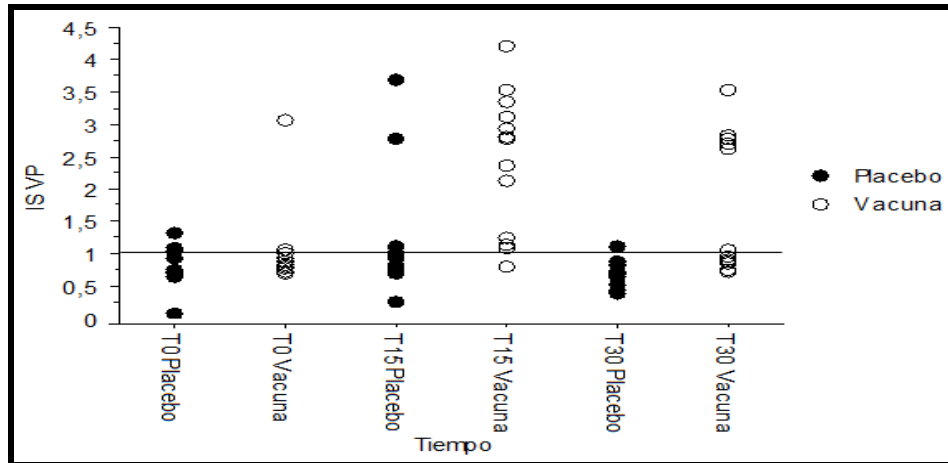
Grafica 5. Índices de estimulación y umbral de estimulación (línea) con Concanavalina A.

En donde al estimular las células con CoA, observamos aumento en los índices de estimulación de las células de los porcinos vacunas y placebos a los diferentes tiempo en cada grupo.



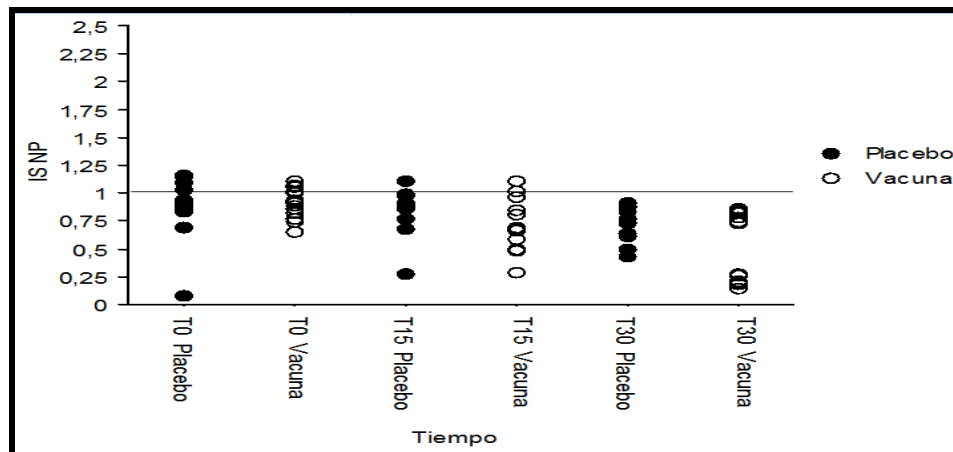
Grafica 6. Índices de estimulación y umbral de estimulación (línea) con el AgTS a los diferentes tiempos en cada grupo.

En donde se muestra para ambos grupos estimulaciones en los tiempos 0 y 15.



Grafica 7. Índices de estimulación (IS) obtenidos con VP a los diferentes tiempos en cada grupo y el umbral de estimulación (línea).

En esta grafica podemos observar para el grupo vacuna hay estimulación celular en los tiempos 15 y 30, mientras que en el grupo placebo al tiempos 15 un par de porcinos presentaron estimulación celular.



Grafica 8. Índices de estimulación para células estimuladas con NP y umbral de estimulación (línea) por grupo.

Aquí podemos observar que el comportamiento con la planta no transgénica (NP) en ambos grupos es similar y no se observa una elevación importante en la estimulación de las células con NP a los diferentes tiempos.



5. Comentarios sobre los resultados

A. Respuesta humoral

Con respecto a los resultados obtenidos al analizar la producción de anticuerpos ocasionada por la respuesta inmune humoral que se desencadena a causa de la vacunación, demostrada en nuestras graficas (de la 1 a la 3), en donde podemos observar el comportamiento de las muestras con respecto al tiempo y al título de anticuerpos, así mismo podemos ver por grupo el porcentaje de positivos y negativos. En donde para el tiempo 0 (grafica1) se encuentran sin diferencia en el título de anticuerpos tanto para los grupos vacuna, como para los placebo. Al analizarlo con la prueba exacta de Fisher dio un resultado estadísticamente no significativo ($p > 0.999$). Quince días después de la administración de la primera dosis de vacuna, se observó aumento en el título de anticuerpos en el grupo vacuna, a diferencia del grupo placebo, en donde obtuvimos una $p = 0.047$. Este resultado nos demuestra que hay una diferencia estadísticamente significativa, aunque esta se encuentre cercana al límite de significancia de 0.05. Sin embargo para el día 30 no existe diferencia entre ambos grupos con respecto al título de anticuerpos, así la diferencia entre ambos grupos carece de significancia estadística ($p = 0.378$).



B. Respuesta celular

Por otra parte el análisis de la respuesta inmune celular realizado por medio de la proliferación de linfocitos, en donde los resultados fueron transformados de densidad óptica a índices de estimulación (por medio de la ecuación anteriormente mencionada en la metodología) y se les analizó con una prueba estadística apropiada para cada caso. A las células estimuladas con el antígeno de *T. solium* y con la planta no transgénica, se les realizó el test de exacta de Fisher, en donde obtuvimos para ambos antígenos a diferentes tiempos un resultado estadísticamente no significativo. Sin embargo para las células estimuladas con la vacuna en los tiempos 15 y 30 obtuvimos resultados estadísticamente significativos de $p=0.0085$ y $p=0.0192$ respectivamente.

Como podemos observar en los gráficos mostrados existe variabilidad entre la respuesta presentada entre el grupo vacuna y el grupo placebo, en donde hay que destacar que no solo entre los grupos se da esta variabilidad, sino también entre cada miembro de los grupos, pudiendo evidenciarse con mayor facilidad en las gráficas de índices de estimulación.



IX. DISCUSION

La vacuna S3Pvac se ha evaluado en sus diferentes versiones, en donde solo algunas de ellas han sido realizadas en campo y han demostrado su efectividad en porcinos expuestos a infectarse naturalmente, una de las vacunas evaluadas en campo y que demostró su efectividad es la vacuna S3Pvac sintética, la cual redujo la prevalencia de parásitos en un 50%, así como ocasionar daños a cisticercos establecidos, lo cual fue demostrado por medio de necropsia, (31), también ha demostrado tener propiedades terapéuticas (50). En porcinos experimentalmente infectados redujo del 94 al 38% por ciento de cisticercos vesiculares y observándose calcificados del 95 al 100% de los parásitos en cuatro de cinco cerdos tratados. Otra versión más reciente probada en campo fue la vacuna S3Pvac expresada en fagos filamentosos recombinantes (M13), que demostró para la cisticercosis experimental murina y porcina niveles de protección y una reducción del 87% el número de cisticercos (35, 36).

En un experimento controlado en donde se evaluó la respuesta inmune TH1 y TH2 debido a la vacunación de porcinos, se demostró aumento importante en la producción de los niveles de anticuerpos específicos contra los antígenos vacúnales, el cual se mantuvo desde el día 7 (posteriores a la primera inmunización) y durante todo el experimento (46). En nuestro proyecto, en contraparte carecimos de una respuesta sostenida. La respuesta dada de la producción de anticuerpos, debido a la vacunación, fue encontrada e estadísticamente significativa al tiempo 15 en el



grupo vacuna. En ese tiempo, los niveles de anticuerpos contra S3Pvac-papaya muestran una tendencia a aumentar en los porcinos vacunados, lo que nos indica que el porcino ha estado en contacto con la vacuna a diferencia del grupo placebo. Al contrario de lo que se esperaría, que se mantuviera el título elevado de anticuerpos o estos tendieran a aumentar en los posteriores días debido a una segunda inmunización, en el tiempo 30 el título de anticuerpos encontrados en sangre periférica se encuentra disminuyendo en algunos porcinos vacunados. Así mismo al analizar la respuesta inmune celular (con índices de estimulación celular positivos), en donde comparamos al grupo vacuna contra el grupo placebo con los diferentes antígenos, el único antígeno con el que obtuvimos una diferencia significativa entre ambos grupos fue con VP al tiempo 15 y 30. Sin embargo los índices de estimulación (grafica 7), se encuentran ligeramente elevados sin llegar a ser títulos altos, lo cual corresponde a valores de índices de estimulación iguales o mayores a 5, también vemos que los índices están disminuyendo en el tiempo 30 con respecto al tiempo 15, comportándose en las respuestas tanto humoral como celular con tendencia a disminuir, lo cual nos hace sospechar de la baja inmunogenicidad de esta vacuna, por lo que podría ser necesario aumentar el número de muestra para tener más potencia estadística (o tener un error de type II menor) para confirmar esto.

Otro punto a considerar es que nuestro proyecto se llevo a cabo en condiciones reales de transmisión, en donde a diferencia de condiciones experimentalmente controladas, los porcinos se encuentran mal alimentados, estresados y expuestos a ingerir huevos de tenia en diversas ocasiones. Esas condiciones podrían explicar el



aumento de anticuerpos en el grupo control al día 30, que sugiere que el porcino ha estado en contacto con el parásito en algunos casos. Así mismo podríamos pensar en la posibilidad de evaluar situaciones de inmunosupresión que pudieran estar influyendo en los resultados en los porcinos de ambos grupos.

En contraste con estudios anteriores en donde determinan que la vacuna S3Pvac promueve la producción de citocinas proinflamatorias por medio de una respuesta proliferativa celular específica (46), la cual causa protección en contra del parásito y que también podría participar en controlar la instalación así como el desarrollo del mismo (46).

S3Pvac-papaya ha sido probada en un protocolo murino y ha demostrado a través de la vacunación oral ser capaz de obtener la inmunidad sistémica y la protección contra la cisticercosis murina en condiciones experimentales (47), aplicada en dos dosis reduciendo la cantidad de parásitos en más del 90% y más del 70% de los murinos estaban totalmente protegidos (40). Cabe recordar que a pesar de que la *T. crassiceps* es causante de la cisticercosis murina y la *T. solium* de la cisticercosis porcina y humana, estas poseen ciclos de vida muy similar y sus antígenos presentan reactividad cruzada con los antígenos de cisticercos de *T. solium* (21, 22). Existen diferencias entre estos dos modelos que hay que tomar en cuenta a la hora de analizar los resultados y evaluar las vacunas.



1. Limitaciones

Las limitaciones que encontramos en este estudio se encuentran relacionadas a determinadas ocasiones, en que el hecho de que una prueba no sea estadísticamente significativa, también nos sugiere principalmente una falta de potencia estadística. Así después de nuestro trabajo parece posible determinar las hipótesis y los valores necesarios para el cálculo de tamaño de la muestra con suficiente potencia que evidencie una diferencia entre ambos grupos. Para en un futuro estudio, poder demostrar diferencia entre los grupos vacuna y placebo, al tiempo T15 con la hipótesis de tener los mismos resultados que los que fueron encontrados durante nuestro estudio (34% de estimulación en el grupo vacuna y 17% en el grupo placebo), el tamaño necesario con una potencia de 90% es de 137 lechones por grupo (48). Lo que representa un total de 274 lechones. Para tener realmente este tamaño al momento del análisis estadístico con la hipótesis de una pérdida de 10% del número de efectivos es necesario incluir 301 lechones, lo que representa diez veces el tamaño que incluimos en nuestro trabajo.

Por otra parte, encontramos desde el inicio de nuestro estudio (T0) una diferencia significativa entre los grupos por el género, a pesar de la randomización. El género es también un factor importante ya que algunos autores sugieren que podría estar implicado en las capacidades inmunogénicas (51), por lo que tenemos que tomar esta diferencia en cuenta para la realización de nuestras pruebas estadísticas. Proponemos en un futuro experimento realizar una randomización



equilibrada para el sexo, ya que se sospecha que juega un papel importante en la estimulación inmunológica.

La limitación más importante de este trabajo es el carecer de un seguimiento mayor a los 30 días, incluso seguir a los porcinos hasta su etapa adulta para saber la proporción de porcinos infectados en cada grupo por medio de necropsia, así mismo se podría revisar en órganos linfoides secundarios la presencia de células de memoria (las cuales tienden a ser más duraderas y por ellos pueden responder rápidamente a una segunda exposición al antígeno) y células plasmáticas (las cuales producen anticuerpos específicos). Cabe destacar también que todos los precedentes estudios de vacunación no demostraron la capacidad de los anticuerpos de dañar al parásito (46).

2. Puntos positivos

La importancia de los resultados mostrados en este estudio radica en que este fue realizado en circunstancias que no serían posibles reproducirlas en un estudio controlado (ya que estas situaciones son las que prevalecen en el uso real de una vacuna en campo), por lo que con esto obtenemos un panorama más amplio de la respuesta inmunológica que se desencadena con la vacuna S3Pvac-papaya y de la efectividad de dicha respuesta en los porcinos.

Además de prevenir algunos factores que podrían causarnos confusión a la hora de evaluar vacunas.



X. CONCLUSIONES

La vacuna S3Pvac- papaya evaluada en porcinos demostró tener una respuesta inmunológica celular, que en estudios futuros podríamos reevaluar con un tamaño de muestra más grande y por un seguimiento de más tiempo, incluyendo como se ha realizado en estudios posteriores desafío de los porcinos con huevos de *T. solium* y posteriormente sacrificar a los porcinos y en la necropsia hacer recuento de cisticercos en cada porcino de ambos grupos y por medio de histología determinar en qué estadio de destrucción se encuentran.



XI. BIOÉTICA

Los animales fueron tratados conforme lo designa la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones para la producción, cuidado y uso de animales que informa que cada institución de investigación que utilice animales de laboratorio se establece las medidas específicas pertinentes de bioseguridad y salud ocupacional de acuerdo con su situación particular determinada por su Comité de Bioseguridad, su Comité Interno de Cuidado y uso de animales de laboratorio y su área administrativa encargada de las relaciones laborales.



XII. BIBLIOGRAFÍA

1. Willms KL, Vargas-Parada L, Laclette JP.

Biología del parásito en Cisticercosis. Guía para profesionales de la salud. Larralde C, S de Aluja A (Eds.) México, Fondo de Cultura Económica. Secretaría de Salud, Instituto Nacional de Salud Pública, Fundación Mexicana para la salud; 2006:19-38.

2. Secretaría de Salud. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Boletín epidemiológico 2009; 1:4.4, 8.1.

3. Martínez-Maya JJ, de Aluja AS, Ávila-Ramírez G, Aguilar-Vega L, Plancarte-Crespo A, Jaramillo-Arango CJ.

Teniosis y detección de anticuerpos anticisticercosis en personas de una comunidad rural del estado de Guerrero, Salud Pública Méx. 2003;45:84-89.

4. Sciutto E, Fragoso G, Manoutcharian K, Gevorkian G, Rosas-Salgado G, Hernández-González M, Herrera-Estrella L, Cabrera-Ponce JL, López-Casillas F, González-Bonilla C, Santiago-Machuca A, Ruíz-Pérez F, Sánchez J, Goldbaum F, Aluja A, Larralde C.

New Approaches to Improve a Peptide Vaccine Against Porcine *Taenia solium* Cysticercosis, Archives of Medical Research, 2002;33:371-378.



5. Sciutto E, Fragoso G, Fleury A, Laclette JP, 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; 2:1875-1890.

6. Fleury A, Escobar A, Chavarría A, Carrillo-Mezo R, Sciutto E.

Cisticercosis guía para profesionales de la salud, Cisticercosis en el ser humano, Fondo de Cultura Económica, México D.F. 2006; pag 41:59-62.

7. Handali S, Klarman M, Gaspard AN, Dong XF, Laborde R, Noh J, Lee YM, Rodriguez S, Gonzalez AE, Garcia HH, Gilman RH, Tsang VC, Wilkins PP.

Development and evaluation of a magnetic immunochromatographic test to detect *Taenia solium*, which causes taeniasis and neurocysticercosis in humans. *Clin Vaccine Immunol*. 2010;17:631-637.

8. Flisser A and Gyorkos TW.

Contribution of immunodiagnostic tests to epidemiological/intervention studies of cysticercosis/taeniosis in Mexico. *Parasite Immunol*. 2007;29:637-649.

9. Somers R, Dorny P, Nguyen VK, Dang TC, Goddeeris B, Craig PS, Vercruysse J.

Taenia solium taeniasis and cysticercosis in three communities in north Vietnam. *Trop Med Int Health*. 2006;11:65-72.



10. Román G, Sotelo J, Del Brutto O, Flisser A, Dumas M, Wadia N, Botero D, Cruz M, Garcia H, de Bittencourt PR, Trelles L, Arriagada C, Lorenzana P, Nash TE, Spina-França A.

A proposal to declare neurocysticercosis an international reportable disease. Bull World Health Organ. 2000;78:399-406.

11. Castellanos Sánchez VO, Sánchez Rodríguez, S. de Aluja A, Gómez E Conde, Hernández Jáuregui P, Díaz Y Orea MA.

En: Rocha Gracia RC, Lozano Zarain P, Martínez Laguna Y (Eds). Temas Selectos de Microbiología. Publicación especial de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, México. Teniasis/cisticercosis; mecanismos de evasión a la respuesta inmune, 2007. pp. 269-288.

12. Norma Oficial Mexicana, NOM-021-SSA2-1994, para la vigilancia, prevención y control del binomio Taeniosis/Cisticercosis en el primer nivel de atención médica. (Modificación de la NOM-021-SSA2-1994), diario oficial de la federación, 1996.

13. Aluja A.

Frequency of porcine cysticercosis in Mexico. In: Flisser A, Willms K, Laclette JP, Larralde C, Ridaura C, Beltrán F. Cysticercosis: present stage of knowledge and perspectives. New York, N. Y. Academic Press, 1982; 53-62.



14. Sarti E, Schantz P, Plancarte A, Wilson M, Gutierrez I, Lopez A, Roberts J, Flisser A.

Prevalence and risk factors for *Taenia solium* taeniasis and cysticercosis in humans and pigs in a village in Morelos, Mexico. *Am J Trop Med Hyg.* 1992;46:677-685.

15. Martínez-Maya JJ, de Aluja AS, Ávila-Ramírez G, Aguilar-Vega L, Plancarte-Crespo A, Jaramillo-Arango CJ.

Teniosis y detección de anticuerpos anticisticercos en personas de una comunidad rural del estado de Guerrero. *Salud Publica Mex.* 2003;45:84-89.

16. Sciutto E, Fragoso G, Manoutcharian K, Gevorkian G, Rosas-Salgado G, Hernández-Gonzalez M, Herrera-Estrella L, Cabrera-Ponce J, López-Casillas F, González-Bonilla C, Santiago-Machuca A, Ruíz-Pérez F, Sánchez J, Goldbaum F, Aluja A, Larralde C.

New approaches to improve a peptide vaccine against porcine *Taenia solium* cysticercosis. *Arch Med Res.* 2002;33:371-378.

17. Lightowers MW.

Vaccines for prevention of cysticercosis. *Acta Trop.* 2003;87:129-135.

18. Lightowers MW.

Eradication of *Taenia solium* cysticercosis: a role for vaccination of pigs. *Int J Parasitol.* 2010;40:1183-1192.



19. 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 RJ, Goldbaum FA, Huerta M, Diaz-Orea A, Fleury A, de Aluja AS, Cabrera-Ponce JL, Herrera-Estrella L, Fragoso G, Larralde 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;25:1368-1378.

20. Freemann RS.

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

21. Larralde C, Sotelo J, Montoya RM, Palencia G, Padilla A, Govezensky T, Diaz ML, Sciutto E.

Immunodiagnosis of human cysticercosis in cerebrospinal fluid: antigens from murine *Taenia crassiceps* cysticerci effectively substitute those from porcine *T. solium*. *Arch. Pathol. Lab. Med*. 1990;114:926-928.

22. Larralde C, Montoya RM, Sciutto E, Díaz ML, Govezensky T, Coltorti E.

Deciphering Western Blots of tapeworm antigens (*T. solium*, *Echinococcus granulosus* and *Taenia crassiceps*) reacting with sera from neurocysticercosis and hydatid disease patients. *Am. J. Trop. Med. Hyg* 1989;40:284-292.



23. Valdez F, Hernández 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;80:931-936.

24. Sciutto E, Fragoso G, Trueba D, Lemus D, Montoya RM, Díaz ML, Govezensky T, Lomelí T, Tapia R, Larralde C.

Cysticercosis vaccine: cross protecting immunity with *T. solium* antigens against experimental murine *T. crassiceps* cysticercosis. *Parasite Immunol.* 1990;12:687-696.

25. Sciutto E, Aluja AS, Fragoso G, Rodarte LF, Hernández M, Villalobos N, Padilla A, Keilbach N, Baca M, Govezensky T, Díaz S, Larralde C.

Immunization of pigs against *T. solium* cysticercosis. Factors related to effective protection. *Vet. Parasitol.* 1995; 60:53-67.

26. Manoutcharian K, Rosas G, Hernández M, Fragoso G, Aluja A, Villalobos N, Rodarte LF, Sciutto E.

Cysticercosis: identification and cloning of protective recombinant antigens. *J. Parasitol.* 1996;82:250-254.



27. Rosas G, Cruz-Revilla C, Fragoso G, López-Casillas F, Pérez A, Bonilla MA, Rosales R, Sciutto E.

Taenia crassiceps cysticercosis: humoral immune response and protection elicited by DNA immunization. *J Parasitol.* 1998;84:516-523.

28. Cruz-Revilla C, Rosas G, Fragoso G, López-Casillas F, Toledo A, Larralde C, Sciutto E.

Taenia crassiceps cysticercosis: protective effect and immune response elicited by DNA immunization. *J Parasitol.* 2000;86:67-74.

29. Toledo A, Larralde C, Fragoso G, Gevorkian G, Manoutcharian K, Hernández M, Acero G, Rosas G, López-Casillas F, Garfias CK, Vázquez 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;67:2522-2530.

30. Toledo A, Fragoso G, Rosas G, Hernández M, Gevorkian G, López-Casillas F, Hernández 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;69:1766-1773.



31. Huerta M, de Aluja AS, Fragoso G, Toledo A, Villalobo N, Hernández M, Gevorkian G, Aero G, Díaz A, Alvarez I, Avila R, Beltrán C, Gracia G, Martínez J, Sarralde C, Sciutto E.

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

32. Scott JK and Smith GP.

Searching for peptides ligands with an epitope library. *Science*. 1990;249:386-390.

33. Sidhu SS.

Phage display in pharmaceutical biotechnology. *Curr Opin Biotechnol*. 2000;11:610-616.

34. Manoutcharian F, Gevorkian G, Cano A, Almagro JC.

Phage displayed biomolecules as preventive and therapeutic agents. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 2001;2:217-223.

35. Manoutcharian K, Díaz-Orea A, Gevorkian G, Fragoso G, Acero G, González E, Aluja A, Villalobos N, Gómez-Conde E, Sciutto E.

Recombinant bacteriophage-based multiepitope vaccine against *Taenia solium* pig cysticercosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2004;99:11-24.



36. Morales J, Martínez JJ, Manoutcharian K, Hernández M, Fleury A, Gevorkian G, Acero G, Blancas A, Toledo A, Cervantes J, Maza V, Quet F, Bonnabau H, de Aluja AS, Fragoso G, Larralde C, Sciutto E.

Inexpensive anti-cysticercosis vaccine: S3Pvac expressed in heat inactivated M13 filamentous phage proves effective against naturally acquired *Taenia solium* porcine cysticercosis. *Vaccine*. 2008;26:2899-2905.

37. Aluja AS, Villalobos NM, Nava G, Toledo A, Martínez JJ, Plancarte A, Rodarte LF, Fragoso G, Sciutto E.

Therapeutic capacity of the synthetic peptide-based vaccine against *Taenia solium* cysticercosis in pigs. *Vaccine*. 2005;23:4062-4069.

38. Sciutto E, Morales J, Martínez JJ, Toledo A, Villalobos MN, Cruz-Revilla C, Meneses G, Hernández M, Díaz A, Rodarte LF, Acero G, Gevorkian G, Manoutcharian K, Paniagua J, Fragoso G, Fleury A, Larralde R, De Aluja AS, Larralde C.

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.

39. Sciutto E, Morales J, Rosas G, Fragoso G, Hernández M, Díaz A, Meneses G.

The multiepitope Anticysticercosis Vaccine from Laboratory to the Field: Novel Delivery Systems and Alternative Routes for Vaccine Administration. 11th International Congress of Parasitology. United Kingdom. 2006 Agst.



40. Hernández M, Cabrera-Ponce JL, Fragoso G, López-Casillas F, Guevara-García A, Rosas G, León-Ramírez C, Juárez P, Sánchez-García G, Cervantes J, Acero G, Toledo A, Cruz C, Bojalil R, Herrera-Estrella L, Sciotto E.

A new highly effective anticysticercosis vaccine expressed in transgenic papaya. *Vaccine*. 2007;25:4252-4260.

41. Cabrera-Ponce JL, López L, Assad-García N, Medina-Arevalo C, Bailey AM, Herrera-Estrella L.

An efficient particle bombardment system for the genetic transformation of asparagus (*Asparagus officinalis* L.) *Plant Cell Reports*. 1996;16:255-260.

42. Sala C, Forti F, Di Florio E, Canneva F, Milano A, Riccardi G, Ghisotti D.

Mycobacterium tuberculosis Fura autorregula su propia expresión. *Bacteriol*. 2003;185:5357-5362.

43. Biemelt S, Sonnewald U, Galmbacher P, Wilmitzer L, Muller M.

Production of human papillomavirus type 16 virus-like particles in transgenic plants. *J Virol*. 2003;77:9211-9220.

44. Warzecha H, Mason HS, Lane C, Tryggvesson A, Rybicki E, Williamson AL, Clements JD, Rose RC.

Oral immunogenicity of human papillomavirus-like particles expressed in potato. *J Virol*. 2003;77:8702-8711.



45. Mechtcheriakova IA, Eldarov MA, Nicholson L, Shankx M, Skryabin KG, Lomonosoff GP.

The use of viral vectors to produce hepatitis B virus core particles in plants. *J Virol Methods* .2006;131:10-15.

46. Díaz MA, Villalobos N, de Aluja A, Rosas G, Gómez-Conde E, Hernández P, Larralde C, Sciutto E, Fragoso G.

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;93:81-90.

47. Sciutto¹ E, Hernández M, Díaz-Orea A, Cervantes J, Rosas-Salgado G, Morales J, Villalobos N, Aluja A, Blancas A, Aquino R, Fuentes O, Jiménez H, Trejo-Moreno C, Méndez-Martínez M, Manoutcharian M, Gevorkian G, Herrera-Estrella L, Cabrera Ponce J.L, Larralde C, Fragoso G, M. Huerta.

Towards a practical and affordable Oral Papaya-Based Vaccine: A crucial tool for Taeniasis Cysticercosis control programs. Chapter 13 In: *Bioprocess Sciences and Technology* ISBN 978-1-61122-950-9 Editor: Min-Tze Liong, pp. © 2011 Nova Science Publishers, Inc.

48. Fleiss JL, Tytun A, Ury SHK.

A simple approximation for calculating sample sizes for comparing independent proportions. *Biometrics* 1980;36:343-346.



49. Cabrera-Ponce JL, Vegas JA, Herrera-Estrella.

Herbicide resistant transgenic papaya plants produced by and efficient particle bombardments transformation methods. *Plant Cell Reports*.1995;15:1-7.

50. Aluja, AS, Villalobos N, Nava G, Toledo A, Martínez JJ, Plancarte A, Rodarte LF, Fragoso G, Sciutto E.

Therapeutic capacity of the synthetic peptide-based vaccine against *Taenia solium* cysticercosis in pigs. *Vaccine*. 2005;23:4062-4069.

51. Morales J, S. de Aluja A, Martínez J.J, Hernández M, Rosas G, Villalobos N, Hernández B, Blancas A, Manoutcharian K, Gevorkian G, Cervantes J, Díaz A, Fleury A, Fragoso G, Larralde C, Sciutto E.

Recombinant S3Pvac-phage anticysticercosis vaccine: Simultaneous protection against cysticercosis and hydatid disease in rural pigs. *Veterinary Parasitology*. 2011;176:53-58.

52. Morales J., Velasco T, Tovar V, Fragoso G, Fleury A, Beltrán C, Villalobos AN, de Aluja AS, Rodarte LF, Sciutto CE, Larralde C.

Castration and pregnancy of rural pigs significantly increase the prevalence of naturally acquired *Taenia solium* cysticercosis. *Veterinary Parasitology*. 2002;108:41-48.



XIII. ANEXOS

1. DETERMINACION DE PREVALENCIA DE CISTICERCOSIS PORCINA EN EL ESTADO DE PUEBLA

Nombre del técnico: _____ Fecha: _____

Nombre del propietario: _____

Municipio: _____ Localidad: _____ Domicilio: _____

Los cerdos deambulan libremente: Si No

Suministro de agua: Tubería _____ Pozo _____ Barranca y ríos _____ otros _____

Tipo de alimentación: Concentrado: _____ Escamocha: _____ Maíz: _____ otros: _____

Origen del porcino: Local: _____ Otro municipio: _____ Otro estado: _____

Destino: Autoconsumo: _____ Mercado Local: _____ Rastro: _____ Intermediario: _____

Información de los porcinos criollos:

No	Edad (años, Meses)	Sexo: M= Macho H= Hembra	Estado reproductivo: MC=Macho castrado ME=Macho entero MG=Hembra gestante HL=Hembra lactando HNG=Hembra no gestante	No. de partos (en su caso)	Fecha de castración (en su caso)	Raza Predominante	Peso aproximado (Kg.)	Diagnostico en lengua 1=Neg. 2 =post. Menos de 3 3=post. Mas de 3
1								
2								
3								
4								
5								
6								
7								
8								
9								
10								



2. CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN EL PROYECTO DE INVESTIGACION

Puebla, a _____ de _____ del 20__

Por medio de la presente, acepto participar de manera voluntaria en el proyecto de investigación titulado: **EVALUACION DE LA CAPACIDAD INMUNOGENICA DE LA VACUNA ORAL CONTRA LA CISTICERCOSIS PORCINA S3PVAC EXPRESADA EN PAPAYA**, me informaron que este estudio tiene como objetivo: Evaluar en cerdos nativos (criollos), y la respuesta inmunológica inducida por vacunación por vía oral, con la vacuna sintética (S3Pvac) en cerdos expuestos al desafío natural mantenidos en comunidades rurales del Estado de Puebla. Esta información nos permitirá considerar a la vacunación como herramientas para reducir el control de esta zoonosis.

Se me ha explicado que mi participación consistirá en autorizar que me realice una encuesta en la cual se recabara la información sociodemográfica, inspección y edad de mis porcinos con la finalidad de conocer si los cerdos tienen cisticercosis. Así como la toma de muestra de heces y sangre de mis porcinos para su posterior análisis. Declaro que se me ha informado ampliamente sobre las posibles molestias y beneficios derivados de la participación en el estudio.

El investigador principal del estudio me ha hecho saber que tengo derecho a realizar cualquier pregunta sobre el avance del proyecto en cualquier momento. También me informaron que toda la información recabada, será estrictamente confidencial, por lo que no se me identificara en las presentaciones o publicaciones que deriven del estudio.

Nombre y firma del participante

Investigador principal

Nombre y firma del testigo



3. BASE DE DATOS

Identificación	Gp.: 1vac 2)pac	Sexo: 1)hembra	Edad	provenir 1)preto	Deambular(0) no 2)si	Destino: 1)autocors	2)venta 3)abdes	emero 2)estrado	Dx final: 1) negativo	2) positivo	La vacunación	La toma de muestra	2a toma de muestra	3a toma de muestra	maestra	propietario	Comunidad	agua: 1)ubera 2) pozos 3)cañes	santitas: 0)no	1)si	proliferación T0	prefit T15	prefit T30
1	1	1	2	2	0	3	.	.	1	1	03/08/2008	20/07/2008	03/08/2008	17/08/2008	Caterina Vela	San Andres	1	1	1	0.229	0.687	0.816	
2	2	1	2	2	0	3	.	.	1	1	20/07/2008	20/07/2008			Caterina Vela	San Andres	1	1					
3	1	2	2	2	0	3	1	1	1	1	03/08/2008	20/07/2008	03/08/2008	17/08/2008	Caterina Vela	San Andres	1	1	0.150	0.58	0.909		
4	2	1	2	2	0	3	.	.	1	1	20/07/2008	20/07/2008	03/08/2008	17/08/2008	Juana Romero	San Andres	1	1	0.204	0.103	0.107		
5	2	1	2	2	0	3	.	.	1	1	20/07/2008	20/07/2008	03/08/2008	17/08/2008	Juana Romero	San Andres	1	1	0.215	0.512	0.263		
6	1	2	2	2	0	3	1	1	1	1	20/07/2008	20/07/2008			Isabel Cobos Mc	San Andres	1	1					
7	1	2	2	2	0	3	2	1	1	1	20/07/2008	20/07/2008	03/08/2008	17/08/2008	Isabel Cobos Mc	San Andres	1	1	0.248	0.793	0.646		
8	2	1	2	2	0	3	.	.	1	1	20/07/2008	20/07/2008	03/08/2008	17/08/2008	Isabel Cobos Mc	San Andres	1	1	0.26	0.483	0.203		
9	2	1	2	2	0	3	.	.	1	1	20/07/2008	20/07/2008	03/08/2008	17/08/2008	Isabel Cobos Mc	San Andres	1	1	0.185	0.218	0.224		
10	1	2	2	2	0	3	2	1	1	1	20/07/2008	20/07/2008	03/08/2008	17/08/2008	Leticia Orta Rom	San Andres	1	1	0.350	0.785	0.365		
11	2	2	2	2	0	3	2	1	1	1	20/07/2008	20/07/2008	03/08/2008	17/08/2008	Leticia Orta Rom	San Andres	1	1					
12	2	1	2	2	0	3	.	.	1	1	27/07/2008	27/07/2008			Juana Rosas Cor	San Andres	1	1					
13	1	2	2	2	0	3	1	1	1	1	27/07/2008	27/07/2008			Ma. Silvana Tep	San Andres	1	1					
14	1	1	2	2	0	3	.	.	1	1	03/08/2008	27/07/2008	10/08/2008	24/08/2008	Mercedes Cordel	San Andres	1	1	0.093	0.214	0.314		
15	2	1	2	2	0	3	.	.	1	1	27/07/2008	27/07/2008	10/08/2008	24/08/2008	Mercedes Cordel	San Andres	1	1	0.159	0.151	0.086		
16	1	1	2	2	0	3	.	.	1	1	27/07/2008	27/07/2008	10/08/2008	24/08/2008	Maria Escalona	San Andres	1	1	0.22	0.469	0.42		
17	1	2	2	2	0	3	1	1	1	1	27/07/2008	27/07/2008	10/08/2008	24/08/2008	Candelaria Rojas	San Andres	1	1	0.24	0.424	0.363		
18	2	1	2	2	0	3	.	.	1	1	27/07/2008	27/07/2008	10/08/2008	24/08/2008	Maria Escalona	San Andres	1	1	0.346	0.409	0.128		
19	2	1	2	2	0	3	.	.	1	1	27/07/2008	27/07/2008	10/08/2008	24/08/2008	Candelaria Rojas	San Andres	1	1	0.173	0.077	0.191		
20	1	2	2	2	0	3	1	1	1	1	27/07/2008	27/07/2008	10/08/2008	24/08/2008	Justino Escalona	San Andres	1	1	0.15	0.474	0.304		
21	1	2	2	2	0	3	1	1	1	1	27/07/2008	27/07/2008	10/08/2008	24/08/2008	Crisoforo P. Piel	San Andres	1	0	0.259	0.402	0.351		