



**BENEMÉRITA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE PUEBLA
FACULTAD DE MEDICINA**

**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS DE POSGRADO
MAESTRÍA EN CIENCIAS MÉDICAS E INVESTIGACIÓN**

**“DETERMINACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE INDUCIDA POR S3Pvac
PAPAYA A DOSIS ÓPTIMA POR VÍA ORAL Y EFICACIA DE DIFERENTES
ADYUVANTES EN RATONES BALB/cAnN”**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS MÉDICAS E INVESTIGACIÓN**

Presenta:

José Luis Gálvez Romero

Director de Tesis:

D. C. Luis Guillermo Vázquez de Lara Cisneros

Jefe del Laboratorio de Medicina Experimental

Co-Director:

Doctor en Biopatología Médica Elias Pezzat Said



Puebla, Pue.

Julio del año 2015

Dedicatoria

A mi familia:

**Clau, Dany y Ale, por el amor, apoyo y paciencia que me tienen cada vez
que inicio una nueva empresa.**

Agradecimientos

Gracias al **Dr. Luis Guillermo Vázquez de Lara Cisneros** por todas sus enseñanzas, por su paciencia y por todo su apoyo.

Gracias a **CONACYT** por brindarme apoyo financiero con el número de beca 548437, el cual concluye con la obtención de grado.

Gracias al **Hospital ISSSTE Regional de Puebla** por el permiso y apoyo para poder realizar esta maestría.

Gracias por el apoyo financiero para este proyecto a las siguientes dependencias de la **Benemérita Universidad Autónoma de Puebla**:

A la Secretaría de Investigación y Estudios de Posgrado de la Facultad de Medicina.

A la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado.

Gracias por el apoyo financiero a la **red temática de colaboración académica**:

Patología experimental y el aislamiento y transformación de productos naturales y su actividad biológica.

Contenido

Dedicatoria	b
Agradecimientos	c
INDICE DE FIGURAS	iv
INDICE DE TABLAS.....	v
RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	2
ANTECEDENTES GENERALES	3
RESPUESTA INMUNE INDUCIDA	4
VACUNAS	4
RESPUESTA INMUNE INDUCIDA POR VACUNAS	5
FORMAS PARA MEDIR LA INMUNIDAD HUMORAL Y CELULAR <i>IN VIVO</i>	8
DOSIS ÓPTIMA DE VACUNAS	10
EFICACIA DE ADYUVANTES EN EL EMPLEO DE VACUNAS	10
REPERCUSIÓN E IMPACTO ECONÓMICO	11
ANTECEDENTES ESPECIFICOS.....	12
MODELO MURINO DE CISTICERCOSIS.....	12
VACUNA S3Pvac (vacuna sintética de tres péptidos).....	12
RESPUESTA CRUZADA ENTRE LOS ANTÍGENOS DE <i>T. crassiceps</i> y <i>T. solium</i>	13
VACUNA S3Pvac (aplicación subcutánea)	15
S3Pvac Fago	15
Extracto soluble de S3Pvac papaya.....	15
ESTUDIOS EXPERIMENTALES DE LA VACUNA S3Pvac	17
IDENTIFICACION DE LA CAPACIDAD PROTECTORA DE ETgpC (Líneas celulares de papaya transgénica y embriogénica) Extracto soluble de S3Pvac- Papaya	17
RESPUESTA INMUNOLOGICA A LA VACUNA S3Pvac.....	19

JUSTIFICACIÓN	20
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	20
HIPÓTESIS	21
OBJETIVOS	22
OBJETIVOS GENERALES	22
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
INFRAESTRUCTURA FÍSICA Y HUMANA.....	23
HUMANOS:	23
MATERIALES:.....	23
FINANCIEROS:	23
ASPECTOS ÉTICOS:	23
MATERIAL Y MÉTODOS	24
CRITERIOS DE INCLUSIÓN:	24
METODOLOGÍA GENERAL (PARA TODOS LOS OBJETIVOS)	26
Ratones BALB/cAnN.....	26
VACUNA oral “extracto soluble de S3Pvac PAPAYA”	28
PREPARACION DE EXTRACTO TOTAL SOLUBLE DE CALLOS EMBRIOGÉNICOS DE S3Pvac PAPAYA..	28
METODOLOGIA PARA CADA UNO DE LOS PROCEDIMIENTOS.	28
PARÁSITOS E INFECCIÓN EXPERIMENTAL.....	28
ADMINISTRACION DE LA VACUNA S3Pvac PAPAYA:.....	29
INFECCIÓN DE RATONES (desafío experimental)	31
SACRIFICIO Y CONTEO DE CISTICERCOS.....	32
OBTENCION DE ANTIGENOS TOTALES DE Taenia crassiceps.....	33
METODOLOGÍA PARA CADA OBJETIVO ESPECÍFICO	33
Objetivo específico 1	33
Objetivo específico 2	36
Objetivo específico 3	39
PRUEBA DE HIPERSENSIBILIDAD INMEDIATA O TIPO I.....	39

PRUEBA DE DTH (Delayed Test Hypersensitivity) O HIPERSENSIBILIDAD TIPO IV	40
Objetivo específico 4	40
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	44
RESULTADOS.....	45
RESULTADOS DE LA MEDICIÓN DE CITOCINAS EN EL SOBRENADANTE DE CULTIVO CELULAR.....	47
DISCUSIÓN	56
DOSIS ÓPTIMA DE S3Pvac-PAPAYA ADMINISTRADA POR VÍA ORAL	56
EFICACIA DE DIVERSOS VEHÍCULOS PARA LA ADMINISTRACIÓN ORAL DEL EXTRACTO SOLUBLE DE S3PVAC PAPAYA.....	57
EVALUACION DE LA RESPUESTA INMUNE	58
CONCLUSIONES.....	61

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Respuesta inmune a vacunas.	7
Figura 2. Prueba de hipersensibilidad tipo IV	9
Figura 3. Ejemplo de método AALAS.....	27
Figura 4. Obtención de larvas de cisticerco a partir de raton infectado	30
Figura 5. Procedimientos realizados en los ratones.....	33
Figura 6. Diseño experimental para obtener la dosis óptima de S3Pvac-papaya.....	35
Figura 7. Diseño experimental para evaluar la respuesta inmune de S3Pvac papaya.....	37
Figura 8. Diseño experimental para evaluar la eficacia de diversos vehículos.....	42
Figura 9. Resumen de todos los diseños experimentales	43
Figura 10. Efecto del empleo de diversas dosis de S3Pvac papaya sobre el número de cisticercos intraperitoneales en ratones hembra BALB/cAnN	46
Figura 11. Efecto de diversos antígenos sobre la producción de interferón gamma en esplenocitos de ratones inmunizados con S3Pvac-papaya.....	48
Figura 12. Efecto de diversos antígenos sobre la producción de IL-2 en esplenocitos de ratones inmunizados con S3Pvac-papaya.....	49
Figura 13. Efecto de diversos vehículos mezclados con S3Pvac-papaya sobre el número de cisticercos intraperitoneales en ratones BALB/cAnN.....	55

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Comparación de la eficacia de diversas vacunas.....	14
Tabla 2. Porcentaje de cisticercos dañados en cerdos vacunados con diversas vacunas experimentales.....	18
Tabla 3. Variables operacionales de medición	25
Tabla 5. Resultados de la prueba de Hipersensibilidad tipo I en ratones BALB/cAnN inmunizados con S3Pvac papaya.....	51
Tabla 6. Resultados de la prueba de hipersensibilidad tipo IV en ratones BALB/cAnN inmunizados con S3Pvac papaya.....	52
Tabla 7. Eficacia de diversos vehículos mezclados con S3Pvac papaya sobre la carga de cisticercos de <i>T. crassiceps</i> en ratones BALB/cAnN.....	54

Abreviaturas

ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ESP	Extracto soluble de papaya
ETgpc	Papaya transgénica y embriogénica
CPH	Complejo principal de histocompatibilidad
IFN- γ	Interferon gamma
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
TGF- β	Factor de crecimiento transformante beta
IL	Interleucina
ORF	Open reading frame
S3Pvac	Vacuna sintética de tres péptidos
S3Pvac papaya	Extracto soluble de S3Pvac expresado en el cayo de la papaya
TCD4+	Linfocito T ayudador
TCD8+	Linfocito T citotóxico
TCD4+CD25+Foxp3	Linfocito T regulador
Th1	Fenotipo de linfocito T ayudador para respuesta de tipo celular
Th2	Fenotipo de linfocito T ayudador para respuesta de tipo humoral
Th3	Fenotipo de linfocito T ayudador para respuesta de tipo reguladora

RESUMEN

Introducción: diversas presentaciones de S3Pvac administrada por vía subcutánea muestran protección contra cisticercosis murina y porcina; sin embargo, esta presentación es costosa y difícil de administrar. La presentación oral de S3Pvac papaya es barata y fácil de administrar.

Objetivos: determinar la respuesta inmune inducida por S3Pvac-papaya a dosis óptima en ratones hembra BALB/cAnN y la eficacia de diversos adyuvantes.

Material y métodos: se emplearon ratones hembra BALB/cAnN de 4 a 6 semanas a las cuales se inmunizó por vía oral con dos dosis a diferentes concentraciones de diversos antígenos (solución salina isotónica, extracto soluble de papaya y S3Pvac papaya). Dos semanas después de la segunda inmunización, se desafiaron con la aplicación de 20 larvas de *Taenia crassiceps*. Treinta días después del desafío, todos los ratones se sacrificaron y se recuperaron los cisticercos de la cavidad peritoneal. La dosis óptima fue elegida del grupo en el cual se recuperó el menor número de cisticercos y esta dosis se empleó para estudiar la respuesta inmune inducida y la eficacia de diversos adyuvantes.

Resultados: la dosis de 10 μ g de S3Pvac-papaya presentó el menor número de cisticercos recuperados, con promedio \pm DE de 9.2 ± 1 ($IC_{95\%}$ de 7.9 a 10.4), con un valor de $p < 0.02$. El mejor vehículo fue la soya, mostró eficacia para reducir el número de cisticercos del 95.7%, ($IC_{95\%}$ de 15.76 a 45.9), $p < 0.006$. La prueba de hipersensibilidad inmediata fue negativa para todos los grupos. La prueba de hipersensibilidad retardada fue positiva sólo en los grupos inmunizados con S3Pvac papaya o bien con la combinación S3Pvac papaya con soya ($p < 0.002$). Los resultados de proliferación celular no fueron interpretables por el poco número de células obtenidas. En todos los grupos se obtuvo poca producción de IFN- γ e IL-2; sin diferencias estadísticamente significativas.

Conclusiones: S3Pvac papaya a dosis de 10 μ g induce una respuesta inmune protectora contra *Tenia crassiceps* en ratones BALB/cAnN. S3Pvac papaya no induce respuesta de alergia y si induce una respuesta inmune celular *in vivo*. La soya es un buen vehículo para administrar S3Pvac papaya por vía oral.

INTRODUCCION

La cisticercosis es una enfermedad endémica en nuestro país causada por el huevo de *Taenia solium* el cual infecta a los cerdos. El ser humano al ingerir la carne contaminada con larvas de éste parásito, desarrolla taeniasis. En el intestino delgado la forma adulta de la *Taenia* libera proglótidos (huevos) los cuales son expulsados através de las heces y contaminan el medio ambiente. Al ingerir accidentalmente estos huevos, el ser humano disemina la forma quística del parásito (cisticerco) en varios tejidos, principalmente en el sistema nervioso central a lo cual conocemos como “neurocisticercosis”; esto genera graves daños en la salud a quien la padece e impacta económicamente a los servicios de salud.

Existen varias estrategias para controlar esta enfermedad, una de las intervenciones más prometedoras es la “vacunación” porcina. Hay varias vacunas elaboradas con la totalidad del cisticerco o bien con subunidades del mismo; sin embargo, la mayoría sólo han mostrado utilidad en el terreno experimental. Por otro lado, recientemente en el Instituto Nacional de Biomedicina de la UNAM se ha desarrollado una vacuna contra la cisticercosis porcina basada en tres péptidos sintéticos (S3Pvac); (KETC1, KETC12 y KETC7 (GK1) de 12, 8 y 18 aminoácidos respectivamente), originalmente identificados en *Taenia crassiceps*. La vacuna S3Pvac muestra una capacidad protectora contra cisticercosis en el cerdo, al disminuir su prevalencia en un 50% y una reducción en la intensidad de la infección en un 98%. Debido a los altos costos y a la difícil aplicación de esta vacuna, se modificaron células embriogénicas de papaya para que expresaran estos 3 péptidos. De este modo, se obtuvo una presentación que hace posible la administración oral de la misma “S3Pvac-papaya”. Con esto, se pretende disminuir los costos y optimizar la aplicación de la vacuna en el hospedero inicial de la cisticercosis, para así disminuir la transmisión hacia el hospedero final. Con el fin de explorar la efectividad de esta nueva presentación en la protección y respuesta inmune contra cisticerco, se ha probado en un modelo murino de teniasis. El presente estudio tiene el objetivo de generar mayor conocimiento en la dosis, respuesta inmune inducida y eficacia de diversos vehículos para la aplicación del extracto soluble de “S3Pvac-papaya” en ratones hembra BALBc/AnN.

ANTECEDENTES GENERALES

La cisticercosis representa una enfermedad común que afecta a cerdos de la mayoría de las poblaciones en el mundo. La forma larvaria de la *Taenia solium* incluye al cerdo como un hospedero intermediario y al ser humano como su reservorio definitivo, organismo en el que madura a su etapa adulta transformándose en cestodo. El intestino del ser humano también sirve como hospedero intermediario para desarrollar la forma quística al ingerir accidentalmente los huevos de la *T. solium*. Las complicaciones de ésta infestación pueden afectar a la mayoría de los tejidos blandos y principalmente el sistema nervioso central, es decir, la neurocisticercosis (Gonzalez y cols., 2003).

Tanto la cisticercosis porcina como la neurocisticercosis humana continúan siendo un problema de salud en la mayor parte del mundo y particularmente en nuestro país. Su transmisión está favorecida por la crianza tradicional de cerdos, inspección sanitaria insuficiente, uso en la agricultura de aguas negras sin tratar o insuficientemente tratadas y una higiene deficiente (Flisser y cols., 2004).

De manera específica en México, aunque no se cuenta con registros estadísticos precisos, se reporta que la prevalencia de cisticercosis porcina es de alrededor del 32%, de aproximadamente 500 casos de neurocisticercosis humana en los últimos 10 años, por supuesto sin reflejar los datos reales (subdiagnosticados) (Fleury y cols., 2012). Una encuesta serológica en México, reportó una seroprevalencia de cisticercosis del 1.2%, lo cual sugiere que el riesgo de entrar en contacto con *T. solium* está distribuido en todo el país y en todos los estratos sociales sin importar la edad ni el género (Larralde y cols., 1992).

Es importante mencionar que se subestima la detección del problema, ya que la infección humana con la forma larvaria y adulta del parásito en su mayoría son asintomáticas, además de que no se cuenta con estudios rutinarios para su diagnóstico (Fleury y cols., 2012). Los métodos convencionales que tratan de interrumpir el ciclo de transmisión para el control de la enfermedad en los cerdos tales como la higiene, letrinas e inspección de la carne, han sido ineficientes e insuficientes, por lo que el uso de vacunas en los animales es una estrategia prometedora (de Aluja y cols., 2005).

RESPUESTA INMUNE INDUCIDA

Los seres vivos para sobrevivir, nos hemos adaptado a lo largo de nuestra existencia interactuando y desarrollando medidas protectoras contra los microorganismos agresores, por lo que ha evolucionado un complejo sistema de defensa, al que se le denomina sistema inmune. La respuesta inmune comprende por un lado, barreras anatómicas y celulares a pequeña escala (a la cual conocemos como inmunidad innata), y por el otro a la activación específica y especializada de células que atacan directamente al microorganismo agresor (inmunidad adquirida). La respuesta inmune inducida se refiere a todo este proceso de reconocimiento, destrucción o control del microorganismo agresor. Esta respuesta se puede inducir al padecer la enfermedad causada por el microorganismo patógeno, o bien de manera profiláctica al aplicar vacunas (derivadas de fracciones o de la totalidad del microorganismo sin su capacidad infectiva).

VACUNAS

La vacunación es una estrategia que activa la inmunidad protectora contra microorganismos patógenos de una manera inducida, es decir, sin necesidad de padecer la enfermedad por infección del microorganismo. Al administrar una fracción antigénica de un microorganismo (en su mayoría péptidos), se despierta una respuesta inmune mediada por linfocitos B y linfocitos T. Los primeros generan anticuerpos neutralizantes (inmunidad humoral) contra el microorganismo en cuestión, y en menor medida se activan tanto los linfocitos T citotóxicos (inmunidad celular), como los linfocitos de memoria (Igietseme y cols., 2004). A partir del descubrimiento de Edward Jenner en 1776 que al inocular en la piel elementos de un microorganismo (vaccinina), la persona generaba una cierta protección en contra de la varicela, se han desarrollado vacunas profilácticas para la mayoría de las enfermedades infectocontagiosas con alta morbimortalidad. Las vacunas previenen anualmente la muerte de más de ocho millones de personas, alrededor de una persona salvada cada cinco segundos por enfermedades infecciosas graves (Arnon y Ben-Yedidia, 2003; Greco, 2001). De igual manera, en la medicina veterinaria las vacunas previenen la mortalidad de los animales, permiten controlar infecciones de manera más eficaz y menos costosa, lo que disminuye el

contagio de las infecciones entre los animales domesticados y al mismo tiempo, su transmisión al ser humano.

En las últimas décadas el desarrollo de vacunas se ha modernizado. Inicialmente las vacunas de primera generación empleaban el microorganismo muerto, vivo atenuado o bien alguna fracción purificada del mismo. Actualmente se emplea la selección de fracciones antigénicas altamente purificadas y elegidas por sus capacidades inmunogénicas (Rappuoli, 2000), lo que permitió el desarrollo de vacunas recombinantes como la vacuna contra la hepatitis por virus B. El procedimiento clásico requiere rescatar a los microorganismos a través de cultivo, por lo cual no es posible realizarlo con los microorganismos que no son cultivables. Al descubrir la secuencia completa del genoma de *Haemophilus influenzae*, se inició una nueva era, la era genómica (Fleischmann y cols., 1995). Hasta ahora más de 1200 genomas han sido secuenciados y cientos están en proceso de serlo. Esta avalancha de datos ha permitido con la ayuda de la bioinformática, explorar los genomas de los microorganismos en búsqueda de proteínas candidatas para el desarrollo de vacunas. A este nuevo diseño se le conoce como “vacunología inversa”, debido a que se eligen los antígenos más importantes para fabricar una vacuna a partir de su inmunogenicidad esperada (Capecchi y cols., 2004)

RESPUESTA INMUNE INDUCIDA POR VACUNAS

La respuesta inmune estimulada por la aplicación de vacunas, inicia con la interacción de la célula dendrítica inmadura con los linfocitos B. En el sitio de la aplicación de la vacuna las células dendríticas inmaduras fagocitan y procesan parte de la estructura microbiana que expresa la secuencia antigénica que activará a los linfocitos (Shastri y cols., 2005). La célula dendrítica migra hasta la zona germinal del ganglio linfático más cercano, lugar donde tendrá el encuentro con linfocitos “B” así como linfocitos “T”. De manera simultánea los antígenos son procesados e incluidos al complejo principal de histocompatibilidad (CPH), de tal manera que el tipo “I” permite la adecuada comunicación con el linfocito TCD8+ (linfocito T que en su mayoría es citotóxico) (Groothuis y cols., 2005), mientras que el tipo “II” permite la adecuada comunicación con

el linfocito TCD4+ (linfocito T que se conoce como helper–ayudador) (Groothuis y cols., 2005).

De acuerdo al microambiente de citocinas producidas, la respuesta por el linfocito T se ha subclasificado en tres tipos funcionales (Kapsenberg, 2003). I) Linfocito TCD4+ con fenotipo Th1 caracterizado por la producción de citocinas IL-2 (interleucina 2), IL-12 (interleucina 12), IFN- γ (interferón gamma) y TNF- α (factor de necrosis tumoral alfa); este fenotipo regula la respuesta inmune de tipo celular, protege fundamentalmente contra antígenos intracelulares y estimula la diferenciación y activación de linfocito TCD8+ y macrófagos (O'Garra y Robinson, 2004). II) Linfocitos TCD4+ con fenotipo Th2 caracterizado por la producción de citocinas IL-4 (interleucina 4), IL-5 (interleucina 5) e IL-13 (interleucina 13); estimula la diferenciación de linfocitos B en células plasmáticas y por lo tanto ejerce una protección contra antígenos extracelulares y helmintos a través de anticuerpos neutralizantes. III) Linfocitos TCD4+CD25+FoxP3 (conocidos también como células T reguladoras) con fenotipo Th3 y que producen citocinas inhibitorias IL-10 (interleucina 10) y TGF- β (factor de crecimiento transformante β). El fenotipo Th3 juega un papel importante en el desarrollo de lo conoce como “tolerancia inmunológica”; esto sucede cuando el antígeno aplicado no ejerce una señal suficiente de daño o bien cuando la concentración de antígeno es excesiva (Dannull y cols., 2005) (fig. 1).

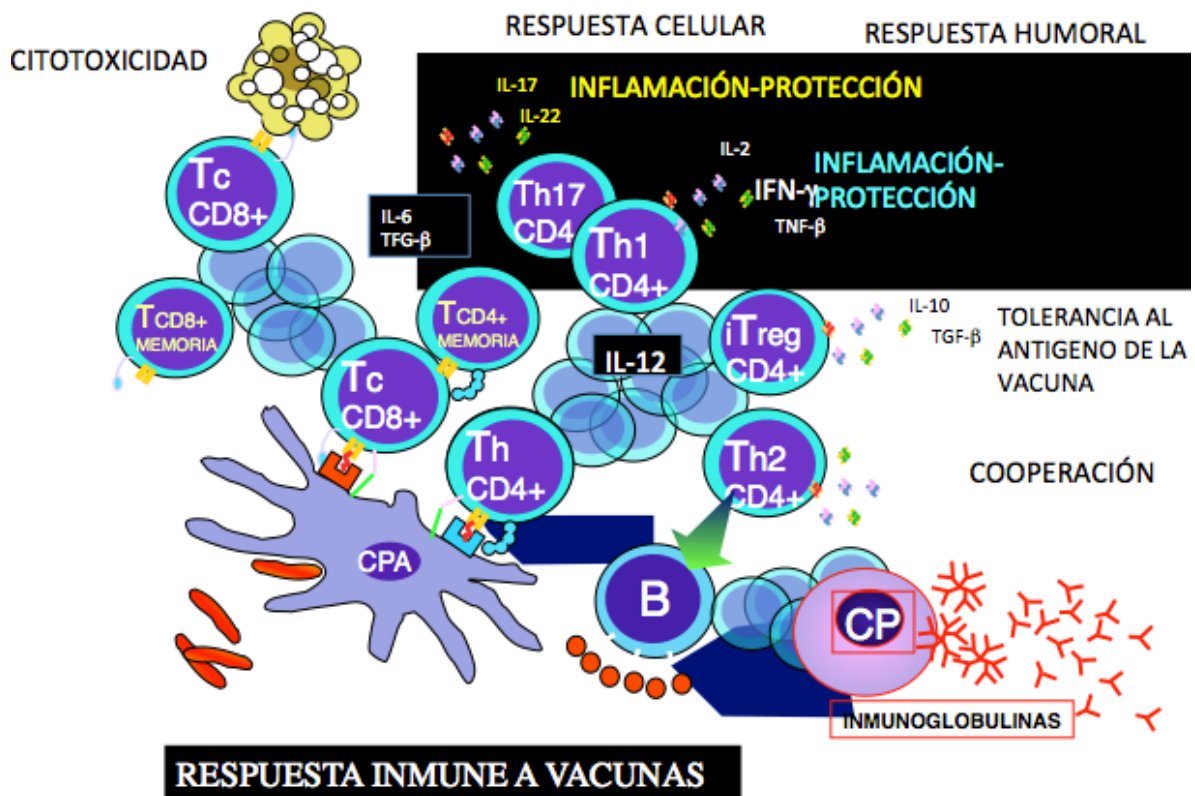


Figura 1. Respuesta inmune a vacunas. La concentración y tipo de secuencia antigénica de la vacuna empleada, contribuyen a una adecuada respuesta inmunogénica. La respuesta inmune integral esperada está dada por la producción de inmunoglobulinas IgM, IgG e IgA específicas (respuesta humoral), así como por la producción de citoquinas conocidas como Th1 (IL-2, interferón gamma y factor de necrosis tumoral alfa) a esta respuesta se le conoce como celular. Al presentar tanto una respuesta inmune celular como humoral, se infiere una respuesta inmune protectora contra el microorganismo contra el cual se está protegiendo.

FORMAS PARA MEDIR LA INMUNIDAD HUMORAL Y CELULAR *IN VIVO*

La respuesta de hipersensibilidad inmediata tipo I valora reacción alérgica y respuesta humoral *in vivo* (de manera indirecta). Se encuentra mediada por IgE (inmunoglobulina E) específica contra el antígeno en cuestión unida a los mastocitos; consiste en aplicar una fracción pequeña en la superficie de la piel mediante intradermorreacción y valorar si es positiva al presentar roncha y eritema en el sitio de la aplicación. Se valora a los 5, 10 y 15 minutos después de su aplicación (Dearman y cols., 2007)

Por otro lado, la forma de medir *in vivo* la respuesta inmune celular es a través de la prueba de hipersensibilidad retardada por intradermorreacción tipo Mantoux, en la cual se inyecta en la epidermis una pequeña porción del antígeno a estudiar. De manera secuencial el antígeno es fagocitado y trasladado al ganglio linfático más cercano para activar la vía celular dependiente de Th1 en la cual se liberan citocinas IL-2, IL-12 e IFN- γ . La respuesta esperada es la activación de linfocitos y macrófagos específicos para ese antígeno. Se considera una respuesta positiva si se presenta edema y eritema en el sitio de la aplicación entre las 48 y 72 horas posteriores a la exposición (Kobayashi y cols., 2001) (fig. 2).

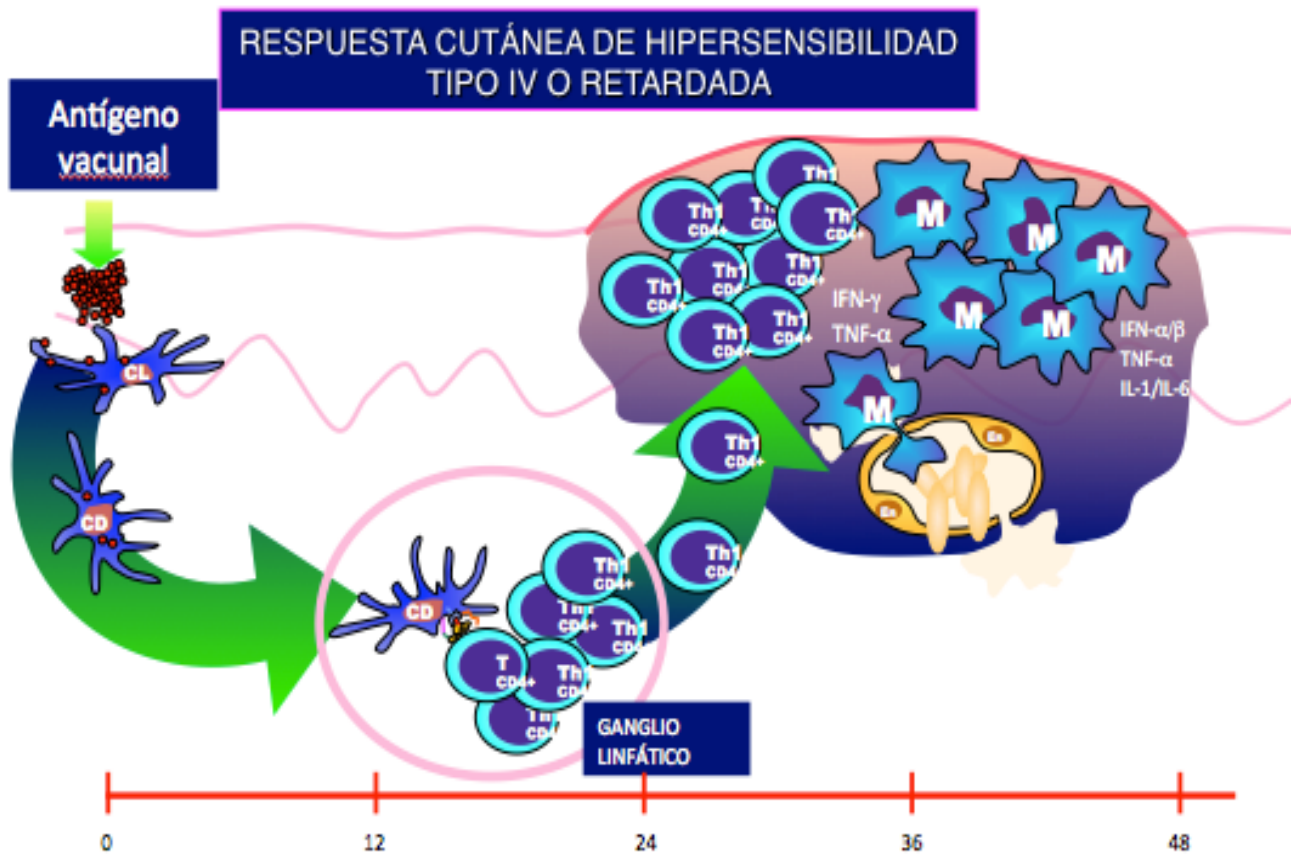


Figura 2. Prueba de hipersensibilidad tipo IV: Prueba de Hipersensibilidad tipo IV. Se aplica por vía intradérmica el antígeno para el cual se desea conocer una respuesta inmune. La célula dendrítica aledaña al sitio de la aplicación, procesará la información antigénica y la transportará al ganglio linfático más cercano. En el ganglio linfático, la célula dendrítica presenta la información a los linfocitos TCD4+. Si existe reconocimiento de la información, entonces a las 48 h se formará una roncha y edema en el sitio de la aplicación del antígeno. Esta prueba valora *in vivo* la integración de la respuesta inmune celular hacia un antígeno específico.

DOSIS ÓPTIMA DE VACUNAS

Para que una vacuna sea exitosa debe ser eficaz en inducir una respuesta inmune protectora en el sitio adecuado, de naturaleza relevante y de duración prolongada. También debe ser estable, segura y de bajo costo. Por lo tanto, para cumplir estas características, es indispensable conocer la dosis que induzca una respuesta inmune adaptativa (dosis óptima). La dosis debe activar al linfocito T a través del reconocimiento de la célula presentadora del antígeno. El vínculo entre la respuesta innata y la respuesta adaptativa, es la piedra angular para alcanzar el efecto deseado en la producción de diversas citosinas, así como anticuerpos de correcto isotipo, calidad y magnitud (Crane y Forrester, 2005). En conclusión, dosis pequeñas de una vacuna no inducen una respuesta inmune adecuada, mientras que dosis muy altas generan mayor gasto y probablemente un fallo en la respuesta inmune deseada.

EFICACIA DE ADYUVANTES EN EL EMPLEO DE VACUNAS

La palabra adyuvante proviene del latín *adjuvare* y significa “ayudar”, es precisamente ésta propiedad la que se busca al mezclar una sustancia con la vacuna a estudiar. Esto significa que se persigue incrementar la inmunogenicidad, o al menos ser un vehículo adecuado para que la vacuna estudiada llegue al sitio deseado. Históricamente se han empleado fracciones bacterianas como adyuvantes, por sí mismas estas fracciones ejercen un grado variable de inflamación y por lo tanto son responsables de destrucción tisular en el sitio de la aplicación (Bukreyev y Belyakov, 2002; Crane y Forrester, 2005).

Algunos adyuvantes simplemente tienen la función de transportar y proteger a la vacuna. En el caso de las vacunas orales para los animales, se persigue que además de servir como vehículo, sean agradables al paladar. Una característica importante es que sea parte de su dieta habitual para así facilitar su administración y disminuir costos. En el caso del cerdo se puede utilizar la pasta de soya, la pasta de canola y la maicena. La pasta de soya es una fuente de proteína, es un subproducto del procesamiento del frijol de soya. Se obtiene de la molienda de las hojuelas después de haber extraído el aceite por un método de extracción mecánica o por solvente. Cuenta con características adecuadas para ser un buen vehículo y probable adyuvante.

En relación a la canola, por su contenido de energía y por su perfil de aminoácidos es de menor valor nutritivo que la soya; sin embargo se utiliza como un alimento para cerdos y puede ser un adecuado vehículo para vacunas. En relación a la maicena es de interés saber si puede servir como vehículo ya que no parece tener propiedades adyuvantes.

REPERCUSIÓN E IMPACTO ECONÓMICO

Según datos de la Organización mundial de la salud (OMS), el comportamiento de la teniasis en nuestro país disminuyó de poco más de 14 mil casos en 1992, a 3362 en 1996 y aunque su distribución es nacional, se concentra principalmente en algunos estados tales como zonas rurales de Puebla. La cisticercosis se registra con frecuencias de morbimortalidad en humanos muy similares en los últimos años, con 586 casos en 1990 (261 muertes) y 601 en 1996 (293 muertes) (Organización mundial de la salud, 1998) Para el año 2005 se reportaron 393 casos de teniasis y 306 de cisticercosis. En 2011 se celebró una reunión conjunta de la OMS(Organización Mundial de la Salud), la FAO (Food and Agriculture Organization) y la OIE (Organización Internacional de sanidad Animal), sobre la planificación de la prevención y control de enfermedades zoonóticas desatendidas, centrada en la cisticercosis/teniasis como una de las enfermedades prioritarias de importancia mundial, y se estimó que se necesitarían US \$2 millones anuales para apoyar la ejecución de los proyectos piloto iniciales Entre las necesidades a medio y largo plazo figuran la validación de una estrategia para controlar y eliminar la cisticercosis/teniasis por *T. solium* antes de 2015 y luego utilizar la estrategia para ampliar las intervenciones a determinados países endémicos antes de 2020 (Nota descriptiva N°376 Febrero de 2013 OMS)

La importancia socioeconómica de la enfermedad radica en que el 75% de los pacientes con NC, se encuentran en edad productiva y frecuentemente después del inicio de los síntomas son incapaces de trabajar (Flisser, 1988).

Las pérdidas económicas de deben a la severidad de los cuadros de NC, el tiempo de evolución, los largos periodos de hospitalización y la incapacidad física y psíquica que ocasiona en los afectados. En 1986 Madrazo y colaboradores, calcularon que los costos

del cuidado médico incluyendo hospitalización, quimioterapia, neurocirugía y tomografía computarizada en estos pacientes representaron un gasto de 14.5 millones de dólares en nuestro país (Flisser, 1988). A este impacto económico causado se suman también las pérdidas económicas en la porcicultura rústica por el decomiso de carne de cerdo infectada (de Aluja Aline S, 2000).

ANTECEDENTES ESPECIFICOS.

MODELO MURINO DE CISTICERCOSIS

Para poder contar con un modelo de estudio apropiado y reproducible, se emplean ratones hembra BALB/cAnN, ya que esta cepa es susceptible a la infección por larvas de cisticerco de *T. crassiceps*. Intraperitonealmente se inoculan de 10 a 20 larvas con cepas obtenidas mediante la técnica ORF (Open Reading Frame) y se mantienen con el paso seriado entre ratones durante los últimos 25 años en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Autónoma de México. Los parásitos para su infección son cosechados en la cavidad peritoneal de los ratones de uno a tres meses después de la inoculación. Estos ratones sirven como reservorio y origen para infectar al resto de los ratones en los cuales se experimenta (Sciutto y cols., 1995; Fragoso y cols., 1998).

VACUNA S3Pvac (vacuna sintética de tres péptidos).

La vacuna S3Pvac se encuentra conformada por tres antígenos recombinantes (KETc7, KETc1 y KETc12); estos antígenos se identificaron indirectamente, a través de anticuerpos protectores producidos por el ratón o bien el cerdo infectado por cisticercosis. Posteriormente, los genes productores de las secuencias antigénicas, fueron identificadas en el código genético de *T. crassiceps* y expresadas a través de ADNc (ADN complementario). Los anticuerpos protectores contra *T. crassiceps*, también fueron encontrados en los cerdos infectados por *T. solium*, estos anticuerpos muestran respuesta inmune cruzada entre ambas especies de Tenia (Manoutcharian y cols., 2004). El análisis de la secuencia estructural de KETc7 permitió identificar 3 epitopos (porción más antigénica de un antígeno) con importante potencial antigénico “GK1, GK2 y GK3”, dando pie a realizar diversos experimentos con la intención de valorar su

inmunogenicidad aplicados por vía subcutánea en el modelo murino y solamente GK1 indujo una respuesta protectora significativa (Toledo y cols., 1999a).

La capacidad protectora demostrada de los tres péptidos llevó al desarrollo de S3Pvac, una vacuna contra cisticercosis que se produce en forma sintética (Huerta y cols., 2000), la forma recombinante se expresada en el fago filamentoso M13 (S3Pvac-Fago) (Morales y cols., 2008), y una reciente versión oral, expresada en clonas transgénicas de papaya (Hernandez y cols., 2007) a la cual se conoce como S3Pvac papaya.

RESPUESTA CRUZADA ENTRE LOS ANTÍGENOS DE *T. crassiceps* y *T. solium*

Se eligió la cepa de *T. crassiceps* por la semejanza antigénica con *T. solium* y la respuesta inmune cruzada observada entre ambas cepas (Kunz y cols., 1989) además la cepa obtenida mediante ORF (Open Reading Frame) de *T. crassiceps* presenta un rápido crecimiento cuando es implantada intraperitonealmente en los ratones hembra BALB/cAnN, también presenta desde el punto de vista inmunológico una vulnerabilidad específica de su hospedero. La eficacia de cada protocolo de vacunación se mide por dos respuestas variables, es decir, por la proporción de ratones que presentan cero parásitos después del reto (siembra de 10 larvas de cisticerco intraperitoneal) y por la reducción de la carga parasitaria encontrada en los ratones vacunados cuando se comparan con los controles (ratones no vacunados); (Sciutto y cols., 1990; Valdez y cols., 1994; Manoutcharian y cols., 1996; Toledo y cols., 1999b; Toledo y cols., 2001; Hernandez y cols., 2007; Fragoso y cols., 2011). (Tabla 1).

Tabla 1. Comparación de la eficacia de diversas vacunas

Vacuna empleada	%Ef1	%Ef2	Número de ratones	Referencia
<i>T. solium</i> (Tsags)	13-100%	0-100%	280	Sciutto et al 1990
<i>T. crassiceps</i> (Tcags)	1.4-100%	0-100%	280	Sciutto et al 1990
Antígenos nativos purificados	-49-86.5%	0-70%	362	Valdez et al 1994
S3Pvac recombinante [Ⓒ]	30-84%	0-9%	52	Manoutcharian et al 1996
GK-1	11-95%	0-70%	49	Toledo et al 1999
KETc1	66-100%	15-55%	46	Toledo et al 2001
KETc12	53-88%	0-33%	45	Toledo et al 2001
BLS-GK-1/GK-1	92-96%	43%	21	Fragoso et al 2011
S3Pvac fago	27-95%	12-70%	56	Toledo 2004
S3Pvac papaya	0-98%	11-90%	253	Hernandez et al 2007

%Ef1: porcentaje de reducción en la carga parasitaria

%Ef2: porcentaje del total de los ratones protegidos

[Ⓒ] Experimentos con inmunización oral

VACUNA S3Pvac (aplicación subcutánea)

En relación a la aplicación subcutánea de la vacuna S3Pvac en cerdos (compuesta por los péptidos sintéticos KETc1, KETc12 y GK1) se han llevado a cabo varios estudios experimentales de tal manera que se ha comprobado que reduce en un 50% el número de cerdos infectados y en un 95% la carga total en el número de cisticercos. También se ha observado que puede tener un efecto cestícida sobre el metacestodo ya que se encuentra hasta 10 veces más daño en los cisticercos del grupo vacunado (de Aluja y cols., 2005).

La vacuna S3Pvac desde el punto de vista estadístico induce niveles significativos de protección contra cisticerco sobre todo al administrarse por vía subcutánea; sin embargo, los costos son elevados debido a la logística de su administración. Por lo tanto, basados en los bajos costos de producción se pretende mejorar su administración por vía oral a través del extracto soluble de S3Pvac papaya (Sciutto y cols., 2013).

S3Pvac Fago

Los péptidos de S3Pvac también se expresan de manera recombinante en fagos filamentosos, éste sistema de liberación se eligió por las siguientes razones: 1) las secuencias extrañas pueden ser codificadas en secuencias de ADN de múltiples copias de la proteína de unión mayor o menor del fago filamentosos M13 creando una fusión con el fago. 2) el fago recombinante puede ser expresado en múltiples copias y los péptidos de la vacuna pueden mantener su conformación original 3) el fago M13 funciona como un acarreador de epítopes más robusto y con una respuesta inmune más prolongada que los péptidos libres sin el uso de adyuvantes 4) los fagos fusionados pueden ser recuperados en grandes cantidades del sobrenadante de los cultivos in vitro de E. coli del bacteriófago infectado (Manoutcharian y cols., 2004).

Extracto soluble de S3Pvac papaya

Las plantas transgénica son sistemas ideales para producir vacunas orales ya que la envoltura celular de la planta, puede proteger a las proteínas antigénicas de la

desintegración en el estómago y así permitir una presentación efectiva al tejido linfoide asociado a las mucosas (Walmsley y Arntzen, 2003).

El problema logístico y los altos costos de la forma subcutánea de la vacuna dieron pauta a considerar una forma de administración oral que pudiera ser administrada por los dueños de los cerdos. La decisión de incluir los péptido en cayos de papaya, tomó en cuenta que la pared de las plantas son un buen vehículo de protección contra las enzimas digestivas, además de que llegan al sistema linfoide asociado a la mucosa intestinal (Mason y cols., 2002). Por otro lado, las plantas también presentan la ventaja de bajos costos de producción del antígeno, eliminación de pasos en la purificación y costosas tecnologías de encapsulación. Particularmente la expresión de proteínas en papaya ofrece el gran potencial de producción de moléculas para propósitos de vacunación y terapéuticas. El cayo de la papaya transformado genéticamente puede ser regenerado y subcultivado *in vitro* para ser utilizado en producción masiva de vacunas a bajo costo. Además la papaya cuenta con propiedades antiparasitarias, es fácilmente manejable genéticamente y posee gran número de copias transgénicas insertadas en su genoma (Cabrera-Ponce y J.A.Vegas, 1995)

Los péptidos de S3Pvac papaya se expresan de manera exitosa en clonas embriogénicas de papaya transgénica. La integración de transgenes y su expresión fue confirmada por PCR (reacción en cadena de la polimerasa), rt-PCR (reacción en cadena de polimerasa por transcriptasa reversa) y rt-PCR en tiempo real (Hernandez y cols., 2007) La aplicación en ratones de 19 diferentes clonas de papaya transgénica embriogénica, indujo una protección efectiva (40-90%). También la aplicación del cayo de papaya pKETc723 al aplicarlo por vía subcutánea y compararlo con la vía oral, mostró altos niveles de protección de manera similar en ambas formas de administración (Hernandez y cols., 2007). Por otro lado, el cayo de la papaya no transformado también disminuye la carga parasitaria esperada, pero sólo cuando se aplica por vía subcutánea (Hernández M.J.L., 2010; Hernández M.J.L., 2010). Cabe destacar que se han utilizado diversas concentraciones de la vacuna S3Pvac papaya; sin embargo, ninguno de los estudios previos fue diseñado para conocer la dosis óptima protectora de la misma.

ESTUDIOS EXPERIMENTALES DE LA VACUNA S3Pvac

En el modelo experimental murino de cisticercosis con *T. crassiceps* intraperitoneal se han utilizado diversas concentraciones de la vacuna por vía subcutánea (Sciutto y cols., 1995; Huerta y cols., 2000). El uso de adyuvante de aluminio a dosis altas (3 mg/kg) produjo tolerancia inmunológica; dosis más bajas (0.4mg/kg) con adyuvante completo de Freund (ACF), redujeron la cantidad de parásitos hasta un 58% y dosis mucho más pequeñas (0.1 mg/kg) con ACF, no redujeron el tamaño de la carga parasitaria. Un experimento adicional confirmó la capacidad protectora de los antígenos de *T. crassiceps* a una dosis de 0.4 mg/kg con ACF para reducir el número total de parásitos hasta en un 48.5% en cerdos vacunados ($p < 0.05$) (Manoutcharian y cols., 2004). Por otro lado, se ha utilizado también saponina como adyuvante en una dosis a 0.4 mg/kg (Huerta y cols., 2000); en este estudio se incluyeron cerdos desnutridos y una importante variabilidad genética (no contemplados en los estudios experimentales); debido a esto no se observó la misma intensidad de respuesta que en experimentos previos (Sciutto y cols., 1995; Manoutcharian y cols., 2004; Plancarte y cols., 1999; Flisser y cols., 2004)

IDENTIFICACION DE LA CAPACIDAD PROTECTORA DE ETgpC (Líneas celulares de papaya transgénica y embriogénica) Extracto soluble de S3Pvac- Papaya

La clona ETgpC llamada pKETc723 se ha empleado extensamente para identificar las mejores condiciones de vacunación. Se ha aplicado tanto por vía oral como por vía subcutánea encontrando resultados similares de protección en ambas. De manera paradójica, no se encontró diferencia significativa de la protección inducida a dosis de 200 ó 1000 μ g (Hernandez y cols., 2007) lo que da pauta a pensar que dosis más pequeñas pueden inducir una respuesta inmune óptima (Tabla 2).

Tabla 2. Porcentaje de cisticercos dañados en cerdos vacunados con diversas vacunas experimentales

Referencia	Vacuna	Ef1	Ef2	Controles	Vacunados	Índice de daño	P
Sciutto et al., 1995	Tcags	58%	0-28%	0.4% (18/4173)ç	11.3%(221/1995)	28.3	<0.0001
Huerta et al., 2000	Tcags 40 días	0%	0%	13.5%(24/177)^^	38.2%(65/170)	2.8	<0.0001
	70 días	0%	0%	39.2%(65/166)^^	70.5%(127/180)	1.8	<0.0001
Huerta et al 2001	S3Pvac	98%	53%	3.9%(2,614/565)ç	41.3%(563/1,364)	10.6	<0.0001
Manoutcharian et al 2004	S3Pvac-fago SC	95%	33%	13.7%(219/1,595)^^	48.9%(23/47)	3.6	<0.0001
	S3Pvac fago oral	42%	0%	13.7%(219/1,595)^^	83.5%(466/558)	6.1	<0.0001
Morales et. al. 2008	S3Pvac fago	87%	54-62%	3%(33/1,120)^^	13%(21/160)	4.3	<0.0001

Tcags= Antígenos totales de *Taenia crassiceps*

Ef1= Eficacia de la vacuna expresada en disminución de la carga parasitaria

Ef2= Eficacia de la vacuna expresada en reducción de cerdos con cisticercos.

ç= porcentaje macroscópico de cisticercos dañados (número de dañados/número total de cisticercos) x 100

^^= porcentaje microscópico de cisticercos dañados (número de dañados/número total de cisticercos) x 100

RESPUESTA INMUNOLOGICA A LA VACUNA S3Pvac

La reacción inmunológica específica ha sido demostrada a través de la cuantificación de altos niveles séricos de anticuerpos péptido específicos en los cerdos vacunados (Díaz y cols., 2003) así como importante respuesta proliferativa antígeno específica de células periféricas mononucleares con incremento en la expresión de IL-2 e IFN- γ (Díaz-Orea y cols., 2013) Más aún, los anticuerpos anti-GK-1 inhiben la transformación de *T. solium* en gusanos en el modelo experimental de taeniasis en hamsters (Díaz y cols., 2003).

Hallazgos preliminares con la vacuna S3Pvac papaya indican inmunidad específica relacionada con la protección, es decir, elevadas concentraciones de anticuerpos IgG específicos contra cisticercos detectados en ratones vacunados por vía subcutánea (Hernández y cols., 2007). Además, en ratones vacunados se encuentra incrementada la respuesta proliferativa de CD4+ y CD8+ en esplenocitos y solamente de linfocitos CD8+ en las placas de Peyer; sin embargo, no se sabe la dosis óptima protectora de la vacuna y por lo tanto tampoco su respuesta inmune esperada (Hernández y cols., 2007).

JUSTIFICACIÓN

La cisticercosis continúa representando un importante problema de salud pública, por lo cual al romper la cadena de transmisión con prevención de la infección en el cerdo a través de una vacuna, parece ser una estrategia prometedora. El empleo de la vacuna S3Pvac ha mostrado buena respuesta inmune protectora al administrarse tanto por vía subcutánea como por vía oral en ratones hembra BALB/cAnN y en cerdos. La vacuna S3Pvac papaya también muestra una adecuada respuesta inmune protectora; sin embargo, no existe diferencia al aplicarla en dosis altas, por lo cual dosis pequeñas pueden inducir una respuesta inmune de manera integral. Por otro lado, es posible producir la vacuna masivamente a bajo costo, por lo cual es necesario experimentar diversos adyuvantes orales mezclados que faciliten su administración al cerdo el cual es el ente biológico objetivo.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Diversas vacunas se han utilizado con la finalidad de reducir la prevalencia de cisticercosis porcina y así romper la cadena de transmisión hacia el ser humano. Existen números ensayos experimentales que demuestran la eficacia de la vacuna S3Pvac administrada por vía subcutánea tanto en modelo murino como en cerdos. La presentación recombinante con cayo de papaya (S3Pvac papaya) muestra una posibilidad de tratamiento oral probada en estudios experimentales previos. La eficacia a la vacuna por vía oral muestra una amplia variabilidad probablemente porque en los diversos estudios no se han realizado en condiciones homogéneas, principalmente porque no se conocen las dosis óptimas de la misma ni la respuesta inmune relacionada a la dosis adecuada. Por otro lado, para facilitar la ingestión y hacer más palatable la vacuna para el cerdo, es necesario investigar mezclas con otros adyuvantes orales. Por lo cual se originan las siguientes preguntas de investigación:

¿Cuál es la dosis óptima del extracto soluble de S3Pvac papaya administrado por vía oral, así como el adyuvante más eficaz, para inducir una respuesta inmune protectora en ratones BALB/cAnN?

HIPÓTESIS

HIPOTESIS PRINCIPAL

La vacuna S3Pvac papaya administrada por vía oral a dosis óptima induce respuesta inmune protectora humoral y celular en los ratones hembra BALB/cAnN.

HIPOTESIS SECUNDARIAS

Dosis bajas de la vacuna S3Pvac papaya administrada por vía oral, inducen una respuesta inmune protectora óptima en ratones hembra BALB/cAnN.

Existe diferencia en la respuesta inmune inducida con diversos adyuvantes orales mezclados con la vacuna S3Pvac papaya administrada por vía oral, en ratones hembra BALB/cAnN

OBJETIVOS

OBJETIVOS GENERALES

Medir la respuesta inmune inducida a la dosis óptima protectora contra cisticercosis del extracto soluble S3Pvac papaya administrada por vía oral en ratones BALB/cAnN.

Comparar la eficacia de diversos adyuvantes mezclados con la vacuna S3Pvac papaya administrada por vía oral en ratones BALB/cAnN.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Objetivo específico 1: Determinar la dosis óptima protectora contra cisticercosis de la vacuna S3Pvac papaya administrada por vía oral en ratones BALB/cAnN.

Objetivo específico 2: Medir la respuesta inmune celular, mediante la medición de IL-2, IFN- γ , en ratones BALB/cAnN vacunados por vía oral con la dosis óptima de S3Pvac Papaya.

Objetivo específico 3: Cuantificar la respuesta de hipersensibilidad inmediata y retardada in vivo en ratones BALB/cAnN vacunados por vía oral con la dosis óptima de S3Pvac Papaya

Objetivo específico 4: Comparar el efecto de diversos vehículos mezclados con S3Pvac Papaya a dosis óptima sobre la eficacia protectora contra cisticercos en ratones BALB/cAnN.

INFRAESTRUCTURA FÍSICA Y HUMANA

HUMANOS:

Tesista y supervisores del proyecto, integrantes del laboratorio de medicina experimental de la BUAP e integrantes del instituto de Biomedicina de la UNAM

Se recibió apoyo y orientación para la infección en los ratones por parte del médico veterinario Rubén Ramírez Aquino.

Se recibió apoyo para el manejo de los ratones por el médico veterinario del vivario en la facultad de medicina y de médicos veterinarios del bioterio Claude Bernard de la BUAP.

MATERIALES:

Se realizó en el laboratorio de medicina experimental de la BUAP, en el vivario de la facultad de medicina, en el bioterio de la BUAP y en el departamento de inmunología de Biomedicina de la UNAM.

FINANCIEROS:

Fondo de la red de cisticercosis, fondos de la Facultad de Medicina de la BUAP y el becario apoyado por sistema CONACYT.

ASPECTOS ÉTICOS:

El manejo, mantenimiento y sacrificio de los animales se realizó en apego a la NOM-062-ZOO-1999 sobre especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio de acuerdo con los lineamientos establecidos por el comité sobre cuidado y uso de animales de experimentación de la facultad de medicina, veterinaria y zootecnia de la UNAM.

MATERIAL Y MÉTODOS

DISEÑO DEL ESTUDIO

Por el objetivo del estudio: Comparativo

Por asignación de la maniobra: Experimental

Por la temporalidad del estudio: Longitudinal

Por la captura de la información: Prolectivo

Por la conformación de grupos: Homodémico

CRITERIOS DE INCLUSIÓN:

Ratones hembra de la cepa BALB/cAnN de seis a diez semanas de edad previamente caracterizados como susceptibles a cisticercosis

Tabla 3. Variables operacionales de medición

Variable	Escala	Forma de medición	Valor
DOSIS ÓPTIMA PROTECTORA: dosis mediante la cual se encuentran menor número de cisticercos intraperitoneales	Cualitativa Ordinal	Dosis A Dosis B Dosis C	Dosis A: 0.1 µg Dosis B: 1 µg Dosis C: 10 µg
CITOCINAS: IL-2 e IFN-γ	Dimensional Continua	ELISA	DO
PRUEBA CUTÁNEA PARA HIPERSENSIBILIDAD TIPO I	Nominal Dicotómica	Edema en el sitio de aplicación del antígeno a los 5, 10 y 15 minutos, medida en milímetros con Vernier	Positiva o negativa de acuerdo a la diferencia con el control negativo
PRUEBA DE INTRADERMORREACCIÓN PARA HIPERSENSIBILIDAD TIPO IV	Nominal Dicotómica	Edema en el sitio de aplicación del antígeno a las 48 y 72 horas medida en milímetros con Vernier	Positiva o negativa de acuerdo a la diferencia con el control negativo
Eficacia de adyuvantes orales	Nominal Politómica	Maicena Pasta de canola Pasta de soya	Menor número de parásitos recuperados

METODOLOGÍA GENERAL (PARA TODOS LOS OBJETIVOS)

El experimento se llevó a cabo en el laboratorio multidisciplinario II, en el laboratorio de medicina experimental de la Facultad de Medicina de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla y en el laboratorio de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.

Ratones BALB/cAnN

Se emplearon para este experimento, ratones hembra de la cepa BALB/cAnN de seis a diez semanas de edad previamente caracterizados como susceptibles a cisticercosis (Fragoso y cols., 2011). La distribución de los ratones en los diferentes grupos se realizó a través de aleatorización simple. Los ratones se obtuvieron y mantuvieron en condiciones ideales, en el bioterio de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP) “Claude Bernard”. El apoyo financiero para la manutención de los ratones, se obtuvo a través de la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado de la BUAP.

Previo a la investigación los ratones fueron adaptados al medio ambiente del bioterio, las diferentes dosis de vacuna se administraron por vía oral a través de cánula orofaríngea al día uno y un refuerzo diez días después, todos los ratones fueron pesados previamente para calcular el volumen total administrado. También los ratones fueron desafiados con la aplicación intraperitoneal de 20 larvas de *T. crassiceps* mediante jeringa de insulina con aguja gris. Por otro lado a un grupo de ratones se les obtuvo sangre retrocular, para lo cual se sedaron previamente con xilosina/ketamina 0.1 ml/kg. Todos los ratones fueron sacrificados por disección cervical.

Todos los ratones fueron etiquetados mediante una muesca en la oreja de acuerdo al método AALAS (Animal Care and Use in Research and Education - www.aalaslearninglibrary.org).(fig. 3).

Sol. Salina	Papaya 0.1µg	Papaya 1µg	Papaya 10µg	S3Pvac – Papaya 0.1µg	S3Pvac- Papaya 1µg	S3Pvac – Papaya 10µg
A11	A21	A31	A41	A51	A61	A71
A12	A22	A32	A42	A52	A62	A72
A13	A23	A33	A43	A53	A63	A73
A14	A24	A34	A44	A54	A64	A74
A15	A25	A35	A45	A55	A65	A75
A16	A26	A36	A46	A56	A66	A76

Figura 3. Ejemplo de método AALAS..

VACUNA oral “extracto soluble de S3Pvac PAPAYA”

Los péptidos de la vacuna contra cisticercosis utilizados en este estudio fueron proporcionados por el laboratorio de inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.

PREPARACION DE EXTRACTO TOTAL SOLUBLE DE CALLOS EMBRIOGÉNICOS DE S3Pvac PAPAYA

Se pulverizaron aproximadamente 800 mg de callos embriogénicos no transgénicos y de cada clona transgénica bajo análisis en un mortero congelado con nitrógeno líquido.

Por separado en un vaso de precipitado se colocó 2.0 mL de PBS pH=7.4, 1mM de EDTA, 50 mM de ascorbato de sodio, 0.2% Tritón X-100 y 10 μ L/mL del inhibidor de proteasas (SigmaSt. Louis, MO) se mantuvo el vaso en hielo y se agregó el pulverizado. Las muestras se centrifugaron a 10,000 rpm durante 30 min a 4° C; se colectó el sobrenadante y se determinará la concentración de proteínas por el método de Lowry.

METODOLOGIA PARA CADA UNO DE LOS PROCEDIMIENTOS.

PARÁSITOS E INFECCIÓN EXPERIMENTAL.

Cada uno de los ratones de los grupos experimentales y controles fueron infectados con 20 cisticercos no gemantes de 2 mm de diámetro de *T. crassiceps* de la cepa ORF aislada por Freeman y cultivados en la cavidad peritoneal de ratones hembras BALB/cAnN. Los cisticercos fueron inicialmente proporcionados por B. Enders (Beringwerke, Marburg, Alemania) y han sido mantenidos por pases intraperitoneales sucesivos en ratones hembra BALB/cAnN desde 1986 en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.

Los parásitos fueron cosechados de la cavidad peritoneal de hembras infectadas con una parasitosis de 1 a 3 meses después de haberse inoculado con 20 cisticercos (2 mm de diámetro) por ratón como se ha descrito previamente (Sciutto y cols., 1991), Los ratones que contienen el stock de parásitos fueron proporcionados por el bioterio del IIB

de la UNAM y se mantendrán en el bioterio de la Facultad de Medicina de la BUAP.(fig. 4)

ADMINISTRACION DE LA VACUNA S3Pvac PAPAYA:

Se empleó cánula orogástrica acoplada a una jeringa de insulina con la sustancia a administrar, para lo cual la cantidad de volumen a administrado se calculó con la formula $VOLUMEN\ A\ ADMINISTRAR = 0.01\ ml \times peso\ en\ gramos + 65\ \mu l$ de espacio muerto en la cánula.El diámetro de este tipo de sonda permite entrada al esófago sin afectar la vía respiratoria. La técnica se realiza de la siguiente manera:

Se sujeta al animal según esta vía de administración impidiendo la movilidad de la cabeza y las patas

Se inclina ligeramente la cabeza del animal hacia atrás y se apoya la sonda sobre el paladar en un ángulo de 45 grados si la sonda es curva o de 70 grados si es recta.

Deslice suavemente la sonda hasta llegar dentro del esófago donde se dosifica lenta y firmemente la sustancia.

Retirar firme y suavemente la sonda y liberar de la sujeción al animal (fig. 5).



Figura 4. Obtención de larvas de cisticerco a partir de raton infectado

INFECCIÓN DE RATONES (desafío experimental)

El desafío de los ratones se realizó 15 días después de la segunda inmunización oral. Los metacéstodos utilizados para la infección se cultivaron en la cavidad peritoneal de ratones hembras BALB/cAnN portadoras de la cepa ORF de *T.crassiceps* con una parasitosis de 2 meses y medio.

Se seleccionaron veinte pequeñas larvas (2 mm de diámetro), se suspendieron en solución salina isotónica, y se inyectaron intraperitonealmente en cada ratón utilizando una jeringa para insulina con aguja calibre 27. Se toma como referencia el cuerpo del animal, se recomienda que la administración se realice en el cuadrante inferior derecho de la zona abdominal ya que es poco probable que se puncionen los órganos de la cavidad. La técnica se realiza de la siguiente manera:

1.- Sujete al animal de acuerdo a la vía de administración.

2.- Divida visualmente al abdomen en cuatro cuadrantes, ubique el cuadrante inferior derecho y limpie la zona con una torunda impregnada de alcohol. Se debe inclinar el cuerpo del animal con la cabeza hacia abajo.

3.- Coloque la aguja en un ángulo de 45 grados con respecto al eje corporal del animal e introduzca un tercio o la mitad de la aguja en la zona de aplicación (dependiendo del calibre y largo de la aguja).

Nota: No debe haber ningún tipo de resistencia en el paso de la aguja, de ser así se retira e intenta en una zona aledaña.

4.-Jale el émbolo de la jeringa para asegurar que se encuentra en la zona correcta. Si se observa un líquido amarillento en la jeringa, es probable que se encuentre en la vejiga, si el líquido es café verdoso, probablemente se encuentre en el intestino; en ambos casos se debe retirar la jeringa y repetir la operación en una zona aledaña.

5.-Presione suave y firmemente el émbolo para vaciar el contenido.

6.-Retire la jeringa y limpie la zona de punción con una torunda con alcohol y libere al animal.

SACRIFICIO Y CONTEO DE CISTICERCOS

El procedimiento se realizó por el investigador y cegado al retirar previamente las etiquetas de las cajas con ayuda de un observador quien fue el único conocedor del grupo de estudio, antes de iniciar el sacrificio y conteo de parásitos intraperitoneal.

Los ratones se sacrificaron mediante dislocación cervical 30 días después de la infección. Se utilizó alcohol etílico para humedecer el abdomen y lograr que el pelo del animal se una perfectamente a la piel y así evitar contaminación. Se realizó un corte longitudinal sobre la porción abdominal disecando la piel y teniendo cuidado de no perforar el peritoneo, una vez retirada la piel del abdomen se procederá a cortar el peritoneo y se realizarán 3 lavados de los órganos de la cavidad con 10 ml. de solución salina a 37 grados centígrados depositando los parásitos en una caja petri de 10 cm de diámetro y se realizarán lavados de los parásitos hasta lograr una solución transparente. Se almacenaron en un tubo falcon de 50 ml.

Se cuantifico el número larvas y quistes encontrados dentro de la cavidad peritoneal tomando en cuenta que en ésta forma de infección, los parásitos no migran hacia otras localizaciones en el huésped (Toledo y cols., 1999a).

Se realizó el conteo macroscópico de cada una de las cajas petri que previamente se marcaron con el número de ratón correspondiente. Finalmente se conocerá el grupo al cual pertenecen. (fig. 5)



Figura 5. Procedimientos realizados en los ratones.

OBTENCION DE ANTIGENOS TOTALES DE Taenia crassiceps

Se obtuvo los cisticercos de *T. crassiceps* de la cepa ORF mediante infección experimental por inoculación en la cavidad peritoneal de ratones hembras BALB/cAnN. Los parásitos se colocaron en un tubo falcon de 50 ml con solución salina al 0.9% y se realizaron 3 lavados en una relación 1:3. Se utilizó un preparado de antibiótico-antimicótico con 100 unidades de penicilina, 100 µg de estreptomicina y 0.25 µg de anfotericina B/ml. Posteriormente los cisticercos se suspendieron en una mínima cantidad de agua destilada adicionada con 1 x del mismo antibiótico-antimicótico y del inhibidor de Mini Protease Inhibitor Cocktail (No cat: 11836153001, Roche) y se centrifugaron a 17,500 rpm durante 30 min a 4 °C.

Con este procedimiento se obtuvo entre 2 y 4 mg/ml de antígeno. Se conservaron en alícuotas de 50 µl a -70 °C hasta su uso que fue solo por una ocasión.

METODOLOGÍA PARA CADA OBJETIVO ESPECÍFICO

Objetivo específico 1

Determinar la dosis óptima protectora contra cisticercosis de la vacuna S3Pvac papaya administrada por vía oral en ratones BALB/cAnN.

Fundamento lógico: Se han utilizado diversas concentraciones de la vacuna S3Pvac papaya; sin embargo, ninguno de los estudios previos se ha diseñado para conocer la dosis óptima protectora de la misma.

Metodología: se formaron siete grupos cada uno con 6 ratones a los cuales se les inmunizo con diversas dosis de S3Pvac papaya o bien extracto soluble de papaya y un grupo control solo con solución salina, el propósito es conocer la dosis más óptima.

Grupo 1: Solución salina como grupo control

Grupo 2: Solución salina más extracto soluble de papaya a una concentración de 0.1 μg total

Grupo 3: Solución salina más extracto soluble de papaya a una concentración de 1 μg total

Grupo 4: Solución salina más extracto soluble de papaya a una concentración de 10 μg total

Grupo 5: Solución salina más extracto soluble de S3Pvac-papaya a una concentración de 0.1 μg total

Grupo 6: Solución salina más extracto soluble de S3Pvac-papaya a una concentración de 1 μg total

Grupo 7: Solución salina más extracto soluble de S3Pvac-papaya a una concentración de 10 μg total

Se administró dos inmunizaciones con 10 días de diferencia entre la primera y segunda. Se consideró el día 1, como el día de la primera inmunización.

Quince días después de la segunda inmunización, los ratones se desafiaron con la inoculación dentro de la cavidad peritoneal de 20 larvas de cisticerco de 2 mm de diámetro.

Al día 55 los ratones se sacrificaron por dislocación cervical y se cuantificó el número de cisticercos recuperados de la cavidad peritoneal. Se valoró la eficacia, definiéndola como la dosis en la cual se presente menor cantidad de parásitos recuperados (fig.6).

Para calcular el tamaño de la muestra de los ratones necesarios en el experimento de la dosis óptima, se tomó en cuenta la diferencia de medias en el número de cisticercos recuperados en el estudio previo. Se utilizó el programa Sample Power versión 3.

- Efecto del tamaño de la muestra 243
- Tamaño de la muestra de 42 ratones
- Potencia del 90%
- Significancia alfa de 0.05
- Siete grupos con 6 ratones cada uno

Para el resto de los experimentos el tamaño de la muestra se realizó a conveniencia tomando en cuenta reportes de estudios previos.

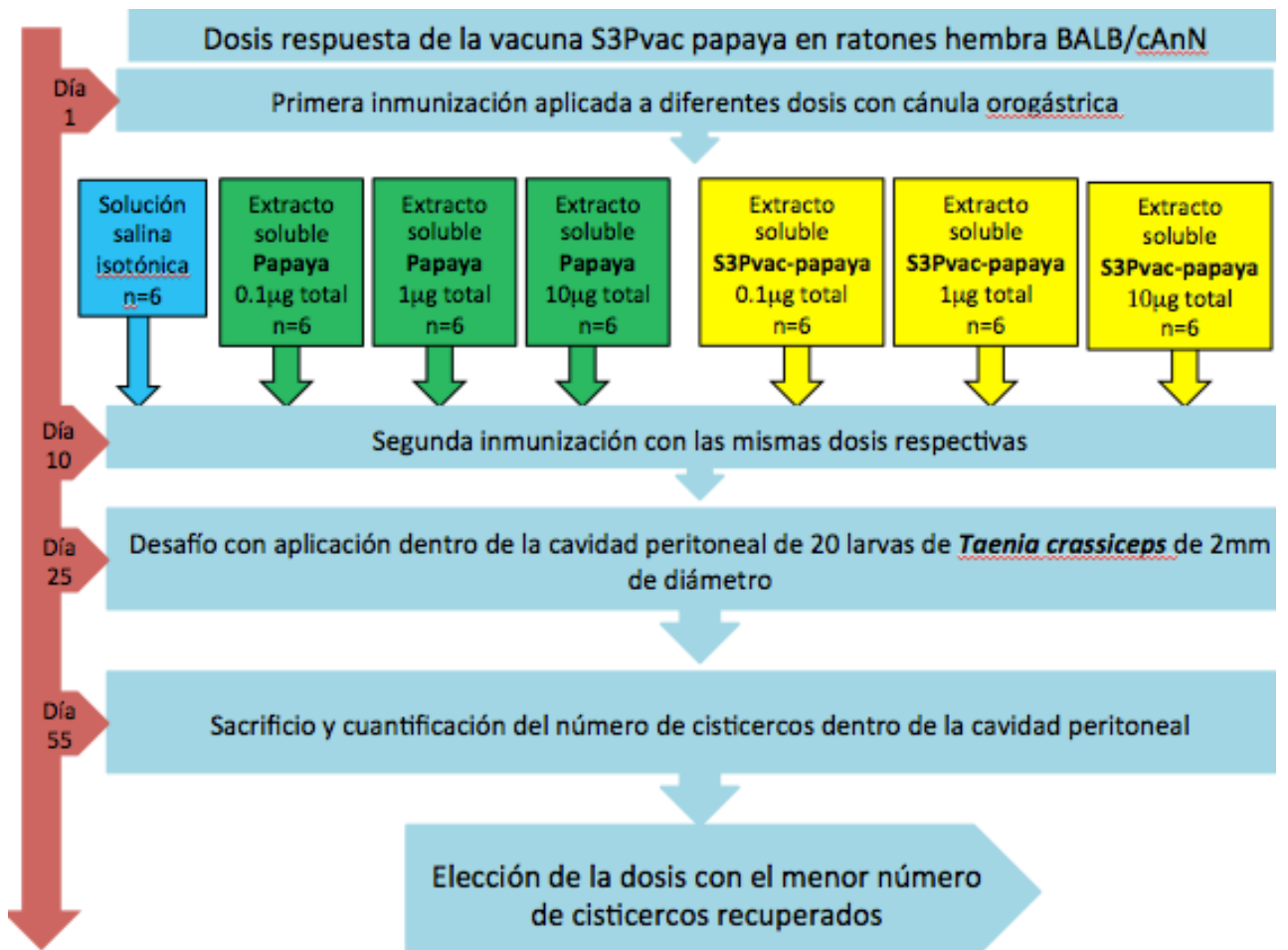


Figura 6. Diseño experimental para obtener la dosis óptima de S3Pvac-papaya.

Objetivo específico 2

Medir la respuesta inmune celular, mediante la medición de IL-2 e IFN- γ en el sobrenadante de esplenocitos de ratones BALB/cAnN inmunizados por vía oral con la dosis óptima de S3Pvac Papaya.

Fundamento lógico: La activación de la respuesta inmune celular después de la aplicación de vacuna confiere la más eficiente y duradera protección contra el microorganismo. La forma de evaluar ésta activación es a través de la cuantificación de las citocinas "Interleucina 2 (IL-2) e Interferón gamma (IFN- γ) las cuales sólo se detectan sí la respuesta inmune celular ha sido inducida. Por otro lado la proliferación de linfocitos y esplenocitos al ser cultivados en presencia de los antígenos de la vacuna permite conocer la especificidad e intensidad de la respuesta celular y en consecuencia la protección conferida por la vacuna. Los ratones empleados fueron etiquetados como RI-1 (ratones 16 a 20), RI-2 (ratones 26 a 30), RI-3 (ratones 36 a 40) y RI-4 (ratones 46 a 50).(fig.7).

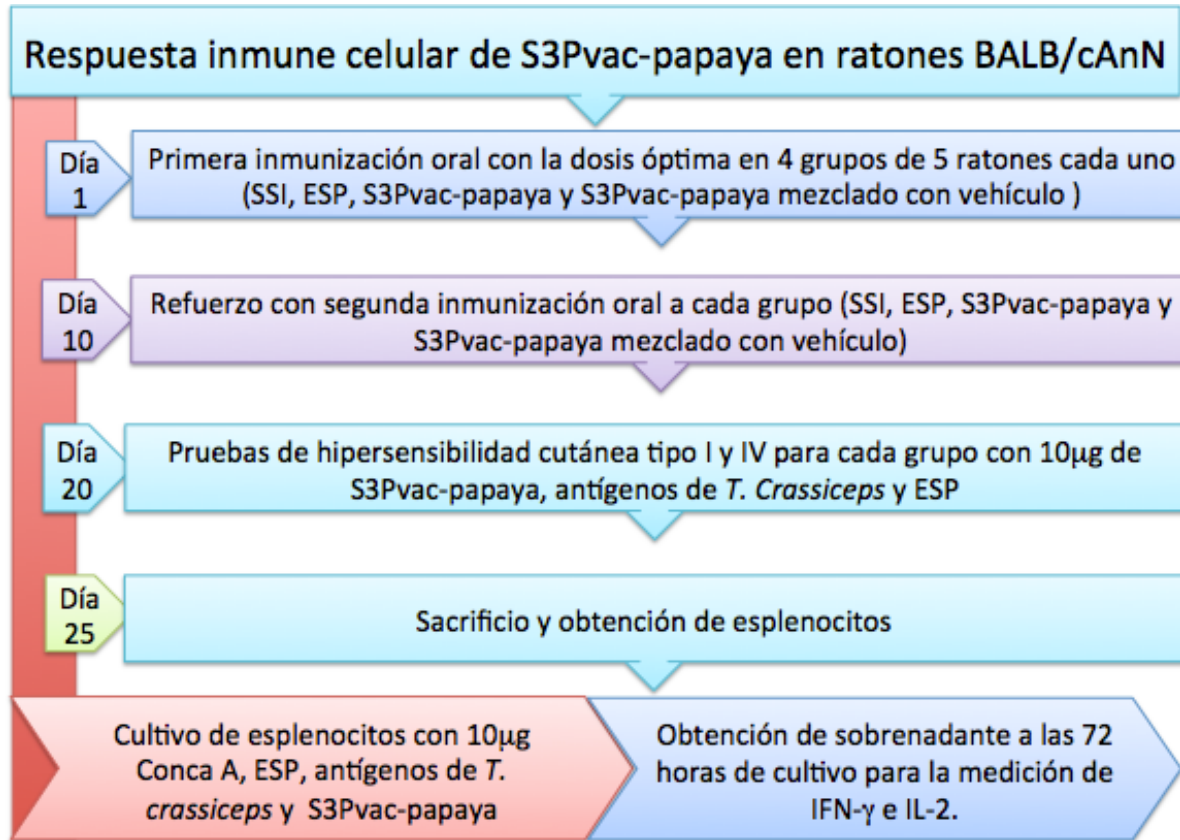


Figura 7. Diseño experimental para evaluar la respuesta inmune de S3Pvac papaya.

Metodología:

a) La obtención de esplenocitos se realizó del siguiente modo:

- 1.- Los ratones se sacrificaron mediante dislocación cervical dos semanas después de la segunda inmunización.
- 2.-Sacar bazo y colocarlo en 3mL RPMI suplementado (Cat. 22400 GIBCO)
- 3.-Perfundir o macerar con malla nylon 5 µm
- 4.-Centrifugar a 1500rpm, 7 minutos a 4 °C
- 5.-Tirar sobrenadante y resuspender pellet en 2-3 mL solución lisis eritrocitos
- 6.-Incubar 5 minutos en hielo, agitando constantemente
- 7.-Adicionar medio RPMI sin suplementar (3 veces el volumen de la solución lisis)
- 8.-Centrifugar a 1200 rpm durante 5 minutos

9.-Tirar sobrenadante y resuspender en 2 mL RPMI suplementado (Cat. 22400 GIBCO)

10.-Contar células en la cámara de cámara de Neubauer, haciendo una dilución con azul tripano dentro de la campana.

b) Medición de citocinas:

1.-Agregar 100 μ L del medio del cultivo que contiene el tratamiento para estimular la proliferación celular (extracto soluble de papaya, S3Pvac-papaya y antígenos totales de *T. crassiceps*). De esta manera, el volumen final es de 200 μ L/pozo. La concanavalina A (ConA) a una concentración final de 2.5 μ g/mL como control positivo.

2.- Colocar por pozo 2×10^5 células en placa de 96 pozos 100 μ L células+ 100 μ L Medio, ConA y los diversos antígenos.

3.-Incubar a 37°C con 5% de CO₂.

4.-La medición de IL-2 e IFN- γ se realizó del siguiente modo: se obtuvo 100 μ l del sobrenadante de cada pozo de los cultivos a las 72 horas mediante técnica de ELISA y por duplicado para cada uno de los casos de experimentación con kits comerciales para estas citocinas.

Objetivo específico 3

Cuantificar la respuesta de hipersensibilidad inmediata (inmunidad humoral y alergia) o hipersensibilidad tipo I y retardada (inmunidad celular) o Delayed Test Hypersensitivity (DTH) *in vivo*, también llamada hipersensibilidad tipo IV en ratones BALB/cAnN vacunados por vía oral con la dosis óptima de S3Pvac Papaya (fig.7)

Fundamento lógico: La respuesta inmune a vacuna puede ser valorada *in vivo* al aplicar concentraciones muy pequeñas de él antígeno vacunal mediante intradermoreacción en el abdomen, dorso, oreja o cojinete plantar del ratón. La respuesta de hipersensibilidad inmediata mide la posibilidad de una respuesta inmune humoral y principalmente la predisposición a reacción alérgica contra los compuestos de la vacuna, se da sólo si existe producción de anticuerpo IgE específico en contra de los antígenos vacúnales y que dos moléculas de IgE se encuentren unidas en la superficie del mastocito; se caracteriza por la presencia de roncha o edema que puede manifestarse a los 5, 10 o 15 minutos después de la inoculación dérmica. La respuesta de hipersensibilidad retardada nos permite valorar de manera específica e integral las vías de activación de la respuesta inmune celular ya que después de la inoculación dérmica, las células dendríticas fagocitan los antígenos vacúnales para procesarlos, transportarlos y presentarlos a los linfocitos TCD4+ que se encuentran en los ganglios linfáticos más cercanos, éstos últimos producirán citocinas IL-2 e IFN- γ para activar a linfocitos TCD8+ y polimorfonucleares; la respuesta final es la presencia de induración dérmica, generalmente 48 horas después de la inoculación.

Metodología: Las técnicas de hipersensibilidad inmediata y retardada (DTH) se realizarán de la siguiente manera.

PRUEBA DE HIPERSENSIBILIDAD INMEDIATA O TIPO I

1.- A los 25 días después de dos inmunizaciones previas con la vacuna oral S3Pvac papaya a dosis óptima.

2.- Se emplearon los mismos ratones distribuidos en el mismo diseño del objetivo específico 2, es decir RI-1 (ratones 16 a 20), RI-2 (ratones 26 a 30), RI-3 (ratones 36 a 40) y RI-4 (ratones 46 a 50), a los cuales se rasurara el pelo del abdomen.

3.- Se aplicaron 20 μ L por sustancia, es decir, antígenos de la vacuna S3Pvac papaya, extracto soluble de papaya, antígenos totales de *T. crassiceps* y solución salina. La concentración de la dilución es de 10 μ g para cada uno de los dos antígenos.

4.- Se aplicó en el abdomen del ratón con una distancia de 1cm el antígeno total de S3Pvac papaya y solución salina 0.9%

5.- Se midió el edema de la roncha con vernier electrónico (stainless hardened) para cada uno de las pruebas a los 5, 10 y 15 minutos.

6.- Se consideró como positivo aquel con un tamaño mayor al control negativo.

PRUEBA DE DTH (Delayed Test Hypersensitivity) O HIPERSENSIBILIDAD TIPO IV

1.-Se emplearon los mismos ratones, diseño y los mismos antígenos aplicados que en la prueba de hipersensibilidad tipo I.

2.- Se midió la respuesta a las 48 y 72 horas con vernier electrónico (stainless haerdened).

3.- Se consideró como positivo el edema que fuera mayor al control negativo.

Objetivo específico 4

Comparar la eficacia protectora contra cisticercos en ratones BALB/cAnN, de diversos vehículos mezclados con S3Pvac Papaya a dosis óptima.

Fundamento lógico: La maicena, pasta de soya y pasta de canola son comestibles habituales en la alimentación de algunos animales, queremos conocer sí existe diferencia en la eficacia protectora contra cisticercos al mezclarlos con el extracto soluble de S3Pvac papaya y ministrarlos por vía oral.

Metodología.

Grupos experimentales: formado por 6 ratones en cada grupo, se administró mediante cánula orogástrica diversos vehículos para la vacuna S3Pvac papaya a dosis óptima. Los grupos fueron asignados como VA (vehículo adyuvante).

VA-1b: S3Pvac papaya mezclada con solución salina

VA-2b: S3Pvac papaya mezclada con maicena al 0.125%

VA-3b: S3Pvac papaya mezclada con pasta de soya al 0.125%

VA-4b: S3Pvac papaya mezclada con pasta de canola al 0.125%

Grupos control: formado por cuatro grupos de 6 ratones cada uno y no inmunizados, a los que se les administrará solamente los vehículos al 0.125% y sin vacuna:

VA-1a: Sólo solución salina

VA-2a: Sólo maicena

VA-3a: Sólo pasta de soya

VA-4a: Sólo pasta de canola

Se Inmunizaron en dos ocasiones con 10 días de diferencia entre la primera y segunda. Considerando tiempo 1, el día de la primer inmunización.

Quince días después de la segunda inmunización, los ratones se desafiaron con la inoculación dentro de la cavidad peritoneal de 20 larvas de cisticerco de 2 mm de diámetro.

Treinta días después del desafío con cisticercos, los ratones se sacrificaron por dislocación cervical y se cuantificó el número de cisticercos recuperados de la cavidad peritoneal (fig.5). En la figura 9 se observa el resumen de los diseños experimentales.

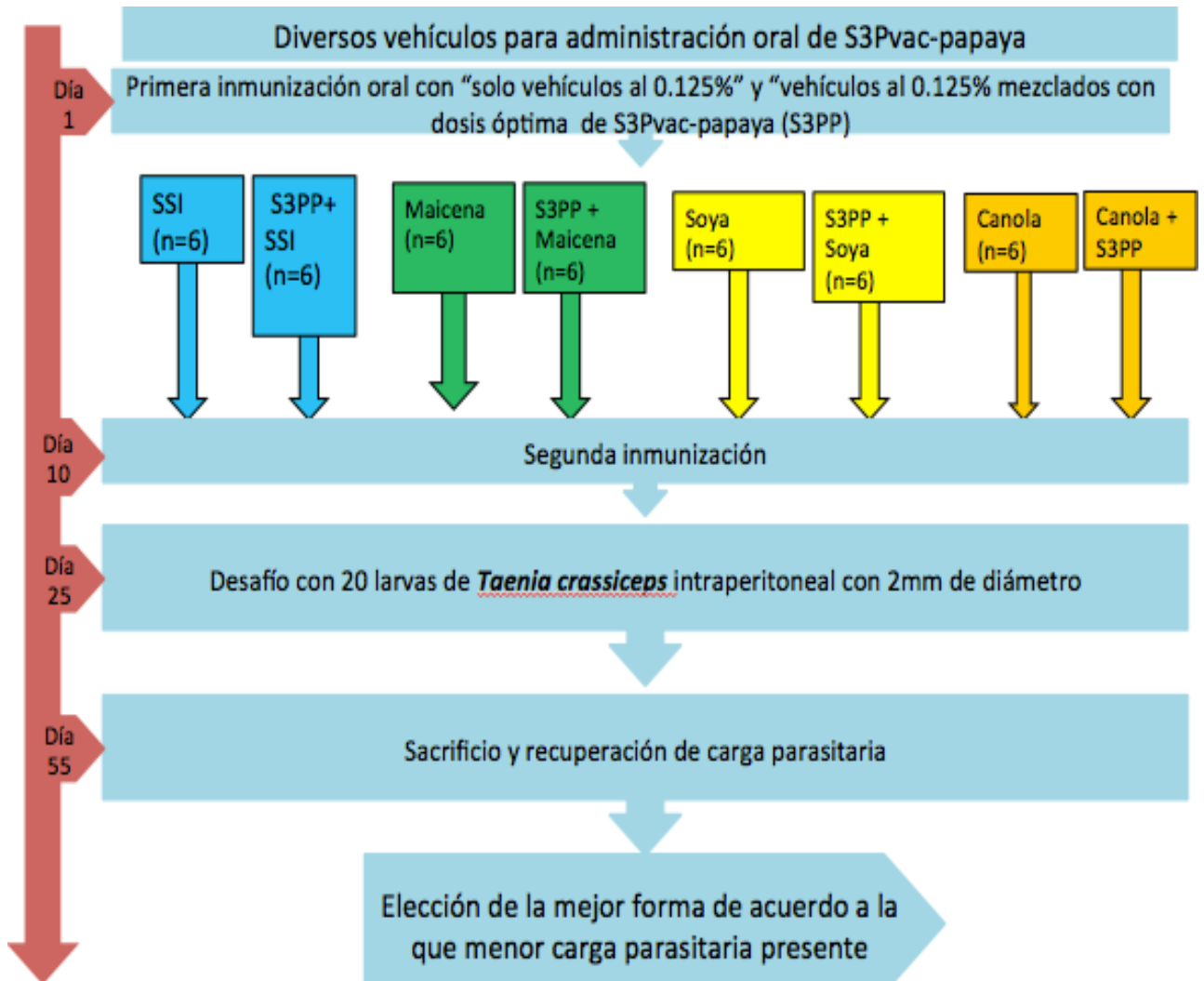


Figura 8. Diseño experimental para evaluar la eficacia de diversos vehículos.

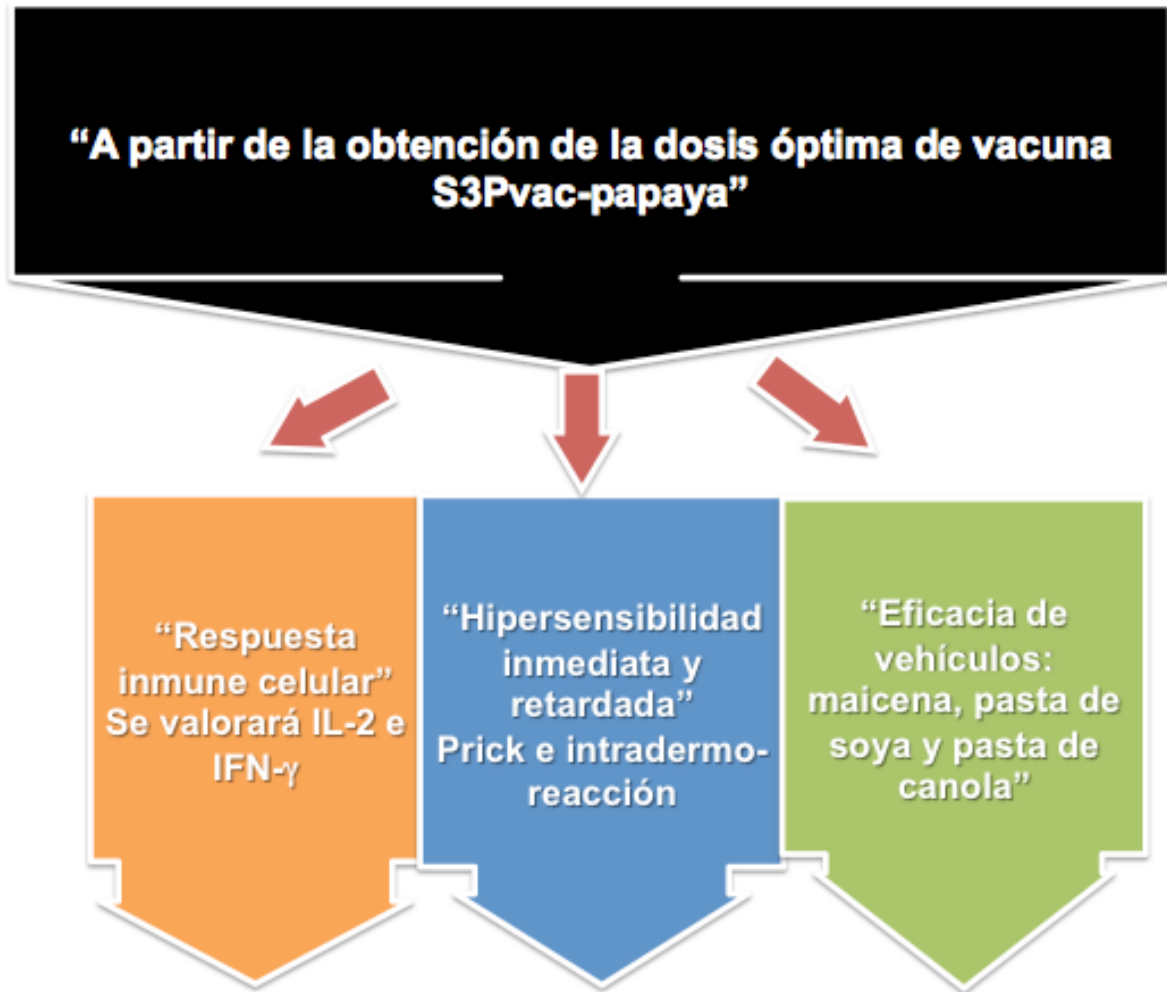


Figura 9. Resumen de todos los diseños experimentales.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico de los datos, se procesaron en Excel 7.0 (Microsoft). El análisis estadístico se realizó en el programa SPSS versión 22. Se aplicó análisis descriptivo univariado para conocer la forma de distribución de las distintas variables. Para determinar la dosis óptima protectora se aplicó ANOVA o Kruskal-Wallis según distribución que nos permite diferenciar promedios entre tres grupos independientes. En relación a la cantidad de parásitos y de respuesta linfoproliferativa se realizó mediana, media, desviación estándar e intervalos de confianza por ser variables cuantitativas. Así mismo se realizó ANOVA o Kruskal-Wallis de acuerdo a distribución.

La comparación de intensidad individual de parásitos entre los grupos se analizó con una prueba de comparación múltiple ANOVA o Kruskal-Wallis considerando un valor de $p < 0.05$ como estadísticamente significativo.

Para comparar la concentración de anticuerpos y de citocinas se aplicó ANOVA o Kruskal-Wallis con valor de $p < 0.05$ como estadísticamente significativo.

Para saber si hay diferencia en las respuestas de hipersensibilidad se empleó Kruskal-Wallis.

Para conocer el adyuvante más eficaz se aplicará ANOVA o Kruskal-Wallis según la distribución normal o no normal de los datos.

RESULTADOS

Objetivo específico 1: Determinar la dosis óptima protectora contra cisticercosis de la vacuna S3Pvac papaya administrada por vía oral en ratones BALB/cAnN.

Se cuantifico el número de cisticercos de la cavidad peritoneal en ratones hembra BALB/cAnN a los 30 días después de desafío intraperitoneal con 20 larvas de *T. crassiceps* y dos dosis de inmunización oral con extracto soluble de papaya (ESP) y vacuna S3Pvac-papaya, ambas a diversas concentraciones. Solución salina isotónica (SSI) como control negativo. Los ratones vacunados con S3Pvac papaya, mostraron menor carga parasitaria, aunque las dosis de 0.1 μg y de 1 μg mostraron disminución de la carga parasitaria, fue la dosis de 10 μg la que mostro menor carga de cisticercos, se corrobora que esta diferencia es significativa con un valor de $p < 0.02$ al aplicar ANOVA y prueba post hoc de Dunnett (fig. 10)

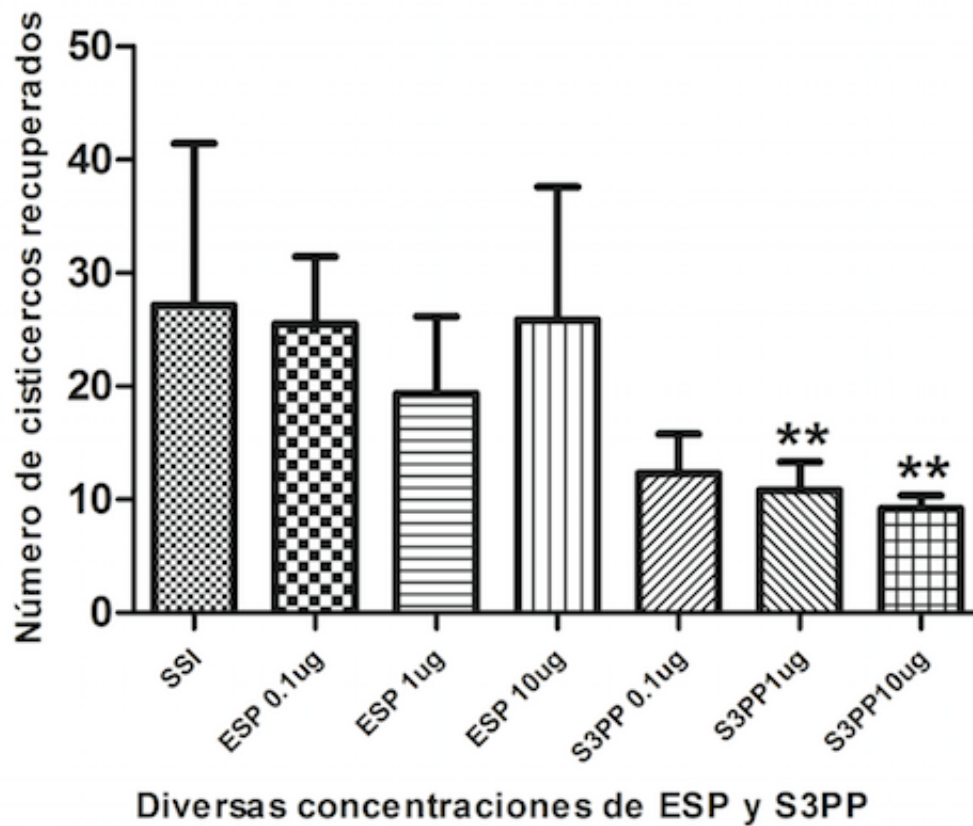


Figura 10. Efecto del empleo de diversas dosis de S3Pvac papaya sobre el número de cisticercos intraperitoneales en ratones hembra BALB/cAnN. Se administraron por vía oral dos dosis con diferencia de diez días, empleando 0.1, 1 y 10 μg de extracto soluble de papaya (ESP) y de extracto soluble de S3Pvac papaya (S3PP). Se empleó solución salina isotónica (SSI) como control negativo. A los quince días después de la segunda inmunización, todos los ratones se desafiaron con la aplicación intraperitoneal de 20 larvas de *T. crassiceps*. Treinta días después del desafío, se cuantificó la cantidad de cisticercos recuperados en el peritoneo de cada ratón. Los asteriscos (**) muestran significancia estadística con $p < 0.05$ con respecto al control negativo (SSI) obtenido por ANOVA y prueba post hoc de Dunnett.

Objetivo específico 2: medir la respuesta inmune celular, mediante la medición de IL-2, IFN- γ , en ratones BALB/cAnN vacunados por vía oral con la dosis óptima de S3Pvac Papaya.

RESULTADOS DE LA MEDICIÓN DE CITOCINAS EN EL SOBRENADANTE DE CULTIVO CELULAR

INTERFERON GAMMA

El sobrenadante de los cultivos celulares se obtuvo a las 72 horas y se cuantificó a través de método de ELISA mediante un kit comercial para detección de IFN- γ murino. Se obtuvo poca cantidad de IFN- γ y sin diferencia significativa en comparación con los grupos no inmunizados (fig. 11).

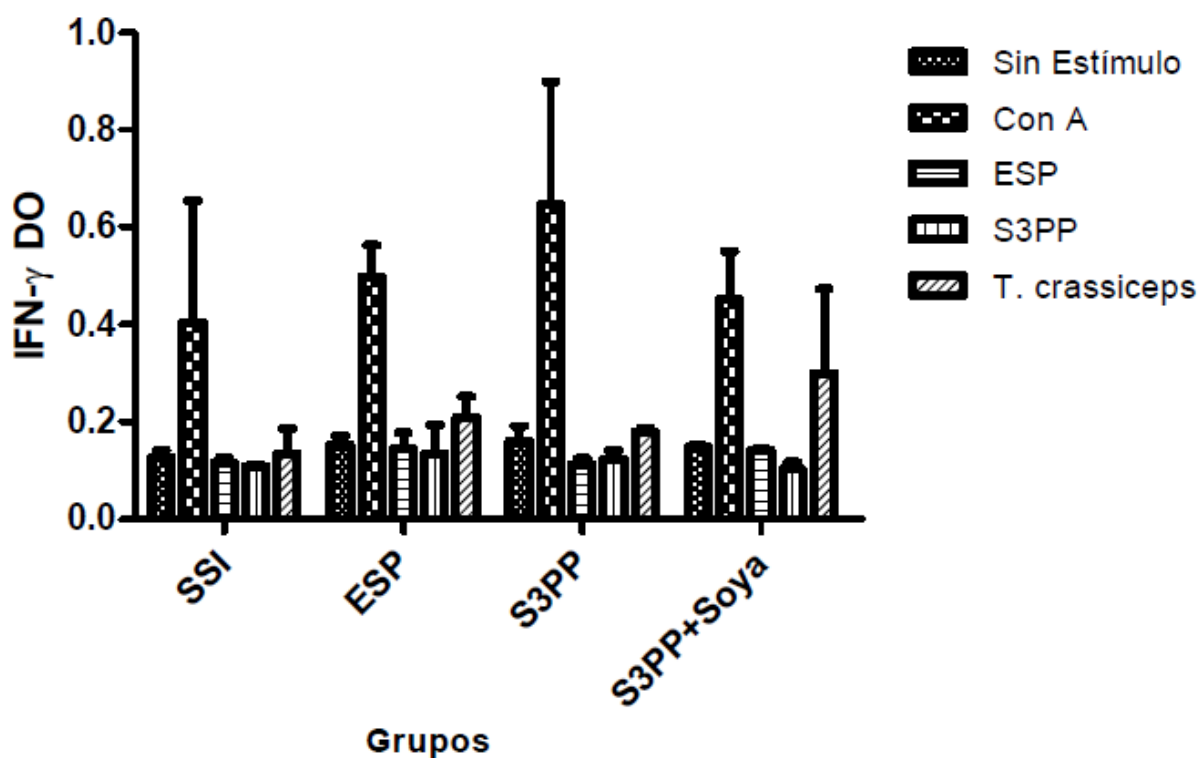


Figura 11. Efecto de diversos antígenos sobre la producción de interferón gamma en esplenocitos de ratones inmunizados con S3Pvac-papaya. Se inmunizaron por vía oral a 4 diferentes grupos de ratones, cada uno con un estímulo diferente: solución salina isotónica (SSi), 10 μ g de extracto soluble de papaya (ESP), 10 μ g de extracto soluble de S3Pvac papaya (S3PP) y 10 μ g de extracto soluble de papaya mezclado con 0.125% de soya (S3PP+soya). Los esplenocitos de cada ratón fueron cultivados y estimulados con 10 μ g de diversos antígenos: concanavalina A (Con A), extracto soluble de papaya (ESP), extracto soluble de S3Pvac papaya (S3PP) y antígeno total de *T. crassiceps*. A las 72 horas, se obtuvo 100 μ L del sobrenadante de cada pozo y se cuantificó la presencia de IFN- γ a través de método de ELISA.

INTERLEUCINA 2

El sobrenadante de los cultivos celulares se obtuvo a las 72 horas y se cuantificó a través de método de ELISA mediante un kit comercial para detección de IL-2 murino. Se obtuvo poca cantidad de IL-2 y sin diferencia significativa en comparación con los grupos no inmunizados (fig. 12)

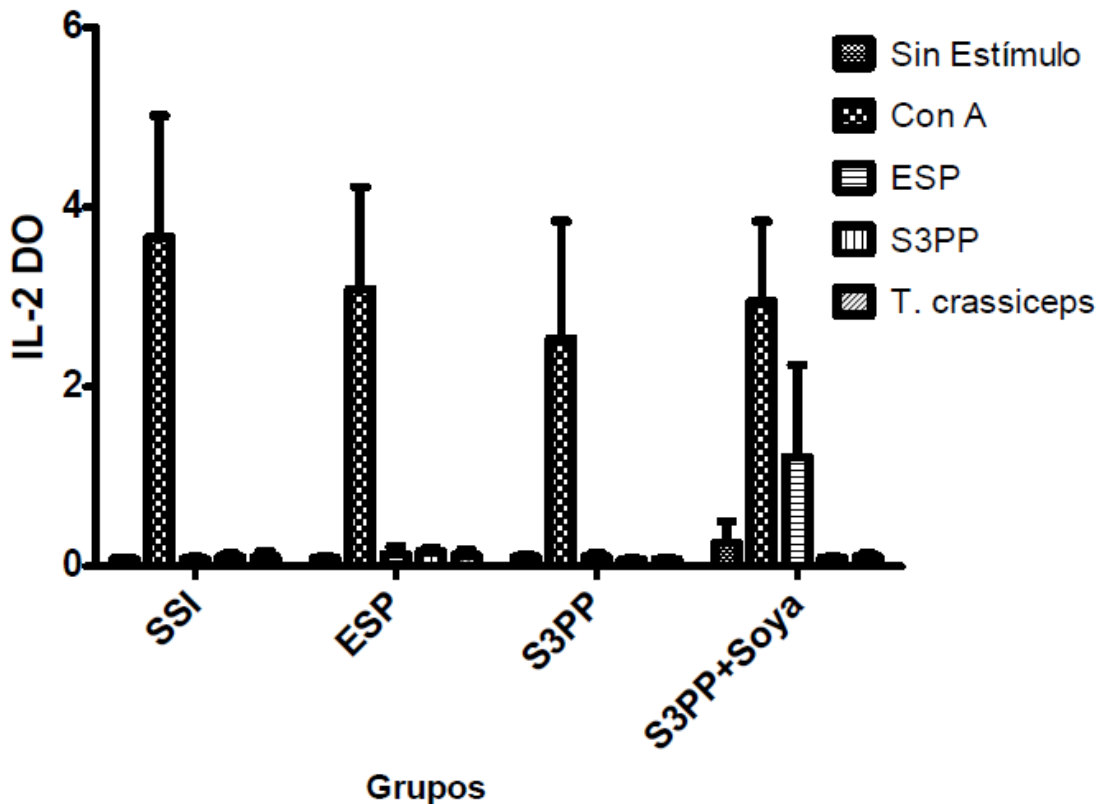


Figura 12. Efecto de diversos antígenos sobre la producción de IL-2 en esplenocitos de ratones inmunizados con S3Pvac-papaya. Se inmunizaron por vía oral a 4 diferentes grupos de ratones, cada uno con un estímulo diferente: solución salina isotónica (SSI), 10 μ g de extracto soluble de papaya (ESP), 10 μ g de extracto soluble de S3Pvac papaya (S3PP) y 10 μ g de extracto soluble de papaya mezclado con 0.125% de soya (S3PP+soya). Los esplenocitos de cada ratón fueron cultivados y estimulados con 10 μ g de diversos antígenos: concanavalina A (Con A), extracto soluble de papaya (ESP), extracto soluble de S3Pvac papaya (S3PP) y antígeno total de *T. crassiceps*. A las 72 horas, se obtuvo 100 μ L del sobrenadante de cada pozo y se cuantificó la presencia de IL-2 a través de método de ELISA.

Objetivo específico 3: Cuantificar la respuesta de hipersensibilidad inmediata y retardada in vivo en ratones BALB/cAnN vacunados por vía oral con la dosis óptima de S3Pvac Papaya.

EXPERIMENTO PARA EVALUAR HIPERSENSIBILIDAD INMEDIATA O TIPO I

A esta fase experimental se le llamó RI (respuesta inmune), en la cual se inmunizaron cuatro grupos conformados por 5 ratones cada uno. Fueron asignados como RI-1 (se aplicó dos dosis por vía oral -con 10 días de diferencia entre ellas- de solución salina isotónica), RI-2 (se aplicó dos dosis por vía oral –con 10 días de diferencia entre ellas- de 10 µg de extracto soluble de papaya), RI-3 (se aplicó dos dosis por vía oral – con 10 días de diferencia entre ellas- de 10 µg de S3PP) y RI-4 (se aplicó dos dosis por vía oral –con 10 días de diferencia entre ellas- de 10 µg de S3PP-soya).

A las dos semanas posteriores a la segunda inmunización, se aplicaron por vía intradérmica (en la región abdominal afeitada 24 horas antes), 20 µL de solución salina isotónica con 10 µg de cada uno de antígenos (ESP, S3PP y antígenos totales de *Taenia crassiceps*). Se hicieron mediciones para la formación de roncha y edema con vernier electrónico a los 5', 10' y 15' en los respectivos sitios de aplicación de cada uno de los antígenos. Se consideró positiva la medición que fuera mayor al control negativo (SSI) en cualquiera de los minutos evaluados.

Los ratones inmunizados con solución salina isotónica, presentaron una prueba negativa para todos los antígenos aplicados. Los ratones inmunizados con ESP, presentaron positividad a diferentes antígenos, cuatro de cinco a ESP, tres de cinco a S3Pvac papaya y tres de cinco a *T. crassiceps*; sin embargo, sin significancia estadística. De los ratones inmunizados con S3Pvac papaya, sólo uno de cinco, mostro positividad al antígeno de S3Pvac papaya; sin embargo, sin significancia estadística. Los ratones inmunizados con la mezcla de S3Pvac papaya y soya, solo presentaron positividad, uno de cinco a ESP y dos de cinco a S3Pvac papaya, además sin significancia estadística. Ninguno de los grupos inmunizados con los diferentes antígenos mostró postividad a la prueba de hipersensibilidad tipo I con los diferentes antígenos retados (Tabla 5).

Tabla 4. Resultados de la prueba de Hipersensibilidad tipo I en ratones BALB/cAnN inmunizados con S3Pvac papaya

Grupos N=5	Positividad para SSI	Positividad para ESP	Positividad para S3PP	Positividad para T. crassiceps	“p”
RI-1 SSI	0/5	0/5	0/5	0/5	NS
RI-2 ESP	0/5	4/5	3/5	3/5	NS
RI-3 S3PP	0/5	0/5	1/5	0/5	NS
RI-4 S3PP-soya	0/5	1/5	2/5	0/5	NS

Glosario: **RI** (Respuesta Inmune), **SSI** (Solución salina isotónica), **ESP** (Extracto soluble de papaya), **S3PP** (S3pVac-papaya), **S3PP-soya** (S3Pvac-papaya mezclada con soya).

RESULTADOS DE LA PRUEBA PARA EVALUAR DTH (Delayed Test Hypersensitivity) O HIPERSENIBILIDAD TIPO IV

A las dos semanas posteriores a la segunda inmunización, se aplicaron por vía intradérmica, 20 µL de solución salina isotónica con 10 µg de diversos antígenos (ESP, S3PP y antígenos totales de *T. crassiceps*). Se midió con vernier electrónico la formación de roncha en cada uno de los sitios correspondientes de los antígenos a las 48 horas y 72 horas; se consideró positiva la medición que fuera mayor al control negativo (SSI), la respuesta se presentó a las 48 horas y desapareció a las 72 horas.

Los ratones inmunizados con solución salina isotónica presentaron una prueba negativa para todos los antígenos retados. Los ratones inmunizados con ESP presentaron una prueba negativa para todos los antígenos retados. Los ratones

inmunizados con S3Pvac papaya, presentaron en cuatro de cinco, positividad al antígeno S3Pvac papaya con significancia estadística $p < 0.02$ y presentaron una prueba negativa para el resto de los antígenos retados. Los ratones inmunizados con la mezcla de S3Pvac papaya y soya, presentaron en cinco de cinco, positividad para S3Pvac papaya con significancia estadística $p < 0.02$ y presentaron una prueba negativa para el resto de los antígenos retados.

Sólo los ratones inmunizados con S3Pvac papaya o inmunizados con la mezcla de S3Pvac papaya con soya, mostraron positividad de manera específica al antígeno de S3Pvac papaya, sugiriendo una respuesta inmune celular antígeno específica y sin respuesta inmune cruzada con el resto de los antígenos retados, significancia estadística con $p < 0.05$ obtenido por prueba de Kruskal Wallis (Tabla 6).

Tabla 5. Resultados de la prueba de hipersensibilidad tipo IV en ratones BALB/cAnN inmunizados con S3Pvac papaya

Grupos N=5	Positividad para SSI	Positividad para ESP	Positividad para S3PP	Positividad para T. crassiceps	P
RI-1 (SSI)	0/5	0/5	0/5	0/5	NS
RI-2 (ESP)	0/5	0/5	0/5	0/5	NS
RI-3 (S3PP)	0/5	0/5	4/5**	0/5	0.0026
RI-4 (S3PP-soya)	0/5	1/5	5/5**	2/5	0.0029

Glosario: **SSI** (Solución salina isotónica), **ESP** (extracto soluble de papaya), **S3PP** (S3pVac-papaya), **S3PP-soya** (S3Pvac-papaya mezclada con soya).

** El análisis estadístico se hizo con prueba de Kruskal Wallis, comparando las pruebas positivas con el control negativo (SSI). Se consideró estadísticamente significativa una $p < 0.05$.

Objetivo específico 4: comparar el efecto de diversos vehículos mezclados con S3Pvac Papaya a dosis óptima sobre la eficacia protectora contra cisticercos en ratones BALB/cAnN.

EXPERIMENTO PARA CONOCER LA EFICACIA DE DIVERSOS VEHICULOS MEZCLADOS CON S3Pvac PAPAYA ORAL A DOSIS ÓPTIMA.

Se inmunizaron en dos ocasiones a ratones con diferentes vehículos al 0.125% (maicena, canola y soya) o bien con 10 μ g de S3Pvac papaya mezclada con los vehículos. Los ratones fueron desafiados con 20 larvas de *T. crassiceps* a las dos semanas de la segunda inmunización. Treinta días después, se cuantificó el número de cisticercos en la cavidad peritoneal.

Todos los ratones inmunizados con la mezcla de los vehículos con S3Pvac papaya, mostraron buena eficacia reductora de la carga parasitaria, en comparación con los ratones inmunizados solo con los vehículos; sin embargo sólo canola y soya presentaron resultados con significancia estadística $p < 0.009$ y $p < 0.006$ respectivamente (Tabla 7).

En contraste con los ratones inmunizados con solución salina isotónica, los ratones inmunizados con los diferentes vehículos (maicena, canola y soya) presentaron menor carga parasitaria; sin embargo, este resultado no mostró significancia estadística. Los ratones inmunizados con la mezcla de los vehículos con S3Pvac papaya, presentaron menor cantidad de cisticercos en comparación con los ratones inmunizados sólo con los vehículos; sin embargo, solamente la canola y la soya mostraron significancia estadística $p < 0.02$. El mejor vehículo para administrar S3Pvac papaya fue la soya, ya que presentó el menor número de cisticercos y con la mejor significancia estadística, obtenida por ANOVA y prueba post hoc de Dunnet (fig.13).

Tabla 6. Eficacia de diversos vehículos mezclados con S3Pvac papaya sobre la carga de cisticercos de *T. crassiceps* en ratones BALB/cAnN

Vehículo n=6	Sin S3Pvac papaya ($\bar{X}\pm DE$)	Con S3Pvac papaya ($\bar{X}\pm DE$)	Eficacia %	<i>p</i> *
SSI	107±46.8	18.6±7	80	0.041
Maicena	70.5±23	29.8±12.8	78	NS
Canola	72.4±68	11.5±8.5	91.6	0.009
Soya	41±16.4	10.3±2.1	95.7	0.006

SSI= Solución Salina Isotónica

Eficacia % = expresa el porcentaje de disminución en la carga parasitaria al comparar el grupo que se inmunizó solo con el vehículo y el grupo inmunizado con la mezcla del vehículo más S3Pvac papaya.

*El análisis estadístico se hizo con T de Student para variables independientes, comparando el grupo con vacuna contra su control (sólo vehículo). Se consideró estadísticamente significativa una $p < 0.05$

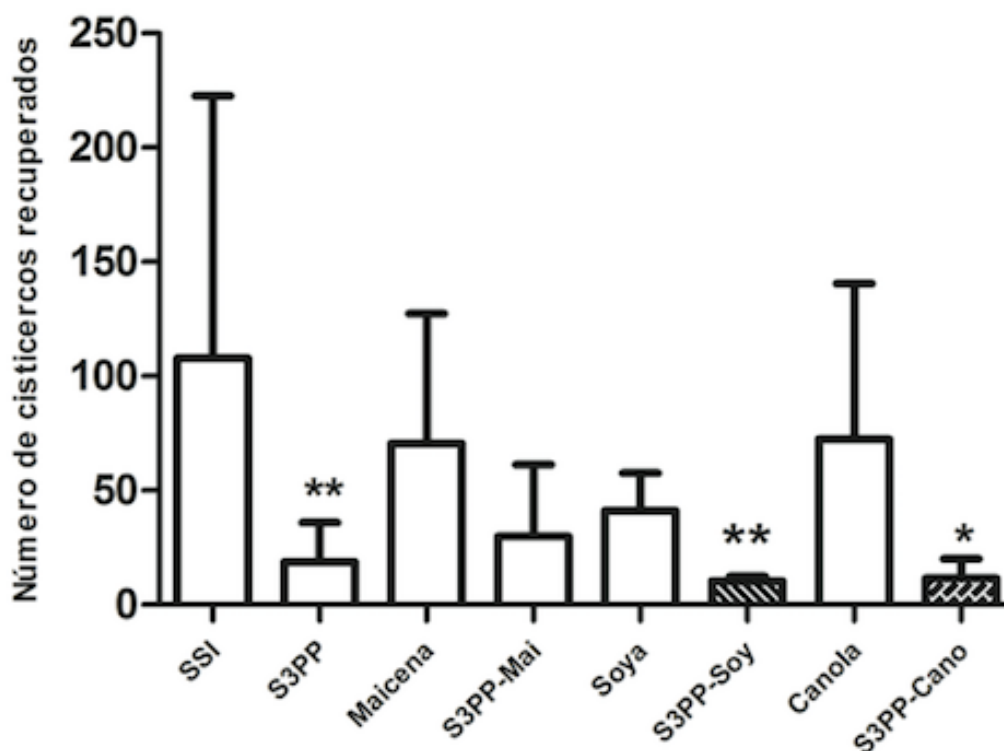


Figura 13. Efecto de diversos vehículos mezclados con S3Pvac-papaya sobre el número de cisticercos intraperitoneales en ratones BALB/cAnN. Se inmunizaron por vía oral a ratones hembra BALB/cAnN con dos dosis de 10 días de diferencia entre ellas. Se empleó solución salina isotónica (SSI), 10 μ g de extracto soluble de S3Pvac papaya (S3PP), diversos vehículos solos al 0.125% y S3PP mezclado con los diversos vehículos al 0.125%. Quince días después de la segunda inmunización, los ratones fueron desafiados con la aplicación intraperitoneal de 20 larvas de cisticercos. Los asteriscos (**) muestran significancia estadística con respecto al control negativo (SSI), obtenido por ANOVA y prueba post hoc de Dunnett. Se consideró estadísticamente significativo una $p < 0.05$.

DISCUSIÓN

DOSIS ÓPTIMA DE S3Pvac-PAPAYA ADMINISTRADA POR VÍA ORAL

La dosis óptima de una vacuna persigue inducir una respuesta inmune adecuada, ya que dosis muy pequeñas no evocarán respuesta inmune y dosis muy altas pueden provocar anergia. En nuestro estudio empleamos tres concentraciones con un orden de magnitud de diferencia entre cada una de ellas que va desde 0.1 μg , hasta 10 μg . Las tres dosis empleadas disminuyeron la carga parasitaria en los ratones inmunizados, demostrando la eficacia de la vacuna, aunque la dosis de 10 μg fue la dosis más adecuada, ya que redujo de manera significativa la carga parasitaria, por lo cual para el resto de los experimentos la consideramos como la dosis óptima. La mayoría de los estudios que preceden al actual han investigado la aplicación de S3Pvac por vía subcutánea dando buenos resultados. En otro estudio (Toledo y cols., 1999a), se emplearon los diferentes antígenos de S3Pvac en distintas concentraciones 0.5 μg , 10 μg y 50 μg y emulsificadas con Adyuvante Completo de Freundasí en saponina; sólo un péptido derivado de Ketc-7 (Gk1), a concentraciones de 50 μg mostró disminución importante de la carga parasitaria. Otro estudio de este mismo grupo de trabajo, reafirma nuestros hallazgos al usar dosis de 10 μg por péptido, también emulsificados en saponina y aplicados por vía subcutánea; la carga parasitaria disminuyó considerablemente y demostraron que por vía subcutánea, dosis pequeñas son adecuadas para inducir inmunidad (Toledo y cols., 1999b; Toledo y cols., 2001). En relación a la presentación de S3Pvac papaya, otros autores muestran resultados similares a los nuestros (Hernandez y cols., 2007), al emplear por primera vez el extracto soluble de S3Pvac papaya, por vía subcutánea; a dosis de 200 μg ó 1000 μg sin adyuvante, de todas las concentraciones empleadas, encontraron una adecuada eficacia a la dosis más baja de 200 μg y demostraron que el extracto soluble de S3Pvac papaya, induce inmunidad aún sin adyuvante. Nuestro estudio es uno de los primeros que analiza la utilidad del extracto soluble de S3Pvac papaya aplicado por vía oral. Los resultados sugieren que una dosis de 10 μg es eficaz para proteger contra la infección de *T. crassiceps* en ratones hembra BALB/cAnN.

EFICACIA DE DIVERSOS VEHÍCULOS PARA LA ADMINISTRACIÓN ORAL DEL EXTRACTO SOLUBLE DE S3PVAC PAPAYA

Con el propósito de facilitar la administración de la vacuna, empleamos diversos vehículos que además pudieran funcionar como adyuvantes. De los vehículos investigados, la maicena al parecer disminuyó la eficacia del extracto soluble de S3Pvac papaya administrada por vía oral para disminuir la carga parasitaria, por lo que la maicena no parece ser un adecuado vehículo para la administración oral del extracto soluble de S3Pvac papaya; aunque se requieren más estudios para corroborar estos resultados.. Por otro lado, la canola mezclada con el extracto soluble de S3pvac papaya, disminuye la carga parasitaria de manera importante y aunque ésta diferencia mostró significancia estadística, se requiere estudiar con mayor profundidad su eficacia, de cualquier manera, continua siendo un vehículo prometedor. Finalmente en nuestro estudio, la pasta de soya fue el mejor vehículo mezclado con el extracto soluble de S3Pvac papaya, que disminuyó significativamente ($p < 0.05$) la carga parasitaria en los ratones desafiados. Otra observación interesante es que la soya por sí misma disminuyó la carga parasitaria, por lo que es probable que tenga propiedades adyuvantes. La soya pudiera transportar adecuadamente una vacuna vía oral, ya que cuenta con un adecuada biodisponibilidad cuando es administrada como alimento en ratones BALB/c (Andrade y cols., 2010). Por ejemplo, se ha descrito la utilidad de la soya como transportador de subunidades de vacunas funcionales derivadas de microorganismos bacterianos (Hudson y cols., 2014), apoyando así nuestros resultados como adecuado vehículo. Otra propiedad de la soya es la de proteger y reparar las lesiones de la mucosa intestinal en ratones, tal y como lo demuestran algunos autores en sus estudios (Ren y cols., 2014), de tal manera que esto podría mantener la integridad del tubo digestivo para una adecuada absorción de la vacuna oral, además incrementa la producción in vitro de IgA en las células de las placas de Peyer en ratones BALB/c (Matsushita y cols., 2008). En relación a las propiedades adyuvantes, existe evidencia de que la lecitina derivada de la soya, mezclada con un extracto de vacuna contra *Neosporum caninum* y aplicado a ratones BALB/c, activa a células dendríticas e incrementa la concentración sérica de IgG2a e IFN- γ , así como limita la multiplicación del parásito contra el cual se ésta

protegiendo (Mansilla y cols., 2012). En cuanto a su inmunogenicidad y seguridad, la proteína de la soya induce la producción de anticuerpos antígeno-específicos sin estar relacionados a reacciones de hipersensibilidad tipo I, es decir, incrementa la respuesta inmune sin presentar reacciones adversas (Christensen y cols., 2003). Por lo tanto, la soya es un vehículo adecuado para administrar S3Pvac papaya por vía oral en ratones BALB/c, puede presentar propiedades adyuvantes que intensifiquen la eficacia de la vacuna y además la soya también puede administrarse en cerdos al ser un alimento empleado frecuentemente en su dieta habitual.

EVALUACION DE LA RESPUESTA INMUNE

HIPERSENSIBILIDAD INMEDIATA O TIPO I

La prueba cutánea de hipersensibilidad tipo I, mide la respuesta inmune *in vivo* mediada por la producción de IgE antígeno-específica. La presencia de este anticuerpo unido a células efectoras tales como mastocitos, incrementa la posibilidad de presentar una reacción alérgica (Kobayashi y cols., 2001). En nuestro estudio no encontramos evidencia de sensibilización al extracto soluble de S3Pvac papaya. Tanto en los grupos inmunizados con el control negativo (solución salina isotónica), como en los inmunizados con extracto soluble de papaya, extracto soluble de S3Pvac papaya y extracto soluble de S3pvac papaya mezclado con soya, no se presentaron reactividad de la piel. Nuestros resultados son apoyados por otros estudios (Chen y cols., 2011), los cuales para investigar la sensibilización de la papaya en ratones, emplearon papaya transgénica y encontraron que no incrementaba el potencial alergénico de otros antígenos e inclusive incrementaba las concentraciones séricas de IgM pero no así las concentraciones séricas de IgA, IgG o IgE. Nuestro estudio es el primero en evaluar las propiedades alergénicas de los péptidos contenidos en la vacuna, y los resultados sugieren que el extracto soluble de S3Pvac papaya administrado por vía oral, es una vacuna oral segura y que no induce una reacción de alergia.

PRUEBA DE DTH (Delayed Test Hypersensitivity) O HIPERSENSIBILIDAD TIPO IV

El objetivo de una vacunación efectiva es la generación de células de memoria, tanto linfocitos B de memoria como linfocitos T de memoria, los cuales son responsables de una rápida y eficiente respuesta inmune ante un segundo contacto con el antígeno.

La respuesta de hipersensibilidad tipo IV evalúa *in vivo* de manera integral la respuesta inmune celular semejante a la respuesta Th1, ya que para que se presente una respuesta positiva, se ven involucradas la célula dendrítica, el linfocito TCD4+, el linfocito TCD8+, citocinas (IL-1, IL-18) y macrófagos (vía IFN- γ) (Kobayashi y cols., 2001). Esta respuesta sólo se presenta si se ha despertado una respuesta inmune específica a un antígeno determinado, por lo que indica la presencia de células T de memoria protectoras contra dicho antígeno. Diversos autores enfatizan la importancia de la prueba de hipersensibilidad tipo IV para evaluar respuesta inmune celular protectora contra microorganismos parasitarios, o bien para evaluar respuesta inmune celular a vacunas (O'Daly y cols., 2010; Afonso-Cardoso y cols., 2007; Ajdary y cols., 2007). En nuestro estudio pudimos observar que los ratones inmunizados con S3Pvac papaya o bien S3Pvac papaya con soya, respondieron a la aplicación intradérmica de S3Pvac papaya, en contraste con el resto de los grupos inmunizados con otros antígenos, los cuales no presentaron respuesta a cualquiera de los antígenos aplicados de manera intradérmica. Aunque con otro tipo de parásito, los resultados de otros estudios (Latifynia y Hazrati, 2008) coinciden con los nuestros al evaluar la respuesta inmune de tipo celular de una vacuna contra *Leishmania*; ellos encontraron que en el reto con diversas concentraciones del antígeno completo de este parásito, la respuesta de hipersensibilidad tipo IV se relaciona con respuesta inmune celular protectora. Otros estudios similares también coinciden con nuestros resultados al evaluar la respuesta inmune y protección de una vacuna liposomal contra *Leishmania* en ratones BALB/c (Jaafari y cols., 2006), o bien en modelo experimental de leishmaniasis murina (Santos y cols., 2003). Nuestro estudio es el primero en reportar la respuesta inmune celular *in vivo* al extracto soluble de S3Pvac papaya, administrado por vía oral en ratones BALB/c. En base a lo anterior, nuestros resultados sugieren que el extracto soluble de S3Pvac papaya administrado por vía oral a una dosis de 10 μ g, induce una respuesta inmune

celular en ratones BALB/c. Además, al evaluar la respuesta inmune del extracto soluble de papaya, no existe respuesta cruzada, por lo cual también consideramos que es específica para los péptidos contenidos en la vacuna.

CITOCINAS EN EL SOBRENADANTE DE CULTIVO CELULAR

La detección de citocinas en el sobrenadante de cultivos celulares, nos permite evaluar una respuesta antígeno-específica en diferentes modelos biológicos inmunizados previamente con S3Pvac. Con la intención de evaluar la respuesta inmune celular se midieron citocinas relacionadas con la respuesta Th1, es decir IFN- γ e IL-2. Empleamos esplenocitos de ratones inmunizados por vía oral con extracto soluble de S3Pvac papaya. La medición se realizó a través de método de ELISA en el sobrenadante de cultivo celular después de 72 horas. Nuestros resultados mostraron poca producción de IFN- γ e IL-2 en los grupos inmunizados con el extracto soluble de S3Pvac papaya y sin diferencia estadísticamente significativa en comparación con los grupos no inmunizados. En contraste con nuestros resultados, otros autores reportan una concentración significativa de IL-2 e IL-4 en esplenocitos de ratones inmunizados con GK-1 al compararlo con ratones inmunizados solo con saponina (Toledo y cols., 1999a), también detectan producción de IFN- γ en esplenocitos de ratones inmunizados con Gk-1 (Toledo y cols., 1999a). En otros grupos de estudio identifican IFN- γ , TNF- α en células dendríticas derivadas de la médula ósea al ser estimuladas con GK-1 (Segura-Velazquez y cols., 2009). En relación a otras citocinas investigadas, los estudios detectan incremento en los niveles de IL-2 e IFN- γ en células CD3⁺ de ratones vacunados con KETc1 o KETc12 (Toledo y cols., 2001). En nuestro estudio no encontramos producción significativa de IFN- γ o IL-2, sin embargo es el primer estudio en el cual se emplea extracto soluble de S3Pvac papaya por lo cual es probable que se deban ajustar las concentraciones para el estímulo *in vitro*.

CONCLUSIONES

La dosis optima protectora del extracto soluble de S3Pvac papaya administrada por vía oral en ratones BALB/cAnN es de 10 μ g.

No observamos evidencia de que la S3Pvac papaya administrada por vía oral induce una reacción de alergia.

El extracto soluble de S3Pvac papaya induce una respuesta inmune celular *in vivo*, sin respuesta cruzada con el extracto soluble de la papaya.

La soya es un vehículo adecuado para administrar por vía oral el extracto soluble de S3Pvac papaya. Sus propiedades como adyuvantes deben estudiarse con más profundidad.

BIBLIOGRAFIA

- Afonso-Cardoso S.R., Rodrigues F.H., Gomes M.A., Silva A.G., Rocha A., Guimaraes A.H., Candeloro I., Favoreto S Jr, Ferreira M.S., de Souza M.A. (2007). Protective effect of lectin from *Synadenium carinatum* on *Leishmania amazonensis* infection in BALB/c mice. *Korean J. Parasitol.* 45:255-266.
- Ajdary S., Dobakhti F., Taghikhani M., Riazi-Rad F., Rafiei S., Rafiee-Tehrani M. (2007). Oral administration of BCG encapsulated in alginate microspheres induces strong Th1 response in BALB/c mice. *Vaccine* 25:4595-4601.
- Andrade J.E., Twaddle N.C., Helferich W.G., Doerge D.R. (2010). Absolute bioavailability of isoflavones from soy protein isolate-containing food in female BALB/c mice. *J. Agric. Food Chem.* 58:4529-4536.
- Arnon R., Ben-Yedidia T. (2003). Old and new vaccine approaches. *Int. Immunopharmacol.* 3:1195-1204.
- Bukreyev A., Belyakov I.M. (2002). Expression of immunomodulating molecules by recombinant viruses: can the immunogenicity of live virus vaccines be improved? *Expert Rev Vaccines* 1:233-245.
- Cabrera-Ponce J.L., J.A.Vegas a.H.E. (1995). Herbicide resistant transgenic papaya plants produced by an efficient particle bombardments transformation method. *Plant Cell Reports* 15:1-7.
- Capecchi B., Serruto D., Adu-Bobie J., Rappuoli R., Pizza M. (2004). The genome revolution in vaccine research. *Curr. Issues Mol. Biol.* 6:17-27.
- Chen Y.N., Hwang W.Z., Fang T.J., Cheng Y.H., Lin J.Y. (2011). The impact of transgenic papaya (TPY10-4) fruit supplementation on immune responses in ovalbumin-sensitized mice. *J. Sci. Food Agric.* 91:539-546.
- Christensen H.R., Bruun S.W., Frokiaer H. (2003). Antigenic specificity of serum antibodies in mice fed soy protein. *Int. Arch. Allergy Immunol* 132:58-67.
- Crane I.J., Forrester J.V. (2005). Th1 and Th2 lymphocytes in autoimmune disease. *Crit Rev Immunol* 25:75-102.
- Dannull J., Su Z., Rizzieri D., Yang B.K., Coleman D., Yancey D., Zhang A., Dahm P., Chao N., Gilboa E., Vieweg J. (2005). Enhancement of vaccine-mediated antitumor immunity in cancer patients after depletion of regulatory T cells. *J Clin. Invest* 115:3623-3633.
- de Aluja Aline S. (2000). *Cisticercosis por Tenia solium en cerdos de México*. Departamento de Patología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UNAM.
- de Aluja A.S., Villalobos N.M., Nava G., Toledo A., Martinez J.J., Plancarte A., Rodarte L.F., Fragoso G., Sciutto E. (2005). Therapeutic capacity of the synthetic peptide-based vaccine against *Taenia solium* cysticercosis in pigs. *Vaccine.* 23:4062-4069.

Dearman R.J., Alcocer M.J., Kimber I. (2007). Influence of plant lipids on immune responses in mice to the major Brazil nut allergen Ber e 1. *Clin. Exp. Allergy* 37:582-591.

Diaz M.A., Villalobos N., de A.A., Rosas G., Gomez-Conde E., Hernandez P., Larralde C., Sciutto E., Fragoso G. (2003). Th1 and Th2 indices of the immune response in pigs vaccinated against *Taenia solium* cysticercosis suggest various host immune strategies against the parasite. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 93:81-90.

Diaz-Orea M.A., Mijares J.M., Arcega R., Gomez-Conde E., Castellanos-Sanchez V.O., Briones-Rojas R., Flores-Alonso J.C., Marin-Briones M.A., Santos-Lopez G. (2013). In vitro effect of the S3Pvac vaccine against cysticercosis in human mononucleate cells. *Rev Neurol.* 56:456-463.

Fleischmann R.D., Adams M.D., White O., Clayton R.A., Kirkness E.F., Kerlavage A.R., Bult C.J., Tomb J.F., Dougherty B.A., Merrick J.M., . (1995). Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science* 269:496-512.

Fleury A., Sciutto E., Larralde C. (2012). Neurocysticercosis is still prevalent in Mexico. *Salud Publica Mex.* 54:632-636.

Flisser A. (1988). Neurocysticercosis in Mexico. *Parasitol Today* 4:131-137.

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

Fragoso G., Esquivel-Guadarrama F., Santana M.A., Bobes R.J., Hernandez B., Cervantes J., Segura R., Goldbaum F.A., Sciutto E., Rosas G. (2011). Heterologous prime-boost oral immunization with GK-1 peptide from *Taenia crassiceps* cysticerci induces protective immunity. *Clin. Vaccine Immunol.* 18:1067-1076.

Fragoso G., Lamoyi E., Mellor A., Lomeli C., Hernandez M., Sciutto E. (1998). Increased resistance to *Taenia crassiceps* murine cysticercosis in Qa-2 transgenic mice. *Infect. Immun.* 66:760-764.

Gonzalez A.E., Garcia H.H., Gilman R.H., Tsang V.C. (2003). Control of *Taenia solium*. *Acta Trop* 87:103-109.

Greco M. (2001). The future of vaccines: an industrial perspective. *Vaccine* 20 Suppl 1:S101-S103.

Groothuis T.A., Griekspoor A.C., Neijssen J.J., Herberts C.A., Neeffjes J.J. (2005). MHC class I alleles and their exploration of the antigen-processing machinery. *Immunol. Rev* 207:60-76.

Hernández M.J.L. J.C.J.L.C.-P.G.F.a.E.S. (2010). Development of an oral anti-cysticercosis vaccine delivered in genetical modified embryogenic callus of papaya, P. Tennant. *Transgenic Plant Journal* 4:64-70.

Hernandez M., Cabrera-Ponce J.L., Fragoso G., Lopez-Casillas F., Guevara-Garcia A., Rosas G., Leon-Ramirez C., Juarez P., Sanchez-Garcia G., Cervantes J., Acero G., Toledo A., Cruz C.,

- Bojalil R., Herrera-Estrella L., Sciutto E. (2007). A new highly effective anticysticercosis vaccine expressed in transgenic papaya. *Vaccine* 25:4252-4260.
- Hudson L.C., Garg R., Bost K.L., Piller K.J. (2014). Soybean seeds: a practical host for the production of functional subunit vaccines. *Biomed. Res. Int.* 2014:340804.
- Huerta M., Sciutto E., Garcia G., Villalobos N., Hernandez M., Fragoso G., Diaz J., Diaz A., Ramirez R., Luna S., Garcia J., Aguilar E., Espinoza S., Castilla G., Bobadilla J.R., Avila R., Jose M.V., Larralde C., de Aluja A.S. (2000). Vaccination against *Taenia solium* cysticercosis in underfed rustic pigs of Mexico: roles of age, genetic background and antibody response. *Vet. Parasitol* 90:209-219.
- Igietseme J.U., Eko F.O., He Q., Black C.M. (2004). Antibody regulation of Tcell immunity: implications for vaccine strategies against intracellular pathogens. *Expert. Rev Vaccines* 3:23-34.
- Jaafari M.R., Ghafarian A., Farrokh-Gisour A., Samiei A., Kheiri M.T., Mahboudi F., Barkhordari F., Khamesipour A., McMaster W.R. (2006). Immune response and protection assay of recombinant major surface glycoprotein of *Leishmania* (rgp63) reconstituted with liposomes in BALB/c mice. *Vaccine* 24:5708-5717.
- Kapsenberg M.L. (2003). Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat. Rev Immunol.* 3:984-993.
- Kobayashi K., Kaneda K., Kasama T. (2001). Immunopathogenesis of delayed-type hypersensitivity. *Microsc. Res. Tech.* 53:241-245.
- Kunz J., Kalinna B., Watschke V., Geyer E. (1989). *Taenia crassiceps* metacestode vesicular fluid antigens shared with the *Taenia solium* larval stage and reactive with serum antibodies from patients with neurocysticercosis. *Zentralbl. Bakteriol.* 271:510-520.
- Larralde C., Padilla A., Hernandez M., Govezensky T., Sciutto E., Gutierrez G., Tapia-Conyer R., Salvatierra B., Sepulveda J. (1992). Seroepidemiology of cysticercosis in Mexico. *Salud Publica Mex* 34:197-210.
- Latifynia A., Hazrati S.M. (2008). Safety and toxicity of a new formulated *Leishmania* major preliminary vaccine in animal model Balb/c and small white conventional laboratory mice. *Turkiye. Parazitol. Derg.* 32:103-108.
- Manoutcharian K., Diaz-Orea A., Gevorkian G., Fragoso G., Acero G., Gonzalez E., de A.A., Villalobos N., Gomez-Conde E., Sciutto E. (2004). Recombinant bacteriophage-based multiepitope vaccine against *Taenia solium* pig cysticercosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 99:11-24.
- Manoutcharian K., Rosas G., Hernandez M., Fragoso G., Aluja A., Villalobos N., Rodarte L.F., Sciutto E. (1996). Cysticercosis: identification and cloning of protective recombinant antigens. *J Parasitol* 82:250-254.
- Mansilla F.C., Franco-Mahecha O.L., Lavioria M.A., Moore D.P., Giraldez A.N., Iglesias M.E., Wilda M., Capozzo A.V. (2012). The immune enhancement of a novel soy lecithin/beta-glucans

based adjuvant on native *Neospora caninum* tachyzoite extract vaccine in mice. *Vaccine* 30:1124-1131.

Mason H.S., Warzecha H., Mor T., Arntzen C.J. (2002). Edible plant vaccines: applications for prophylactic and therapeutic molecular medicine. *Trends Mol. Med* 8:324-329.

Matsushita H., Kobayashi M., Tsukiyama R., Fujimoto M., Suzuki M., Tsuji K., Yamamoto K. (2008). Stimulatory effect of Shoyu polysaccharides from soy sauce on the intestinal immune system. *Int. J. Mol. Med.* 22:243-247.

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

O'Daly J.A., Gleason J.P., Pena G., Colorado I. (2010). Purified proteins from *Leishmania amastigotes*-induced delayed type hypersensitivity reactions and remission of collagen-induced arthritis in animal models. *Arch. Dermatol. Res.* 302:567-581.

O'Garra A., Robinson D. (2004). Development and function of T helper 1 cells. *Adv. Immunol.* 83:133-162.

Plancarte A., Flisser A., Gauci C.G., Lightowers M.W. (1999). Vaccination against *Taenia solium* cysticercosis in pigs using native and recombinant oncosphere antigens. *Int. J Parasitol* 29:643-647.

Rappuoli R. (2000). Reverse vaccinology. *Curr. Opin. Microbiol.* 3:445-450.

Ren J., Yang B., Lv Y., Guo S. (2014). Protective and reparative effects of peptides from soybean beta-conglycinin on mice intestinal mucosa injury. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 65:345-350.

Santos W.R., Aguiar I.A., Paraguai de S.E., de Lima V.M., Palatnik M., Palatnik-de-Sousa C.B. (2003). Immunotherapy against murine experimental visceral leishmaniasis with the FML-vaccine. *Vaccine* 21:4668-4676.

Sciutto E., Fragoso G., Baca M., De I.C., V, Lemus L., Lamoyi E. (1995). Depressed T-cell proliferation associated with susceptibility to experimental *Taenia crassiceps* infection. *Infect. Immun.* 63:2277-2281.

Sciutto E., Fragoso G., Diaz M.L., Valdez F., Montoya R.M., Govezensky T., Lomeli C., Larralde C. (1991). Murine *Taenia crassiceps* cysticercosis: H-2 complex and sex influence on susceptibility. *Parasitol Res.* 77:243-246.

Sciutto E., Fragoso G., Hernandez M., Rosas G., Martinez J.J., Fleury A., Cervantes J., Aluja A., Larralde C. (2013). Development of the S3Pvac Vaccine Against Murine *Taenia crassiceps* Cysticercosis: A Historical Review. *J Parasitol.* 99:693-702.

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

Segura-Velazquez R., Fragoso G., Sciutto E., Sarukhan A. (2009). Towards identification of the mechanisms of action of parasite-derived peptide GK1 on the immunogenicity of an influenza vaccine. *Clin. Vaccine Immunol* 16:1338-1343.

Shastri N., Cardinaud S., Schwab S.R., Serwold T., Kunisawa J. (2005). All the peptides that fit: the beginning, the middle, and the end of the MHC class I antigen-processing pathway. *Immunol. Rev* 207:31-41.

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

Toledo A., Larralde C., Fragoso G., Gevorkian G., Manoutcharian K., Hernandez M., Acero G., Rosas G., Lopez-Casillas F., Garfias C.K., Vazquez R., Terrazas I., Sciutto E. (1999a). Towards a *Taenia solium* cysticercosis vaccine: an epitope shared by *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* protects mice against experimental cysticercosis. *Infect. Immun.* 67:2522-2530.

Toledo A., Larralde C., Fragoso G., Gevorkian G., Manoutcharian K., Hernandez M., Acero G., Rosas G., Lopez-Casillas F., Garfias C.K., Vazquez R., Terrazas I., Sciutto E. (1999b). Towards a *Taenia solium* cysticercosis vaccine: an epitope shared by *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* protects mice against experimental cysticercosis. *Infect. Immun.* 67:2522-2530.

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

Walmsley A.M., Arntzen C.J. (2003). Plant cell factories and mucosal vaccines. *Curr. Opin. Biotechnol.* 14:145-150.