

# AVANCES EN EL DESARROLLO DE UNA VACUNA RECOMBINANTE EN CONTRA DE LA CISTICERCOSIS PORCINA



Edda Sciutto, Gladis Fragoso, 1Aline Alujaj Karen Manoutcharian, Maricela Hernández, Gabriela Rosas, 1 Nelly Villalobos, 1 Luis Rodarte y 2Silvia Díaz. Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, México. 1 Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, México. 2Escuela de Ciencias Químico-Biológicas, Universidad de Sinaloa, México.

## INTRODUCCION

La cisticercosis causada por el estadio larvario de la *Taenia solium* es una de las principales causas de enfermedad neurológica en humanos (Del Brutto y Sotelo, 1988) y ocasiona importantes pérdidas económicas en la porcicultura (Aluja, 1982). En México y otros países de América Latina, Asia y Africa representa un grave problema socioeconómico, especialmente en las áreas donde los escasos recursos sanitarios favorecen el ciclo de transmisión de este parásito. El ciclo de vida de la *Taenia solium* (Figura 1) incluye una fase larvaria (cisticerco), que afecta tanto al hombre (hospedero definitivo) como al cerdo (hospedero intermediario) y se adquiere por la ingesta de huevecillos presentes en alimentos contaminados con heces humanas. Cuando el hombre consume carne de cerdo mal cocida e infectada, los cisticercos pueden desarrollarse al estado adulto del parásito, la tenia, la cual puede producir cientos de miles de huevecillos capaces de transformarse en cisticercos cuando son ingeridos por el hombre o el cerdo, completándose así el ciclo de vida del parásito. La elevada frecuencia de esta parasitosis, justifica los intentos de prevenirla. El requerimiento indispensable del cerdo como hospedero intermediario en su ciclo de vida, nos permite interferir en la transmisión de esta parasitosis, modificando la susceptibilidad a la cisticercosis de este hospedero intermediario. En nuestro grupo de investigación hemos considerado reducir la susceptibilidad de los cerdos a esta parasitosis a través de dos estrategias eventualmente complementarias: por vacunación y aumentando la resistencia innata del cerdo modificándolo genéticamente (Figura 2). En este trabajo se puntualizan los avances principales en el desarrollo de una vacuna eficiente en contra de la cisticercosis porcina.

## RESULTADOS

### Estrategia utilizada

Considerando las dificultades económicas y experimentales involucradas en la experimentación con cerdos, hemos considerado como estrategia utilizar la cisticercosis murina por *Taenia crassiceps*, como modelo experimental de cisticercosis. Este cisticerco presenta un ciclo de vida similar al de la *T. solium* (Figura 1), siendo sus posibles hospederos intermediarios un conjunto extenso de roedores y sus hospederos definitivos los cánidos y felinos. Tanto los cisticercos como las tenias de ambas especies presentan una estructura macroscópica similar, sin embargo, los cisticercos de la *T. crassiceps* son más pequeños y además presentan una característica única que es su capacidad de dividirse por gemación polar múltiple, como se observa en la Figura 3 (Freeman, 1962). Este parásito se reproduce en la cavidad peritoneal de ratones rápidamente, ofreciendo así una importante fuente de antígenos obtenidos en condiciones experimentales controladas. Así, después de sólo algunos meses de infección pueden recuperarse a partir de la cavidad peritoneal de cada ratón infectado hasta gramos de antígenos (Figura 41 Tabla1). Este hecho aunado a que estos antígenos presentan una extensa reactividad cruzada con los antígenos de cisticercos de *T. solium* (Figura 5) (Larralde *et al.*, 1989), nos alentó en el empleo de los antígenos del cisticerco murino a fin de evaluarlos en su capacidad de prevenir la cisticercosis porcina.

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

En nuestros primeros estudios evaluamos la capacidad protectora asociada a los antígenos incluidos en el extracto completo de larvas de *T. crassiceps* y de *T. solium* inmunizando a ratones BALB/cAnN, desafiados con cisticercos de *T. crassiceps* (Sciutto *et al.*, 1990). Los resultados obtenidos indicaron que con ambos extractos antigénicos podían proteger efectivamente a los ratones contra la cisticercosis por *T. crassiceps* (Tabla 2, Sciutto *et al.*, 1990). Esta observación nos permitió especular que los antígenos de *T. crassiceps* fueran entonces capaces de conferir protección contra la cisticercosis porcina.

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

Considerando los hallazgos anteriores se evaluó en forma experimental si los antígenos de *T. crassiceps* eran capaces de proteger en contra de la cisticercosis porcina (Sciutto *et al.*, 1995). Como se observa en la Tabla 3, la vacunación en la dosis de 400 ug/kg de peso redujo en un 58% la carga parasitaria. Este resultado demostró que los antígenos del cisticerco murino son capaces de proteger contra la cisticercosis porcina. Sin embargo, el empleo de antígenos totales como inmunógeno parece ser de difícil control, como puede observarse en la Tabla 3, el efecto de la inmunización sobre la parasitosis parece depender muy críticamente de la dosis de antígeno empleada. Dosis de 4 mg/kg de peso indujeron facilitación de la parasitosis incrementándose la carga parasitaria en los animales inmunizados en más del 50% de lo esperado (Sciutto *et al.*, 1995). Considerando estos hallazgos decidimos identificar los antígenos protectores en este conjunto antigénico a fin de utilizar un inmunógeno de heterogeneidad controlada.

Identificación de antígenos protectores del cisticerco de *T. crassiceps*

Con el fin de optimizar la vacuna se obtuvieron fracciones antigénicas separadas en base a diferencias en el peso molecular en geles de acrilamida (7 y 15%). Estas fracciones incluidas en el gel y apropiadamente cuantificadas por densitometría (Figura 6), se utilizaron para la vacunación de ratones con el propósito de evaluar su efecto en la capacidad de crecimiento del parásito. Los procedimientos electroforéticos nos permitieron optimizar la separación de 12 diferentes fracciones antigénicas que se

evaluaron utilizando ratones de la cepa más susceptible (BALB/cAnN). El efecto de la inmunización en la parasitosis nos permitió clasificar los antígenos en tres grupos: un conjunto de antígenos resultó protector del hospedero (200, 123, 74, 56, 66, 40-50, 27 y 8-14 kDa), otro facilitador del crecimiento parasitario (200-205kDa) y un tercero irrelevante (150160, 93 y 108kDa), (Tabla 4, Valdez et al., 1994). Del conjunto de antígenos protectores se seleccionaron a los de 56, 66 y 74 kDa por inducir las mayores eficiencias de protección, y poder obtenerse en cantidades accesibles para su utilización. Estas fracciones se utilizaron de manera conjunta para evaluar su capacidad para proteger al cerdo contra la cisticercosis por *T. solium*. La inmunización de cerdos con estas fracciones antigénicas redujo muy importantemente la carga parasitaria, obteniéndose 0.16 cisticercos en promedio en los animales vacunados a diferencia de 5 en los no vacunados, con lo que se confirmó su capacidad protectora (Manoutcharian et al., 1995). Esta estrategia de separación de fracciones antigénicas nos permitió entonces identificar los antígenos protectores, aunque este tipo de aislamiento utilizado no es el adecuado para la provisión antígenos para ser utilizados masivamente, por lo que decidimos producirlos por métodos de DNA recombinante.

**Construcción de una librería de cDNA de *T. crassiceps***  
La librería de cDNA fue construida en el vector Univ-ZapXR utilizando mRNA de cisticercos de *T. crassiceps*. Trece clonas recombinantes se seleccionaron por inmunodetección utilizando anticuerpos policlonales específicos producidos en conejo: anti-56, anti-74 y anti-66. De la clonas identificadas se seleccionaron aquellas reconocidas por suero de cerdos infectados anti-*T. solium*. La presencia de estos antígenos en cisticercos de *T. solium* los señalaba como proteínas de gran interés para la prevención contra la cisticercosis porcina. Las clonas fueron designadas como KETc1, KETc4, KETc7 y KETc12 (Manoutcharian et al., 1995).

A partir de las proteínas codificadas por estas clonas, se purificaron por afinidad anticuerpos procedentes de conejos hiperinmunizados con las mismas clonas. Estos anticuerpos se utilizaron para la detección de la presencia de los antígenos específicos en el fluido vesicular de *T. crassiceps* por Inmunoelctrotransferencia. Estos anticuerpos reconocieron específicamente a antígenos nativos de 56 y 74-78 kDa.

**Vacunación con los antígenos recombinantes**  
Con la finalidad de evaluar la eficacia de las proteínas recombinantes del cisticerco, en la prevención de la cisticercosis, vacunamos ratones de la cepa susceptible BALB/cAnN. Los ratones fueron vacunados con Adyuvante Completo de Freund (ACF) y las proteínas recombinantes incluidas en un lisado *E. coli* infectada con el fago lambda que incluye el inserto correspondiente. Como controles se utilizaron animales solamente tratados con ACF y con ACF y proteínas del lisado de *E. coli* infectada con el mismo fago sin inserto. Los ratones vacunados con lisados de las clonas KETc1, KETc7 y KETc12 mostraron un elevado nivel de resistencia contra la cisticercosis murina causada por *T. crassiceps*, reduciendo la carga parasitaria al menos 5 veces de lo esperado (Manoutcharian et al., 1995).

**CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS**

Los resultados obtenidos en este estudio señalan que los antígenos de *Taenia crassiceps* pueden ser utilizados para proteger efectivamente en contra de la cisticercosis porcina. La estrategia utilizada para el desarrollo de una vacuna en contra de esta parasitosis nos ha permitido disponer a la fecha de cuatro antígenos recombinantes protectores (KETc1, 4, 7 y 12) los cuales protegen efectivamente en contra de la cisticercosis murina. La evaluación de estas proteínas recombinantes en su capacidad protectora en contra de la cisticercosis porcina se encuentra actualmente en curso con resultados alentadores

Con el fin de avanzar en el desarrollo de la vacuna recombinante, los genes de estos cuatro antígenos se están reclonando en vectores de expresión adecuados para su producción y purificación. Así, la disposición de los antígenos recombinantes purificados nos dará además la posibilidad de estudiar los mecanismos inmunológicos a través de los cuales se ejercen los efectos protectores, al menos en un principio, en la cisticercosis murina. Se contempla además evaluar los genes que codifican para los antígenos protectores en experimentos de inmunización génica como alternativa para simplificar la administración de esta vacuna.

**AGRADECIMIENTOS**

Este trabajo se ha desarrollado con financiamiento de DGAPA y CONACyT y ha recibido apoyo técnico de la QFB Mercedes Baca.

**REFERENCIAS**

1. Del Brutto O. H. and Sofelo, J.1988. Neurocysticercosis: an update. *Rev. Infect. Dis.* 10: 1075-1087.
2. Aluja, A. 1982. Frequency of porcine cysticercosis in Mexico. In Flisser, A., Willms, K., Laclette, J. P., Larralde, C., Ridaura, C., Beltrán, F. (Ed.) *Cysticercosis: present stage of knowledge and perspectives.* New York, N. Y. *Academic Press*, 53-62.
3. Freemann, R. S.1962. Studies on the biology of *Taenia crassiceps* (Zeder, 1800) Rud, olphi, 1810 (cestoda). *Canadian Journal of Zoology*40: 969-990.
4. Larralde, C., Montoya, R. M., Sciutto, E., Díaz, M. L., Govezensky, T. and Coltorti, E. 1989. Deciphering Western Blots of tapeworm antigen (*Taenia solium*, *Echinococcus granulosus* and (*Taenia crassiceps*) reacting with sera from neurocysticercosis and hydatid disease proteins. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 40: 282-290.
5. Sciutto, E., Fragoso, G., Trueba, L., Lemus, D., Montoya, R. M., Díaz, M. L., Govezensky, T., Lomelí, C., Tapia, G. and Larralde, C.1990. Cysticercosis vaccine: cross-protective immunity with *Taenia solium* antigens against experimental murine *Taenia crassiceps* cysticercosis. *Parasite Immunology* 12: 687-696.
6. Sciutto, E., Aluja, A., Fragoso, G., Rodarte, L. F., Hernández, M., Villalobos, N., Padilla, A., Keilbach, N, Baca, M., Govezensky, T., Díaz, S. and Larralde, C. 1995. Immunization of pigs against *Taenia solium* cysticercosis. Factors related to effective protection. *Veterinary Parasitology*. (En prensa).
7. Valdez, F., Hernández, M., Govezensky, T., Fragoso, G. and Sciutto, E 1994. Immunization against *Taenia crassiceps* cysticercosis. Identification of the most promising antigens in the induction of protective immunity. *Journal of parasitology* 80: 931 -936.
8. Manoutcharian, K., Larralde, C., Aluja, A., Fragoso, G., Rosas, G., Hernández M., Villalobos, N., Rodarte, L. P., Govezensky, T., Baca, M. and Sciutto, E. 1995. Advances in the Development of a Recombinant vaccine against *Taeni? solium* pig cysticercosis. *Vaccines* (In press).