

S3PVAC: POSIBLE OPCIÓN TERAPÉUTICA PARA INTERRUMPIR EL CICLO PARASITARIO DE *Taenia pisiformis*

Liliana Aguilar García¹, Edda Sciutto Conde², Virginio Aguirre Flores¹,
Reyes Vásquez Rosales¹, Agustín Orihuela Trujillo¹,
Juan José Zarate Ramos³, Fernando Iván Flores Pérez^{1*}

¹Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, Morelos. CP 62209, México.

Correo-e: ivanfloresperez@yahoo.com.mx

²Instituto de Investigaciones Biomédicas-UNAM

³Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia –UANL.

* Autor para correspondencia.

RESUMEN

El conejo (*Oryctolagus cuniculus* L.) es una especie doméstica y pueden afectarlo diversas enfermedades, dentro de estas, la cestodiasis más frecuente es la causada por la *Taenia pisiformis* (*T. pisiformis*). En el presente estudio se evaluó el efecto de la vacunación con el tripéptido sintético s3pvac en la carga parasitaria (número de metacéstodos y lesiones hepáticas) en conejas domésticas infectadas experimentalmente con huevos de *T. pisiformis*. los huevos de *T. pisiformis* se obtuvieron a partir del céstodo adulto de intestinos de perros, posteriormente se realizó la infección vía oral utilizando 3,000 huevos para cada coneja. se utilizaron 31 conejas en total, las cuales se dividieron aleatoriamente en 2 grupos de 14 y 17 cada

uno. Los resultados indican que la vacunación reduce significativamente la cantidad de metacéstodos vesiculares en conejas domésticas infectadas con huevos de *T. pisiformis* en un 86% a los 7 y en un 94% a los 21 días post-infección ($p < 0.01$). Con base en los resultados obtenidos en este estudio se concluye que la vacuna es capaz de reducir el número de metacéstodos de *T. pisiformis*.

Palabras clave: *Taenia pisiformis*, inmunización, S3Pvac

ABSTRACT

The rabbit (*Oryctolagus cuniculus* L.) is a domestic animal that could be infected by several micro organisms, among them; the more frequent cestodiasis is caused by *Taenia pisiformis* (*T. pisiformis*). In the present study the effect of the vaccination

Recibido: 2/07/2008; Aceptado: 24/09/2008.

with S3Pvac was evaluated on the parasitic load (metacestodes number and liver lesions). Thirty one female New Zealand white rabbits were used and divided randomly in two groups: The first group contained 7 rabbits treated as follow (vaccinated and infected), the rest of animals were only infected, all animal were humanely killed 7 days post infection. The second group with 17 rabbits was divided and 10 animals were infected, the rest of the animals received the vaccine plus infection, all the animals were euthanized 21 days post infection. In all cases the female rabbits were infected by orally rout with 3,000 *T. pisiformis* eggs and the vaccinated rabbits were immunized subcutaneously with S3Pvac (15 µg per each peptide) 7 days after infection. The results indicated that the vaccination significantly reduces the number of metacestodes ($P < 0.01$) at 7 and 21 days post infection. . Based on these results we conclude that the S3Pvac vaccine is effective to interrupt the *T. pisiformis* life cycle.

Key words: *Taenia pisiformis*, immunization, S3PVAC

INTRODUCCIÓN

Se ha referido que ciertas enfermedades de origen viral, parasitario y bacteriano pueden afectar al conejo domestico (Aiello, 1998; Quiroz, 2003), y que la enfermedad parasitaria originada por céstodos más frecuente es la *Taenia pisiformis* (*T. pisiformis*), según un estudio en el que se evaluaron un total de 17,354 conejos, en el cual la frecuencia fue de 6.9% lo que equivale a 1,201 conejos infectados de esta parásitosis (Flatt y Campbell, 1974).

El ciclo parasitario de *T. pisiformis* involucra a un huésped portador de tenia que puede ser el perro, zorro o gato, cuando la materia fecal es expulsada al exterior se liberan proglótidos grávidos maduros que se caracterizan por contener

en su interior miles de huevos, estos últimos están dotados de una cubierta de queratina que permite su sobrevivencia en diversas condiciones ambientales (Quiroz, 2003).

El conejo o las liebres se consideran como huéspedes intermediarios y en algunas ocasiones, se alimentan con forrajes contaminados con huevos de *T. pisiformis*, posteriormente, el huevo migra hasta el intestino y en este sitio anatómico eclosiona para dar origen al embrión hexacanto eclosionado u oncósfera, el cual penetra la pared intestinal y por medio de la circulación sanguínea se transporta al hígado (Quiroz, 2003).

La oncósfera, da origen a la fase de metacéstodo o cisticerco de *T. pisiformis* y se localiza en la cavidad abdominal de conejos y liebres, y a simple vista se observa como una vesícula de 6 a 12 mm de largo por 4 a 6 mm de ancho con una pared delgada y translúcida (Ronald y Ronald, 1975).

Cuando un conejo infectado con el metacéstodo de *T. pisiformis* es ingerido por el perro, zorro o gato se concluye el ciclo y se origina nuevamente un céstodo adulto o *T. pisiformis* (Quiroz, 2003).

Los huevos de *T. pisiformis* infectan al conejo, sin embargo, no son infectivos para el humano como ocurre con otros céstodos (Lightowlers *et al.*, 2003), también se ha informado que en las hembras son más susceptibles a la infección por metacéstodos de *Taenia solium* (*T. solium*) y *Taenia crassiceps* (*T. crassiceps*) y se propone que esta susceptibilidad esta relacionada con la secreción de hormonas ováricas (Huerta *et al.*, 1992; Morales *et al.*, 2002).

En el caso de México la frecuencia de *T. pisiformis* se desconoce, sin embargo, se ha referido que los conejos son alimentados con forrajes, desperdicio de verduras y agua (López *et al.*, 1999), los cuales constituyen vehículos ideales para

transportar huevos de *T. pisiformis*. Así mismo es conveniente considerar que en nuestro país parte de la cría de conejos se desarrolla en condiciones de traspatio que prevalecen en zonas rurales como periurbanas, en las que existe la presencia de perros portadores de *T. pisiformis* (Eguia-Aguilar *et al.*, 2005).

En conejos salvajes de la Isla de Macaronesia se registró una prevalencia de *T. pisiformis* del 8.8 al 30.4%, los metacéstodos se encontraron en mesenterio y también se observaron lesiones en hígado (Foronda *et al.*, 2003)

Con la finalidad de controlar a las cestodiasis que afectan a otras especies como el ser humano y el cerdo diversas estrategias han sido utilizadas; entre estas destacan: la educación, prácticas de higiene básicas, la irradiación de carne de cerdo infectado con el metacéstodo de *T. solium*, entre otras (Molinari *et al.*, 1997; Sciutto *et al.*, 2000; Flores-Pérez *et al.*, 2003).

Las cestodoosis producida por *T. pisiformis* y *T. crassiceps* han sido empleados como modelo de estudios para la teniasis cisticercosis que afecta al humano (Lopèz-Moreno, 2002).

Actualmente se ha desarrollado una vacuna denominada S3Pvac, que se encuentra conformada por tres péptidos que han demostrado tener una efectividad en contra del metacéstodo de *T. solium*, al reducir la prevalencia en un 52.6% y la intensidad de la infección con cisticercos viables en un 97.9%, esto fue observado en un estudio de campo en 2 comunidades rurales de México en cerdos que se infectaron de manera natural con *T. solium* (Huerta *et al.*, 2002).

Estos péptidos Ketc1, Ketc12 y GK1 originalmente aislados de *T. crassiceps* fueron identificados en *T. solium*, hasta la fecha la vacuna S3Pvac es la única constituida por antígenos definidos y validada en campo (Huerta *et al.*, 2002).

En el presente trabajo se evaluó en conejos infectados experimentalmente con huevos de *T. pisiformis* el efecto de la vacuna S3Pvac en la carga parasitaria.

MATERIALES Y MÉTODOS

a) Obtención del céstodo adulto de *T. pisiformis*

Con la finalidad de obtener al céstodo adulto de *T. pisiformis* se muestrearon 125 intestinos de perros adultos callejeros, sin importar su sexo.

Para cada perro se obtuvo el intestino delgado, y se procedió a ligar el extremo craneal y caudal con el objeto de evitar que el contenido intestinal saliera.

Los intestinos identificados por separado se mantuvieron a 4 °C, posteriormente se llevó a cabo un corte longitudinal en cada uno de ellos y se revisaron las paredes en busca de los céstodos adultos de *T. pisiformis*.

La identificación del céstodo adulto se llevó a cabo tomando en cuenta sus características morfológicas (Quiroz, 2003), los céstodos adultos recuperados fueron depositados en un tubo de 125 ml que contenía solución fisiológica y almacenados a 4 °C.

b) Obtención y cuantificación de Huevos de *T. pisiformis*

Para obtener los huevos del céstodo adulto de *T. pisiformis*, con un bisturí se seccionaron los proglótidos grávidos maduros y se utilizó un mortero para macerarlos.

De la suspensión resultante del macerado de los proglótidos grávidos maduros se tomaron 10 µl, que se diluyeron 1:10 con solución salina fisiológica, y se depositaron en una cámara de Neubauer.

Con el uso de un microscopio óptico (40X), se cuantificaron los huevos presentes en el cuadrante central de la cámara de Neubauer, el valor obtenido de conteo se multiplicó por 10,000 (Flores-Pérez *et al.*, 2003).

c) Ensayo piloto para confirmar la identidad de *T. pisiformis*

Para confirmar la identidad de los huevos de *T. pisiformis* se llevó a cabo un ensayo piloto en el que se infectaron 3 conejas de la raza Nueva Zelanda de un peso promedio de 2.5 kg, transcurridos los 7 días se recuperaron en todos los casos metacéstodos en estado vesicular en hígados con lesiones.

d) Infección con huevos de *T. pisiformis*

Las conejas se infectaron con 3000 huevos de *T. pisiformis* por vía oral, en este procedimiento se empleo una sonda estéril que fue introducida hasta el estómago, cuidando en todo momento de no lesionar el tracto digestivo del conejo.

En todos los casos los animales fueron previamente tranquilizados con ketamina (anesket laboratorios la pisa México) a una dosis de 25 mg/kg por vía intramuscular.

e) Animales y asignación de grupos

Se utilizaron un total de 31 conejas Nueva Zelanda con un peso de 2.5 Kg clínicamente sanas que fueron alimentadas con concentrado (Purina, 16% proteína cruda) y agua a libre demanda.

Un total de 14 conejas se dividieron de manera aleatoria en dos grupos de 7, el primer grupo fue infectado con 3,000 huevos de *T. pisiformis*, el resto de las conejas fue infectada con la misma cantidad de huevos, con la variante de ser inmunizadas con S3Pvac y sacrificadas a los 7 días posteriores a la infección

Para el siguiente grupo se emplearon 17 conejas y se seleccionaron 10 de manera aleatoria que se infectaron con 3,000 huevos, las 7 restantes se infectaron con la misma dosis y se inmunizaron con S3Pvac y se sacrificaron a los 14 días post infección

f) Inmunización con S3Pvac

Este procedimiento consistió en inmunizar por vía subcutánea y aplicando por separado cada uno de los tres péptidos a una dosis de 15 µg de cada péptido gk-1, ketc1, ketc12 + 50 µg de saponina, en todos los casos los animales se inmunizaron 7 días antes de la infección

g) Necropsias

De manera individual se registraron los hallazgos de la necropsia para cada animal mediante el uso de un protocolo

h) Análisis

Los datos de los resultados se analizaron con una prueba de rango de Wilcoxon.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En ambos experimentos se consideran como metacéstodo de *T. pisiformis* en estado vesicular los que fueron similares a los observados en la figura 1.

A los 7 días post infección en el grupo de conejos inmunizados se encontraron 4 metacéstodos vesiculares y el número máximo de metacéstodos encontrados fue de 3 en una sola coneja, y en el caso del testigo el número total de metacéstodos de *T. pisiformis* fue de 29 (Cuadro 1).

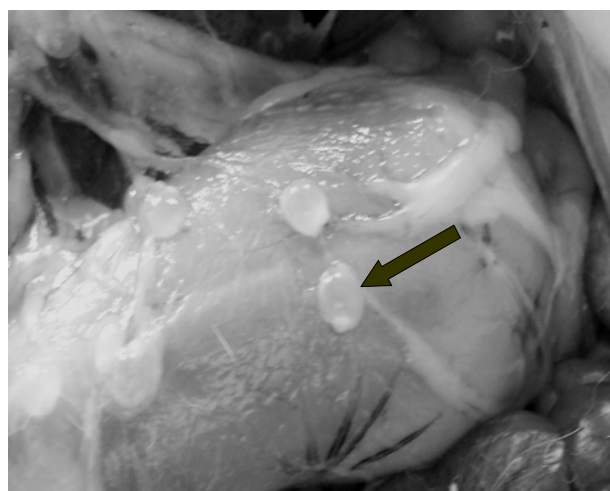


Figura 1. Metacéstodos de *T. pisiformis* en estado vesicular

A los 21 días, en el caso del grupo testigo sin inmunizar el número máximo de metacéstodos fue de 4 en una coneja y el total de 17 metacéstodos vesiculares de *T. pisiformis* y en los vacunados con S3Pvac se encontró uno (cuadro 2).

En el presente estudio se observó una reducción en el número de metacéstodos de *T. pisiformis* en conejas infectadas y vacunados con S3Pvac a los 7 y 21 días post-infección, en el caso de los 7 días la disminución fue de un 86% y en el caso de los 21 días la reducción fue de un 94%, los resultados obtenidos concuerdan con lo previamente referido en relación al efecto que S3Pvac posee al reducir el número de metacéstodos de *T. solium* en un 98.7% en cerdos infectados (Huerta *et al.*, 2002).

Cuadro 1. Número de metacéstodos de *T. pisiformis* a los 7 días post- infección

Tratamiento	Número Conejas	Número de metacéstodos vesiculares por coneja	Total	$\bar{X} \pm EE^{**}$
Testigos	7	1,0,0,6,12,5,5	29*	4.14±1.62
S3Pvac	7	0,0,3,1,0,0,0	4*	0.57±0.42

*(P<0.05) Prueba de Tukey-Kramer.

** Valores expresados en Promedios ± Error Estándar.

Cuadro 2. Número de metacéstodos obtenidos en conejas inmunizadas con S3Pvac a los 21 días post-infección

Tratamiento	Número conejas	Número de metacéstodos vesiculares por coneja	Total	$\bar{X} \pm EE^{**}$
Testigos	10	1,1,3,1,3,4,3,1,0,0	17*	1.7 ± 0.44
S3Pvac	7	0,0,0,1,0,0,0	1*	0.14±0.14

*(P<0.05) Prueba de Tukey-Kramer.

** Valores expresados en Promedios ± Error Estándar.

Para los péptidos Ketc1 y Ketc12 se obtuvieron porcentajes de protección en tres distintos ensayos que fueron de 66.7%, 75.3% y 100% cuando se empleo Ketc1 como inmunógeno y de un 52.7%, 73.4 y 81.1% cuando se utilizó el péptido Ketc12 como vacuna, el termino protección hace referencia a la disminución que existió en la cantidad de metacéstodos de *T. crassiceps* respecto al grupo testigo (Toledo et al., 2001), en el presente estudio hay que considerar que se emplearon los dos péptidos antes mencionados más aparte el péptido GK1, lo que podría explicar el resultado en el cual la protección fue de un 86 y 98.7% a los 7 y 21 días respectivamente.

Es importante tomar en cuenta que el porcentaje del 94% de protección observado en el presente estudio para la infección con huevos de *T. pisiformis* es cercano al porcentaje de un 98.7% observado para la infección con *T. solium*, en el caso de otras vacunas empleadas con el objetivo de combatir otras enfermedades cuando se obtiene un porcentaje de eficacia de un 80% se permite su comercialización por lo que en el presente estudio se sugiere que la vacuna S3Pvac podría estar sujeta a comercialización.

En México, como ejemplo de estas vacunas, se encuentra disponible la vacuna recombinante denominada GAVAC® (Laboratorios Revetmex) en contra de la garrapata *Boophilus microplus* que contiene el antígeno Bm86, esta vacuna ha mostrado la inducción de una respuesta protectora en bovinos inmunizados bajo condiciones controladas y en pruebas de campo y se ha encontrado una efectividad entre el 51% y 91% (Willadsen et al., 1995; Rodríguez-Vivaz et al., 2006).

Otra vacuna validada y probada en contra del nemátodo pulmonar de rumiantes *Dictyocaulus vivivarus* es Dictol® que presenta un 98% de efectividad en animales vacunados (Smith y Jackson, 2006).

En un trabajo en el que se emplearon embriones hexacanto eclosionados de *T. pisiformis* y huevos de *T. pisiformis* como vacuna se observó que existió una efectividad del 100% al emplearse una dosis de 2000 embriones hexacanto, ya que no se recuperó ningún metacéstodo de *T. pisiformis*. Sin embargo, al vacunar con 50,000 embriones hexacanto se recuperaron dos metacéstodos, y posteriormente al inmunizar con 50,000 huevos se recupero un metacéstodo (Gemmell, 1965), lo cual difiere con el presente estudio ya que la efectividad de S3Pvac no fue del 100%.

Es importante considerar que ninguna vacuna actualmente disponible y aprobada posee un 100% de efectividad ya que otros factores inherentes al huésped como pudieran ser el estatus inmunológico y nutricional, edad, etapa fisiológica (gestante o no) y susceptibilidad genética entre otros, condicionan y limitan el efecto y la eficacia de una vacuna.

La reactividad cruzada, observada es consistente con estudios previos en el modelo murino (ratón) de cisticercosis por *T. crassiceps*, los epítopes que originalmente se identificaron en *T. crassiceps* denominados GK1 (18 aa), Ketc1 (13 aa), y Ketc 12 (9 aa) se sintetizaron químicamente y resultaron ser compartidos por *T. solium* y protectores en contra de ambas cestodiasis (Toledo et al., 1999; Toledo et al., 2001; Huerta et al., 2002).

Cabe señalar la importancia de disponer en un futuro del ciclo completo de *T. pisiformis*, lo que permitirá considerarlo como un modelo adecuado para evaluar diferentes antígenos vacúnales y formas de administración para la prevención de la fase intestinal y larvaria del parásito.

Este trabajo constituye una evidencia experimental de la efectividad de la vacuna S3Pvac para proteger en contra de la infección con huevos de *T. pisiformis*.

LITERATURA CITADA

Aiello, BS. The Merck Veterinary Manual.1998. 1398-1399.

Eugia-Aguilar, P; Cruz-Reyes, A; Martinez-Maya, J; Ecological analysis and description of the intestinal helminths present in dogs in Mexico city. Vet Parasitol. 2005. 20:127(2).139-46.

Flatt, R; Campbell, W. Cysticercosis in rabbits: incident and lesions of the naturally occurring disease in young domestic rabbits. Lab. Anim. Sc. 1974.6:914-918.

Flores-Pérez FI; Rosas-Velasco, C; Lavielle-Rosa, E; Pérez-Martínez, M. Daños histológicos en hígados de conejos infectados experimentalmente con el metacéstodo de *Taenia pisiformis*: resultados preliminares. III Congreso Internacional de Epidemiología. Oaxaca. (Resumen in Extenso). 2003:656-662.

Foronda, P; Valladares, B; Morales-Lorenzo, J; Ribas, A; Feliu, C; Casanova,C.J. Helminths of the wild rabbit (*Oryctolagus cuniculus*, L) in Macaronesia. J Parasitol. 2003. 89(5):952-957.

Gemmell, MA. Immunological responses of the mammalian host against tapeworm infections. II species specificity of hexacanth embryos in protecting rabbits against taenia pisiformis. Immunology.1965.8:270-284.

Huerta, L; Terrazas, L.I; Sciutto, E; Larralde, C. Immunological mediation of gonadal effects on experimental murine cysticercosis caused by *Taenia crassiceps* metacestodes. J Parasitol. 1992. 78 (3): 471-6.

Huerta, M; Aluja, A.S; Frago, G; Toledo, A; Villalobos, N; Hernández, M; Gevorkian, G; Acero, G; Díaz, A; Álvarez, I; Ávila, R; Beltrán, C; García, G; Martínez J.J; Larralde, C; Sciutto, E. Synthetic peptide vaccine against *Taenia solium* pig cysticercosis: successful vaccination in a

controlled field trial in rural México. Vaccin. 2002. 20:262-266.

Lightowers, M.W; Colebrook, AL; Gaucchi, CG; Gaucchi, SM; Kingdon, CT; Monkkhouse, JL; Vallejo CR; Read, AJ; Rolfe, RA; Sato, C. Vaccinations against cestode parasites: anti-helminth vaccine that work and why. Vet parasitol. 2003.115:83-123.

López, M; Losada, H; Sandoval, S; Bennett, R; Arias, L; Rangel, J; Soriano, R; Cortez, J. The influence of urban tourism on household agriculture: the rabbit a new guest in the southeast of the metropolitan area of Mexico city. Livest Res Rur Develop.1999. (11):3.

López-Moreno, HS. 2002. Cestodiasis tisulares: participación de los linfocitos th cooperadores 1 y 2. Salud pública de México. 44:145-152.

Martínez, M.A. 2004. Cunicultura 2da ed. división continua México.

Molinari, JL; Rodríguez, D; Tato, P; Soto, R; Arechavaleta, F; Solano, S. 1997. Field trial for reducing porcine *Taenia solium* cisticercosis in Mexico by systematic vaccination of pigs. Vet parasitol. 69 (1-2):55-63.

Morales, J; Velasco, T; Tovar, V; Frago, G; Fleurry, A; Beltrán, C; Villalobos, N; Aluja, A, Rodarte, LF; Sciutto, E; Larralde, C. 2002. Castration and pregnancy of rural pigs significantly increase the prevalence of naturally acquired *Taenia solium* cysticercosis. Vet parasitol. 108:41-48.

Quiroz, RH. 2003. Parasitología y enfermedades parasitarias de animales domésticos. duodécima reimpresión. Limusa.

Rodríguez, VR; Rosada, AA; Basto, EG; García, VZ; Rosario, CR; Frago, SH. 2006. Manual técnico para el control de

garrapatas en el ganado bovino. Publicación técnica. 4:18.

Ronald F, Ronald W. 1975. Lesions of experimental cysticercosis in domestic rabbits. Lab anim sc:62-165.

Sciutto, E; Fragoso, G; Fleury, A; Laclette, JP; Sotelo, J; Aluja, A; Vargas, L; Larralde, C. *Taenia solium* disease in humans and pigs: an ancient parasitosis disease rooted in developing countries and emerging as a major health problem of global dimensions. Microbes Infect. 2000.15:1875-1890.

Smith, WD; Jackson, F. Avances recientes en la investigación de vacunas para el control de parásitos helmintos de rumiantes en pastoreo. En: Torres AJFJ; Aguilar, CAS; Cámara, SR. Editores. 4º Curso Internacionalmente "Epidemiología control integral de nematodos gastrointestinales de importancia económica en pequeños rumiantes". Yucatán. 127-137.

Toledo, A; Fragoso, G; Rosas, G; Hernández, M; Gevorkian, K; López-Casillas, F; Hernández, B; Aceros, G; Huerta, M; Larralde, C; Sciutto, E. 2001. Two epitopes shared by *Taenia crassiceps* and *Taenia solium* confer protection against murine *Taenia crassiceps* cysticercosis along with a prominent T1 response. Infect Immun. 69(3):1766-1773.

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

Willadsen, P; Bird, P; Cobon, GS; Hungerford, J. 1995. Commercialization of a recombinat vaccine against *Boophilus micropulus*. parasitol. 110: s43-s59.