

Efecto protector de oncósferas homólogas en la infección por *Hymenolepis nana* var. *nana*

The protector effect of homologous oncospheres to infection of *Hymenolepis nana* var. *nana*

Oriana Vásquez, Flora Chávez y Hermes Escalante

Universidad Nacional de Trujillo.
Facultad de Ciencias Biológicas.
Ciudad Universitaria, Av Juan
Pablo II s/n. Trujillo-Perú.
Email Oriana Vásquez:
Olenka2004@hotmail.com
Email Flora Chávez:
fychs2003@hotmail.com

Resumen

El efecto protector de oncósferas homólogas fue evaluado en *Mus musculus* infectados por *Hymenolepis nana* var. *nana*. El estudio se realizó en 20 ejemplares hembras de *Mus musculus* de dos meses de edad y libres de infección por helmintos, los cuáles fueron seleccionados al azar en dos grupos (experimental y control) de 10 ratones cada uno. Cada animal del grupo experimental recibió una dosis única del inmunógeno vía subcutánea, constituido por la mezcla de 0,05 mL de PBS con 15—24 oncósferas y 0,05 mL de Adyuvante Completo de Freund's para inducir la respuesta inmune. El grupo control recibió por igual vía la misma dosis, pero sin oncósferas. La evaluación del efecto protector de las oncósferas se realizó después de 25 días de la inmunización, para lo cual 200 huevos viables de *H. nana* var. *nana* fueron administrados por vía oral a cada uno de los 20 ratones, los que fueron mantenidos durante 15 días más antes de ser sacrificados para obtener los parásitos intestinales y comprobar la eficiencia de la inmunización. Las formas adultas de *Hymenolepis nana* var. *nana* fueron encontrados en dos ratones del grupo experimental y en 5 ratones del grupo control; siendo la eficiencia de la inmunización del 60%, observándose diferencia significativa entre el grupo control y el grupo experimental.

Palabras clave: *Hymenolepis nana*, oncósferas, infección, inmunógeno, helmintos, inmunización.

Abstract

The protector effect of homologous oncospheres was evaluated in *Mus musculus* infected with *Hymenolepis nana* var. *nana*. Twenty female of *Mus musculus* of two months old, free infection by helminths, were random-selected into two groups, experimental and control, of 10 mice each one. Each animal from the experimental group received a single subcutaneous dose of immunogen constituted by 0,05 mL of PBS with 15—24 oncospheres and 0,05 mL of complete Freund's Adjuvant to induce the immune response. The control group received a similar dose, but without oncospheres. The protector effect of the oncospheres was evaluated after 25 days of the immunization, 200 viable eggs of *H. nana* var. *nana* were inoculated by oral route to each one of the 20 mice, and they were kept alive for 15 days before to be sacrificed to get intestinal parasites and prove the immunization efficiency. Adult forms of *H. nana* var. *nana* were found in two mice of experimental group and 5 mice from control group; being immunization efficiency of 60%, showing significant differences between control group and experimental group.

Keywords: *Hymenolepis nana*, oncospheres, infection, immunogen, cestodes, immunization.

Presentado: 06/09/2006
Aceptado: 10/11/2007
Publicado online: 21/07/2008

Introducción

La inmunidad adquirida originada por enfermedades helmínticas ha conducido a incrementar esfuerzos para el desarrollo de vacunas contra parásitos. La mayoría de estas vacunas fueron experimentales y utilizaron una diversidad materiales antigénicos como por ejemplo: parásitos adultos homogenizados en fresco o seco, huevos, estados larvales, fluidos o extractos de estos materiales, algunos estadios muertos por formalina, huevos o estados larvales de especies heterólogas u homólogas, productos metabólicos (antígenos, exoantígenos), larvas, huevos atenuados y oncósferas activadas o muertas (Cai et al., 2001, Wang et al., 2003).

Las vacunas contra parásitos han sido desarrolladas contra la infección de *Ancylostoma caninum* en perros (Hotez et al., 2002). Oncósferas no viables de Taiwán *Taenia* y Indonesia *Taenia* fueron utilizadas para inducir inmunidad contra la infección de *T. solium* (Fan et al., 2003). También han sido desarrolladas vacunas experimentales con *T. saginata* para prevenir la teniasis causada por *Taenia solium* (Parkhouse et al., 1999).

Antígenos obtenidos *in vitro* de oncósferas activadas de *T. pisiformis*, *T. ovis*, *T. saginata* y *T. solium* estimulan altos niveles de resistencia contra las infecciones por este cestode (Kyngdon et al., 2006). También se desarrolló un sistema experimental para prevenir la cisticercosis, por *T. taeniformis* en ratas, reportándose que

una simple dosis de oncósferas atenuadas con o sin adyuvante fue suficiente para producir inmunidad completa y para dar tratamiento a la infección con huevos homólogos (Fan et al., 1997).

Las evidencias indican que las oncósferas invasivas son vulnerables a los anticuerpos mediados por una respuesta inmune y que las secreciones de las oncósferas estimulan la inmunidad. Considerando que la himenolepiasis es una de las cestodiasis más frecuentes en países en vías de desarrollo como el Perú y que existen, a nivel experimental, resultados exitosos de vacunación contra las infecciones por diversos helmintos, el presente trabajo estuvo orientado a evaluar el efecto protector de oncósferas homólogas en *Mus musculus* contra la infección por *Hymenolepis nana* var. *nana*.

Materiales y métodos

Material de estudio: Ochenta individuos de *M. musculus* cepa BALB/c de ambos sexos, de dos meses de edad, obtenidos del Bioterio de la Universidad Cayetano Heredia, fueron utilizados en el presente trabajo. Veinte hembras se utilizaron para evaluar el efecto protector de las oncósferas y 60 ratones de diferentes sexos fueron utilizados para la obtención de individuos adultos de *H. nana* var. *nana*. Los huevos de *H. nana* var. *nana* utilizados provinieron de muestras fecales de niños parasitados naturalmente. Aproximadamente 1000 adultos de *H. nana* var. *nana* fueron obtenidos por infección experimental.

Obtención de huevos de *H. nana*: Los huevos de *H. nana* fueron obtenidos de proglótidos grávidos de parásitos desarrollados experimentalmente en *M. musculus*. La infección experimental en *M. musculus* se realizó infectando por vía oral un inóculo de 200—500 huevos, en 0,5 mL de solución salina fisiológica (SSF), y obtenidos de las heces de niños parasitados y concentrados por la técnica de Willis (Maldonado, 1965). Los parásitos adultos obtenidos de la infección experimental fueron colocados en una placa Petri que contenía 2 mL de dicromato de potasio al 2,5%, donde fueron homogenizados y guardados por 24 horas a 4 °C, luego con ayuda de estiletes y de una lupa estereoscópica se rompió la parte terminal para lograr la salida de los huevos los cuáles fueron lavados varias veces con SSF y almacenados a 4 °C.

Liberación de las oncósferas: Luego se procedió a liberar las oncósferas (larva hexacanto), para ello, los huevos de *H. nana* var. *nana* fueron incubados en 5 mL de hipoclorito de sodio al 5,25% durante 45 minutos a 4 °C y en agitación continua para romper el cascarón y lograr la liberación de las oncósferas, las cuales se lavaron por centrifugación con PBS estéril a 3000 gpm por 15 minutos y luego se lavaron tres veces por centrifugación con SSF. Las oncósferas se guardaron a -5 °C; quedando listas para ser emulsificadas con adyuvante completo de Freund's (CFA).

Preparación del Inmunógeno: El inmunógeno fue preparado mezclando una suspensión de 300 a 400 oncósferas en 1 mL de PBS y 1 mL de CFA, componentes que fueron emulsificados por aproximadamente 45 minutos hasta conseguir un aspecto cremoso. Para el grupo control se preparó 1 mL de PBS y 1 mL de CFA siguiendo el mismo procedimiento anterior.

Inducción del efecto protector de las oncósferas: Veinte hembras de *M. musculus*, de dos meses de edad, fueron seleccionadas al azar, y se les realizó exámenes coproparasitológicos. Estos individuos fueron distribuidos al azar en dos grupos de 10 individuos, el grupo experimental y el grupo control, manteniéndose ambos grupos bajo control para evitar infecciones accidentales.

Inmunización y evaluación de la Inmunización: El grupo experimental recibió una inyección subcutánea de 0,01 mL de una mezcla de 0,05 mL de PBS (15—24 oncósferas) con 0,05 mL de CFA y el grupo control recibió subcutáneamente 0,1 mL de una mezcla de 0,05 mL de PBS y 0,05 mL de CFA (Fan et al., 1997).

Veinticinco días después de la inmunización se realizó la infección experimental, para lo cual a todos los ratones del grupo control y del grupo experimental se les administró vía oral 0,1 mL de PBS que contenía 200 huevos viables de *H. nana*. Después de 15 días de la administración del parásito, se realizó la necropsia de los ratones para verificar la presencia de especímenes adultos de *H. nana* y comprobar la eficiencia de la inmunización.

Tratamiento Estadístico: La evaluación de la infección experimental se hizo con análisis de varianza, con un nivel de significancia de 0,05. La eficiencia de la inmunización se calculó según lo indicado por Flisser et al. (1982):

$$Et = (P_{ni} - P_i) / P_{ni}$$

Donde:

P_{ni} : Proporción de ratones infectados en un grupo no inmunizado.

P_i : Proporción de ratones infectados de un grupo inmunizado.

t: Tiempo entre la inmunización y la evaluación de la eficiencia.

Resultados

Dos ratones del grupo experimental (inmunizados) presentaron cuatro formas adultas (1, 3) de *H. nana*, cuya longitud estuvo comprendida entre 1,5—5 cm y en el grupo control (no inmunizados) se encontraron cinco ratones con 21 (1, 2, 4, 4, 10) formas adultas, cuyas medidas estaban entre 0,2—1,5 cm. En todos los casos las infecciones estuvieron localizadas en el tercio último del ileón. La eficiencia de la inmunización calculada fue de 60% y el análisis de varianza mostró que existe diferencia significativa ($P < 0,05$) entre el grupo control y grupo experimental.

Discusión

La inmunidad producida por las oncósferas homólogas a la infección por *H. nana* var. *nana* en *M. musculus* fue baja, 60%; esto pudo suceder porque la dosis inmunizante fue insuficiente. Wikerhauser (1982), al inmunizar bovinos contra *Taenia saginata* concluyó que sobrenadantes de oncósferas incubadas in vitro contenían antígenos protectores similares a aquellos producidos por oncósferas inyectadas; pero que su eficiencia dependía de la cantidad más que en su calidad (Flisser et al., 1982).

El hallazgo de un menor número de ratones infectados en el grupo inmunizado así como la baja cantidad de parásitos encontrados en estos comparados con el grupo control, permite afirmar que hubo un efecto protector de las oncósferas homólogas a la infección por *H. nana* var. *nana*. Estudios previos demostraron que las oncósferas de cestodos inducen una respuesta protectora; tal es el caso de Fan et al., (1997) quienes inmunizaron cerdos con oncósferas no viables homólogas o heterólogas de *Taiwan Taenia*, *Korea Taenia* y *Taenia saginata*, observándose una fuerte resistencia a la inoculación e infección con huevos viables de *Taiwan Taenia*; asimismo Ito et al., (2004), reportaron una protección completa contra la infección de parásitos homólogos en ratas y ratones inmunizados con oncósferas de *H. diminuta* y *H. nana*.

El sexo de los ratones parece ser un factor importante en la variabilidad de los resultados. En nuestra evaluación del efecto protector de las oncósferas de *H. nana*, los ratones que se usaron fueron hembras; y existe evidencia que las hembras podrían ser resistentes a las infecciones con este parásito. Es así que Richard, (1982) encontró que el ganado vacuno inmunizado con oncósferas cultivadas in vitro de *Taenia hydatigena*, mostró mayor eficiencia de inmunización en hembras que en machos. Mitchell et al. (1977) también reportaron gran susceptibilidad a la infección con *T. taeniformis* en ratones machos.

La no infección del 50% de ratones en el grupo control podría atribuirse a que los ratones utilizados fueron adultos cuando se realizó el experimento, ya que *H. nana* afecta mayormente a huéspedes jóvenes o inmunodeficientes. El escaso número de cestodos encontrados se debería al poco número de huevos inoculados en la dosis, siendo la infectividad usualmente baja, ya que sólo 2 a 5% de los huevos desarrollan hasta cisticercoides (Weinmann, 1991).

Literatura citada

- Cai, X.; Z. Chai; Z. Jing; P. Wang; X. Luo; J. Chen; Y. Dou; S. Feng; C. Su & J. Jin. 2001. Studies on the development of DNA vaccine against *Cysticercus cellulosae* infection and its efficacy Southeast Asian. J. Trop. Med. Public Health. 32 (Suppl.2): 105-110.
- Fan P. C., W.C. Chung, K.S. Eom & A. Ito. 1997. Vaccination trials against Taiwan *Taenia* eggs in pigs injected with frozen oncospheres of Taiwan *Taenia*, Korea *Taenia*, *T. saginata* or *T. solium*. Parasitology 114: 541-544.

- Fan P. C., W.C. Chung, C.Y. Lin & CC. Wu. 2003. Vaccination trials against *Taenia solium* eggs in pigs injected with frozen oncospheres of *T. saginata* or *T. solium*. *J. Microbiol Immunol Infect.* Jun; 36(2): 96-100.
- Flisser, A.; C. Larralde & R. Pérez. 1982. Vaccination against cysticercosis. Perspectives in the immunological prevention of human disease. Instituto de Investigaciones Biomédicas. En: Flisser, A. (ed.).1982. *Cysticercosis*. Edit. Academic Press. INC, New York – EE.UU.
- Hotez, P.; J. Ashcom; Z. Bin; J. Bethony; A. Williamsom; J. Hawdon; F. Jianjun; et al. 2002. Effect of vaccinations with recombinant fusion proteins on *Ancylostoma caninum* habitat selection in the canine intestine. *J. Parasitol.* 88 (4):684-90.
- Ito, A.; PC. Fan & WC. Chung. 2004. Immunization of rodents against *Hymenolepis* infections using non viable homologous oncospheres Kaohsiung. *J. Med. Sci.* Dec; 20 (12):575-9.
- Kyngdon, C.T.; C.G. Gauci; RA. Rolfe; J.C. Velásquez; M.J. Farfán Salazar; M. Verástegui; et al. 2006. In vitro oncosphere-killing assays to determine immunity to the larvae of *Taenia pisiformis*, *Taenia ovis*, *Taenia saginata*, and *Taenia solium*. *J. Parasitol.* 92(2):273-81.
- Maldonado, J. 1965. *Helminthiasis del hombre en América*. Editorial Científico Médica. Barcelona – España.
- Mitchell, G.; J. Goding & M. Rickard. 1977. Studies on immune responses to larval cestodes in mice. Increased susceptibility of certain mouse strains and hypothyroid mice to *Taenia taeniformis* and analysis of passive transfer of resistance with serum. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 55: 165.
- Parkhouse, M.; T.; Garate; L. Beítez; P. Kirkham; S. Brookes; S. Brookes; et al. 1999. Approaches towards a vaccine for human, porcine and bobine cysticercosis. En García, M. y M. Martínez. (Ed.) 1999. *Taeniasis/cysticercosis por Taenia solium*. 2 da edición. Edit. Universo. Lima-Perú.
- Richard, M. 1982. Immunization against infection with larval. Taenid cestodes using oncospherical antigens. En Flisser, A. (ed).1982. *Cysticercosis*. Edit. Academic Press INC, New York. EE.UU.
- Wang, Q.; M., S. Sun; Z. L. Hu; D. Wu and Z.C. Wang. 2003. Immune response and protection elicited by DNA immunisation against “*Taenia cysticercosis*” Vaccine. 21(15): 1072 – 1080.
- Weiman, C. 1991. Immunity to *Hymenolepis nana* en the mouse. In: experiments and techniques in Parasitology. Edited by W. H. Freeman and Company. San Francisco.
- Wikerhauser, T. 1982. Immunization of bovines against *Taenia saginata* infection. En Flisser, A.(ed.).1982. *Cysticercosis*. Edit. Academic Press INC, New York – EE.UU.

