



Septiembre 2018

Estudio del modelo *Aspicularis tetraptera* – ratón y su aplicación en el desarrollo de una formulación vacunal basada en la proteína recombinante PP2A

Anabel Bolado Ortiz

Directores:
Dra. María Trelis Villanueva
Dra. M^a Dolores Bernal Membrilla,
Dr. Antonio Osuna Carrillo de Albornoz

DEPARTAMENT DE FARMÀCIA I TECNOLOGIA FARMACÈUTICA I PARASITOLOGIA

TESIS DOCTORAL

Programa de Doctorado en Parasitología Humana y Animal

Estudio del modelo *A. tetraptera* – ratón y su aplicación en el desarrollo de una formulación vacunal basada en la proteína recombinante PP2A

por

ANABEL BOLADO ORTIZ

Directores

Dra. María Trelis Villanueva

Departament de Farmàcia i Tecnologia Farmacèutica i Parasitologia, Àrea de Parasitologia, Universitat de València

Dra. M^a Dolores Bernal Membrilla

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Universitat de València

Dr. Antonio Osuna Carrillo de Albornoz

Instituto de Biotecnología, Grupo de Bioquímica y Parasitología Molecular, Departamento de Parasitología, Universidad de Granada

Valencia, 2018

*“Whatever happens, believe in
you. Believe in life.
Believe in tomorrow.
Believe in everything you do.”
- Bill Kaulitz*

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer en primer lugar la oportunidad que en su día mi tutora y directora María Trelis, profesora del departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica y Parasitología de la Universitat de València, me brindó, su total confianza en mi trabajo y en persona, y sobretodo agradecerle que me impulsara a meterme en este gran proyecto que ha sido una parte muy importante de mi vida y que como bien me dijo antes de embarcarnos en esto, era una gran oportunidad y aprendería mucho profesionalmente, pero sobre todo aprendería en lo personal, y en eso no he podido tener mejor referencia, me ha enseñado a parte de técnicas, a superarme, a aprender de otros, a luchar por lo que uno quiere pase lo que pase. Estoy muy segura de que sin ti y sin tus ánimos no hubiese visto el final del túnel.

De la misma forma quiero agradecer a mi directora M^a Dolores Bernal del departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universitat de València, su esfuerzo y mucha, mucha dedicación, además de enseñarme a ser autosuficiente y perfeccionista, su otra perspectiva de las cosas me ha abierto los ojos en miles de ocasiones y su forma de trabajar tan rigurosa, me ha enseñado con las cosas si quieres que salgan bien se hacen con dedicación, planificación y cariño.

A mi director Antonio Osuna del Instituto de Biotecnología de la Universidad de Granada, haber compartido toda su sabiduría, todas las respuestas cuando no sabíamos por seguir y ser el que creía que cada resultado, aunque fuese negativo, abría un abanico de posibilidades.

A otros profesores de la Universitat de València, Antonio Marcilla, Marius Fuente y M^a Teresa Puchades, de los que he aprendido una pasión por esta área que puede con todo y sobretodo, que todo se sobrepone con buen humor. También por su apoyo y la confianza de saber que podría contar con ellos ante cualquier problema.

Gracias al Departamento de Farmacia, Tecnología Farmacéutica y Parasitología en el que se encuentra integrado el Doctorado de Parasitología humana y animal, por la oportunidad de realizar mi Tesis en él y abrirme un abanico de posibilidades. Asimismo, a la Universitat de València, en la que comencé mis estudios superiores y siempre me ha ofrecido diferentes opciones para el futuro.

No podía olvidarme de Silvia Taroncher, empezamos el Máster juntas y en este largo recorrido hemos caminado a la par, nos hemos apoyado, hemos superado grandes retos juntas, todo lo que se venía se hacía más fácil sabiendo que lo podíamos hablar y entre las dos encontrar solución.

También hay gente ajena a todo esto que me ha animado desde fuera, sería imposible nombrarlos a todos, pero me gustaría mencionar a Patri, Paula y Sara, han sabido no preguntar cuando no debían, han comprendido mis nervios y han escuchado todos los problemas, pero también se han alegrado de mis logros. En especial, a Melo, me has apoyado desde el segundo 0, tú también te has sacrificado para que yo pudiese terminar, y jamás podré agradecerte el apoyo que me has ofrecido, que ni tú creo has sido consciente, mi más sentido gracias.

Quería dejar para el final a mi familia, porque ellos son el principio y el final, porque no podría acabar de escribir todo lo agradecida que estoy a mi madre y a mi hermano lo que han hecho por mí. A mi hermano, que siempre ha sido todo, siempre está detrás para que no me caiga y aquí me ha hecho seguir mi sueño, si yo he flaqueado me ha animado, si he dudado ha razonado conmigo, he caminado mucho detrás de su bolsillo, del bolsillo que siempre me ha protegido. A mi madre, aunque no haya comprendido tantas cosas nunca ha dudado de mí y de que podía conseguirlo, pero no lo hubiese conseguido si ella no hubiese creído en mí y sobre todo si ella no me hubiese dejado tomar mis decisiones, me haya dejado caer y me haya ayudado levantarme, soy lo que soy, y esto es lo que es por ella. No podía olvidarme de mi padre, que, aunque hace mucho que no está aquí, su duro trabajo y su lucha hasta el final me son de inspiración cada día, dio hasta el último aliento por mí y yo a cambio, le quiero brindar mis pequeños logros, para que allá donde esté sonría al ver donde he llegado.

RESUMEN

ANABEL BOLADO ORTIZ, 2018.- ESTUDIO DEL MODELO *Aspiculuris tetraptera* – RATÓN Y SU APLICACIÓN EN EL DESARROLLO DE UNA FORMULACIÓN VACUNAL BASADA EN LA PROTEÍNA RECOMBINANTE PP2A. TESIS DOCTORAL (DIRS. DRA. M^a TRELIS VILLANUEVA, DRA. M^a DOLORES BERNAL MEMBRILLA Y DR. ANTONIO OSUNA CARRILLO DE ALBORNOZ), FACULTAT DE FARMÀCIA, UNIVERSITAT DE VALÈNCIA, VALENCIA.

Las helmintiasis afectan a más de 1.500 millones de personas en todo el mundo, causando una gran morbilidad y asociándose a importantes tasas de discapacidad. En ganadería, se estiman pérdidas de productividad de unos 1.200 millones de euros al año, a los que hay que sumar los gastos en tratamientos antiparasitarios que rondan los 1.000 millones de euros anuales. En los animales cursan con problemas gastrointestinales, causando pérdidas de peso, retraso en el crecimiento y baja reproductibilidad. En la presente Tesis Doctoral se ha establecido un modelo experimental para el estudio de las nematodosis técnicamente fácil y reproducible. Para ello, se han puesto a punto las condiciones óptimas de infección con el modelo experimental *Aspiculuris tetraptera*-ratón (CD1), que han resultado en una dosis infectante de 2 hembras grávidas y un tiempo de infección inferior a 30 días para evitar infecciones secundarias consiguiendo infecciones controladas. En este modelo se ha caracterizado la respuesta inmunitaria, tanto a nivel local como sistémico, generada en el hospedador. Se han analizado los niveles de inmunoglobulinas, el recuento leucocitario, los cambios histológicos en la mucosa de colon y los perfiles de expresión de citoquinas en órganos y tejidos inmunoactivos (bazo, nódulo linfático mesentérico y placas de Peyer). La infección controlada del ratón se acompaña de elevadas IgM e IgG específicas en suero e IgA en mucosa. Todo ello acompañado por sobreproducción de quimioquinas atrayentes de neutrófilos y macrófagos en mucosa, y una respuesta inflamatoria Th17 inicial que facilita el establecimiento del parasitismo, y que deriva en una respuesta Th9 local promovida por la IL-25 producida en respuesta a la infección. Como un primer abordaje en el estudio de la prevención de las nematodosis se ha empleado este modelo en ensayos de vacunación con la proteína recombinante PP2A, formulada con distintos adyuvantes (mucoadhesivos como carboximetilcelulosa o Plurónic, paredes bacterianas, polietilenimina y ácido oleico) y utilizando distintas vías de administración. La vacuna constituida por el péptido PP2Ar con carboximetilcelulosa y paredes bacterianas como coadyuvantes (FV-CMC), administrada vía intranasal, proporcionó los mejores valores de eficacia (tasa de protección) y seguridad (efectos adversos), así como un mayor efecto inmunomodulador protector, por lo que es una buena candidata para ensayos de inmunización frente a nematodosis.

PALABRAS CLAVE: Nematoda, *Aspiculuris*, ratón, proteína recombinante, vacunación, PP2Ar, Carboximetilcelulosa, Plurónic, Polietilenimina, Vinil-Sulfona.

LISTADO DE ABREVIATURAS, SIGLAS Y ACRÓNIMOS

- APC: Célula Presentadora de Antígenos
- BSA: albúmina de Suero Bovino
- CMC: Carboximetilcelulosa
- d.p.i.: días post-inmunización
- d.p.inf.: días post infección
- d.p.r.: días post-reto
- EDTA: ácido etilendiaminotetraacético
- FITC: isotiocianato de fluoresceína
- GAM: anticuerpo cabra anti-ratón
- HE: tinción hematoxilina-eosina
- IFN: interferón
- Ig: inmunoglobulina
- IL: interleuquina
- KO: knock-out
- NK: "natural killer" o citocina natural
- NLM: nódulo linfático mesentérico
- OVA: ovoalbúmina
- PAS: Ácido Peryódico de Schiff
- PBS: tampón fosfato salino
- PBS-T: tampón fosfato salino con Tween
- PCR: reacción en cadena de la polimerasa
- PEI: polietilenimina
- PLU: Plurónic
- PP: placas de Peyer
- PP2Ar: PP2A recombinante

- PSTP: proteína serin/treonin fosfastasa
- RT-qPCR: reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real semicuantitativa
- Tfh: células T auxiliares foliculares
- TGF: factor de crecimiento transformante
- Th: linfocitos T cooperadores
- Th1: linfocitos T cooperadores de tipo 1
- Th17: linfocitos T cooperadores de tipo 17
- Th2: linfocitos T cooperadores de tipo 2
- Th22: linfocitos T cooperadores de tipo 22
- ThGM: linfocitos T cooperadores secretores del factor estimulante de colonias de granulocito-macrófago
- TNF: factor de necrosis tumoral
- Treg: linfocitos T reguladores

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	10
1.1. HELMINTIASIS HUMANAS	11
1.2. IMPORTANCIA DE LAS HELMINTIASIS EN SALUD PÚBLICA	12
1.3. PARÁSITO MODELO: <i>Aspiculuris tetraptera</i>	15
1.4. RESPUESTA INMUNITARIA ASOCIADA A LAS NEMATODOSIS	19
1.5. MECANISMOS DE EVASIÓN INMUNITARIA	25
1.6. TRATAMIENTO DE LAS INFECCIONES POR NEMATODOS	26
1.7. DESARROLLO DE VACUNAS FRENTE A NEMATODOS	28
1.7.1. Adyuvantes	30
1.7.2. Vías de inoculación para la administración de vacunas	32
1.8. PROTEÍNAS DE NEMATODOS CANDIDATAS PARA VACUNACIÓN	33
2. OBJETIVOS	38
3. MATERIAL Y MÉTODOS	40
3.1. MATERIAL BIOLÓGICO	41
3.1.1. Material parasitológico: <i>Aspiculuris tetraptera</i>	41
3.1.2. Animales de experimentación: ratón ICR (CD1)	41
3.2. CONSIDERACIONES ÉTICAS	42
3.3. INFECCIONES EXPERIMENTALES	42
3.4. ENSAYOS DE INMUNIZACIÓN	44
3.4.1. Obtención del antígeno: PP2Ar	44
3.4.2. Vías de inmunización	45
3.4.3. Diseño experimental	46
3.4.4. Fórmulas vacunales	47
3.5. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS PROTEICOS	50
3.6. OBTENCIÓN DE SECCIONES DE COLON Y MUCOSA INTESTINAL	50
3.7. OBTENCIÓN DE MUESTRAS SANGUÍNEAS	51
3.8. RECUENTO LEUCOCITARIO	52
3.7. ENZIMOINMUNOENSAYO (ELISA INDIRECTO)	53
3.8. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS	54
3.8.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida	54
3.8.2. Tinción de geles	54
3.8.3. Transferencia a membranas (<i>Western-blot</i>) e inmunodetección	55
3.9. HISTOLOGÍA INTESTINAL	55
3.9.1. Obtención de cortes histológicos	55
3.9.2. Tinción con Hematoxilina-Eosina	56
3.9.3. Tinción con PAS-Hematoxilina	57
3.9.4. Inmunohistoquímica	58

3.10. EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL Y PCR REVERSA	59
3.11. PCR A TIEMPO REAL Y CUANTIFICACIÓN RELATIVA (RT-qPCR).....	60
3.12. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	62
4. RESULTADOS	63
4.1. ESTUDIO DEL MODELO EXPERIMENTAL <i>A. tetraptera</i> – RATÓN.....	64
4.1.1. Determinación de las condiciones óptimas para la infección experimental	64
4.1.2. Variaciones en el recuento leucocitario con la infección	67
4.1.3. Respuesta inmunológica del ratón frente al nematodo <i>A. tetraptera</i>	67
4.1.4. Análisis de la inmunogenicidad de las proteínas de <i>A. tetraptera</i>	70
4.1.5. Estudio histológico de colon proximal.....	72
4.1.6. Análisis de la expresión de quimioquinas mediante inmunohistoquímica sobre cortes histológicos de colon	73
4.1.7. Determinación de la expresión de citoquinas en tejidos y órganos linfoides tras la infección	76
4.2. ENSAYOS DE VACUNACIÓN EN EL MODELO EXPERIMENTAL <i>A. tetraptera</i> -RATÓN .	80
4.2.1. Evaluación de la eficacia de la vacunación con el péptido PP2Ar según la fórmula y la vía de administración.....	80
4.2.2. Evaluación de la seguridad de la vacunación con el péptido PP2Ar según la fórmula y la vía de administración	83
4.3. ESTUDIO DE LA RESPUESTA DEL RATÓN A LA INFECCIÓN TRAS LA INMUNIZACIÓN...	85
4.3.1. Análisis de las poblaciones leucocitarias en los ensayos de vacunación.....	85
4.3.2. Análisis de la respuesta humoral en los ensayos de vacunación. Isotipos y cinética de producción.....	87
4.3.3. Análisis de las proteínas del extracto de <i>A. tetraptera</i> reconocidas por los anticuerpos del ratón a lo largo del ensayo de vacunación con FV-CMC.....	91
4.3.4. Análisis histológico del colon proximal de los ratones inmunizados con FV-CMC	93
4.3.5. Análisis, mediante inmunohistoquímica, de la expresión de quimioquinas en colon de ratón inmunizado con FV-CMC.....	96
4.3.6. Determinación del perfil de citoquinas en tejidos y órganos linfoides de ratón inmunizado con FV-CMC	99
5. DISCUSIÓN	103
5.1. ESTUDIO DEL MODELO EXPERIMENTAL <i>A. tetraptera</i> -RATÓN	104
5.2. ENSAYOS DE VACUNACIÓN EN EL MODELO EXPERIMENTAL <i>A. tetraptera</i> -RATÓN	111
6. CONCLUSIONES	119
7. BIBLIOGRAFÍA	122

1. INTRODUCCIÓN

1.1. HELMINTIASIS HUMANAS

El término "helminto" comprende tradicionalmente varios grupos muy diferentes de parásitos: Turbellaria, Trematoda, Cestoda, Nematoda y Acanthocephala. En total, hasta ahora se han descrito más de 340 especies de helmintos como parásitos de humanos. Los helmintos con alta relevancia médica se encuentran principalmente entre los trematodos, cestodos y nematodos.

Los ciclos biológicos de las especies parásitas que afectan al ser humano pueden ser de dos tipos, bien directo o monoxeno, en el que interviene un único hospedador; bien indirecto o heteroxeno, donde participan varios hospedadores. En los casos de heteroxenia, en cada uno de los hospedadores tendrá lugar una fase de vida propia del parásito. Debido a esta gran diversidad, el ciclo puede tardar desde días a semanas en completarse, en algunos casos debido a la intervención necesaria de varios hospedadores intermediarios, o en los casos de monoxenia, debido a que se necesita de la maduración en el suelo de la forma infectante como es el caso de los geohelmintos (Gállego, 2007).

Las infecciones helmínticas no causan necesariamente una enfermedad. Así, mientras las infecciones con adultos de *Taenia saginata* generalmente son clínicamente inaparentes, los estadios larvarios de *Taenia solium* en el cerebro pueden causar una enfermedad potencialmente mortal. Las infecciones con *Enterobius vermicularis* inducen solo síntomas clínicos débiles (prurito anal), pero la ingestión de carne cruda o poco cocida que contiene unas pocas larvas de *Trichinella* puede causar síntomas clínicos graves, por multiplicación del parásito en el hospedador, como diarrea, fiebre, dolor muscular e incluso parada respiratoria (Auer & Aspöck, 2014).

Los seres humanos pueden desempeñar el papel de hospedadores definitivos, intermediarios o erráticos dentro del ciclo de vida de un helminto, los humanos actúan como hospedadores definitivos, por ejemplo, de la *Taenia saginata*, que se localiza como verme adulto en el intestino delgado; pueden actuar como hospedadores intermediarios de *Echinococcus granulosus* o *E. multilocularis*. En el caso de *Toxocara canis*, los humanos actúan como hospedadores erráticos; la ingestión accidental de los huevos infectantes de *T. canis* a través de manos, agua o suelo contaminados no causan ningún síntoma clínico en la mayoría de las infecciones, aunque algunas personas pueden sufrir el síndrome de larva migrans visceral, síndrome de larva migratoria ocular y toxocarosis cerebral (Krauss *et al.*, 2004).

Los helmintos pueden acceder a los humanos de varias maneras: por ingestión de alimentos que contengan la forma infectante poco cocidos o crudos: plantas acuáticas (*Fasciola hepatica*), carne (*T. saginata*), cangrejos (*Paragonimus* spp.); agua contaminada sin hervir (*Dracunculus medinensis*); manos sucias (*E. granulosus*); por penetración activa de la piel por larvas de vida libre (anquilostomas o *Strongyloides stercoralis*); o por transmisión pasiva de larvas por vectores insectos (*Wuchereria bancrofti*). Numerosos parásitos helmínticos se transmiten de persona a persona (*E. vermicularis*, *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*) directa o indirectamente y, además, un número considerable de helmintos de animales son transmisibles a humanos (*T. saginata*, *T. canis*, etc.) causando enfermedades llamadas helmintozoonosis (Krauss *et al.*, 2004).

En la Tabla 1 se muestran las especies de helmintos gastrointestinales más prevalentes en humanos y la ruta de infección, así como la forma infectante para el humano.

Tabla 1.- Especies de nematodos gastrointestinales más comunes en humanos. Detalle de la forma infectante, ruta de infección y nicho intestinal (Adaptada de Grecis, 2015).

Especie	Ruta de infección	Forma infectante	Nicho intestinal
<i>Ascaris lumbricoides</i>	Oral	Huevos	Intestino delgado, lumen
<i>Necator americanus</i>	Transcutánea	Larva L3	Intestino delgado, lumen
<i>Ancylostoma duodenale</i>	Oral y Transcutánea	Larva L3	Intestino delgado, lumen
<i>Trichuris trichura</i>	Oral	Huevos	Intestino grueso, epitelio
<i>Strongyloides stercoralis</i>	Transcutánea	Larva L3	Intestino delgado, submucosa

Los órganos diana de los helmintos en humanos son muy variados: intestino (delgado o grueso), pulmones, hígado, cerebro, piel... Además del microhábitat de parasitación característico, pueden producirse complicaciones a causa de las migraciones complejas a otros órganos que no son los habituales (Gállego, 2007).

Las condiciones ambientales intervienen de manera decisiva en la transmisión en la mayoría de los casos. Los climas tropicales y subtropicales, por ejemplo, permiten el correcto desarrollo y mantenimiento de las formas de resistencia y la interacción entre parásito y hospedador. Debido a la complejidad de los ciclos y para asegurar la propagación de la especie, se liberan diariamente grandes cantidades de formas de resistencia al medio ambiente, ya que la probabilidad de que todas las condiciones nombradas anteriormente se den con éxito es baja o incluso nula en algunas ocasiones (OMS, 2011).

1.2. IMPORTANCIA DE LAS HELMINTIASIS EN SALUD PÚBLICA

Muchas de las parasitosis humanas causadas por helmintos se encuentran incluidas dentro del grupo denominado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como enfermedades desatendidas u olvidadas, “Neglected Tropical Diseases” (NTDs), y cuya distribución geográfica y número de afectados es muy variable (Figura 1).

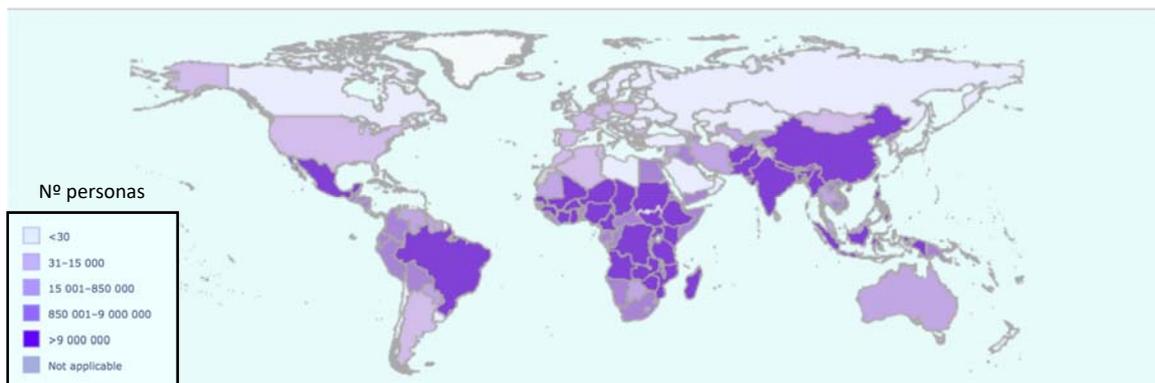


Figura 1.- Distribución de las NTDs (Fuente: gamapserver.who.in, 2015).

La mayoría de estas enfermedades se relacionan con la pobreza y con medidas higiénico-sanitarias deficitarias. Se dan mayoritariamente en zonas rurales, suburbios urbanos o zonas en conflicto. Al mismo tiempo, estas infecciones obstaculizan la salida de la situación de pobreza de los países afectados, ya que impiden un correcto desarrollo físico e intelectual de la población infantil, así como la productividad de los adultos.

Según la OMS hay un total de 20 enfermedades parasitarias englobadas en este grupo, de las cuales 9 son causadas por helmintos. Se estima que 1,4 billones de personas están afectadas por ellas, incluyendo 800 millones de niños, de los cuales 300 millones sufren alguna incapacidad severa o permanente, y causan 500.000 muertes al año (Shuford *et al.*, 2016).

La distribución y prevalencia de las enfermedades parasitarias causadas por helmintos, en su mayoría están condicionadas por la climatología, coincidiendo con los climas más templados, pero son especialmente prevalentes en países con niveles socioeconómicos bajos o muy bajos, de forma general.

En 2012 se confirmaron 301 casos humanos de trichinelosis en Europa, aunque estos datos varían en función de los países miembros según muestra el mapa de notificaciones (Figura 2).

En España la puerta de entrada de las helmintiasis es desde países endémicos por viajes a países tropicales y subtropicales. Según un estudio realizado en el hospital Ramón y Cajal de Madrid, el 15% de las infecciones importadas son helmintiasis (Vázquez-López *et al.*, 2013).

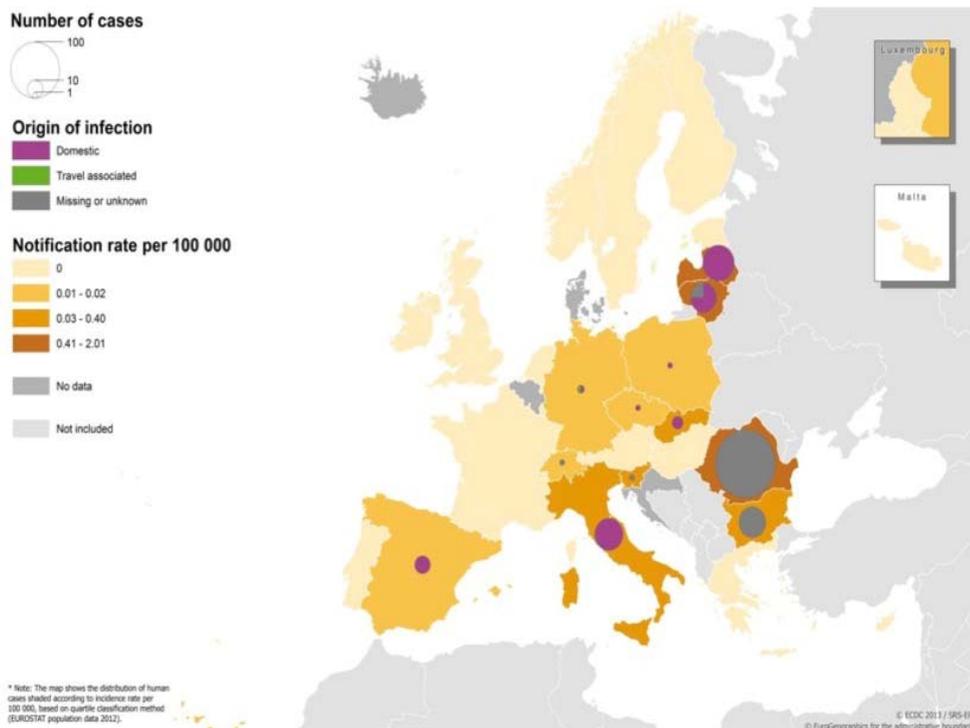


Figura 2.- Distribución de casos humanos de trichinelosis según el número de casos por cada 100.000 habitantes (EUROSTAT population data, 2012).

Además de la importancia sanitaria de las helmintiasis humanas y el carácter zoonótico de muchas de ellas, existe una serie de afecciones del ganado, provocadas principalmente por nematodos, con gran interés veterinario por sus altas prevalencias y repercusiones económicas.

Las helmintiasis gastrointestinales del ganado se encuentran distribuidas ampliamente. Entre los géneros de nematodos más importantes a nivel ganadero cabe destacar: *Trichostrongylus*, *Ostertagia*, *Teladorsagia*, *Haemonchus*, *Oesophagostomum*, *Cooperia*, *Nematodirus*, *Strongylus*, *Strongyloides*, *Ancylostoma*, *Bunostomu*, *Globocephalus*, *Oxyurus*, *Ascaris*, *Trichiuris*, *Protostrongylus*, *Skrabinema*; parásitas todas ellas del intestino y/o abomaso (cuarto estómago) de diferentes rumiantes. En cuanto a las especies pulmonares destacan los géneros *Dictyocaulus*, *Metastrongylus*, *Protostrongylus*.

Los animales afectados por helmintos intestinales sufren alteraciones gastrointestinales con una gran variedad de signos clínicos, desde una ligera disminución de la ganancia de peso, hasta hipoproteinemias severas, anemias, daño de la pared gástrica e intestinal e incluso la muerte (Caracostantogolo *et al.*, 2012). La desnutrición asociada a estas parasitosis, provoca un alargamiento del periodo necesario para alcanzar el peso establecido por el mercado para la venta de las reses y, junto con la muerte de ganado joven, aumentan los costes de producción, lo cual se traduce en una pérdida para el productor. De la misma forma, la producción de leche y de lana se ven afectadas negativamente (Angulo-Cubillán, 2005).

Además, hay que destacar el efecto indirecto de la parasitación sobre la reproducción, ya que el ganado altamente parasitado y desnutrido presenta un retraso en alcanzar la madurez sexual. Adicionalmente, las hembras gestantes son más vulnerables a la infección por parásitos y

a la reactivación de larvas latentes debido a la inmunosupresión gestacional, lo cual afectará al peso de la cría que será inferior a lo esperado (Angulo-Cubillán, 2005).

De modo aproximado, se estiman pérdidas de productividad de unos 1.200 millones de euros al año, a los que hay que sumar los gastos de los tratamientos antiparasitarios que rondan los 1.000 millones de euros anuales (Zajaz, 2006). En países con climas más propicios para la parasitación y que poseen además un alto número de explotaciones ganaderas como ocurre en América Latina se estima una pérdida de cría en ovinos entre un 20% y un 70% (Suárez, 2007; Molento, 2013; Grisi *et al.*, 2014). Estudios en países europeos como es el caso de Reino Unido se demostró una presencia del 100% del parásito *Teladorsagia circumcincta* en explotaciones de todo el país (Burgess *et al.*, 2012).

El control de las helmintiasis gastrointestinales supondría una disminución de las formas infectantes en el ambiente y con ello, una reducción del riesgo de transmisión a los animales. Entre las principales causas que favorecen las helmintiasis y que hacen necesarias unas estrategias de control integrado, figuran: crianza de animales jóvenes en pastos con formas parásitas infectantes; hacinamiento de animales; alimentación insuficiente; condiciones ambientales adecuadas para el desarrollo de las especies parasitarias más patógenas; uso inadecuado de antiparasitarios incluyendo tratamiento en masa, sin diagnóstico previo; selección y dispersión de poblaciones de parásitos resistentes y ausencia de soporte técnico (Suárez, 2007).

1.3. PARÁSITO MODELO: *Aspiculuris tetraptera*

Para el presente trabajo se ha elegido al helminto *Aspiculuris tetraptera* como modelo de infección por nematodos intestinales.

Se trata de un nematodo parásito de roedores, habitual del ratón común, tanto salvaje como estabulado, con ciclo de vida directo o monoxeno, por tanto, no depende de un hospedador intermediario para completar su evolución. Este hecho facilita la infección experimental al no necesitar de hospedadores intermediarios

La clasificación sistemática de *A. tetraptera* es la siguiente:

Reino: *Animalia* (Linnaeus, 1758)

Subreino: *Eumetazoa* (Bütschli, 1910)

Phylum: *Nematoda* (Diesing, 1861)

Orden: *Rhabditida* (Chitwood, 1933)

Súper Familia: *Oxyuridea* (Cobbold, 1864)

Familia: *Heteroxynematidae* (Skrjabin y Shikhobalova, 1948)

Género: *Aspiculuris* (Nitzsch, 1821)

Especie: *Aspiculuris tetraptera*
(Nitzsch, 1821)

A. tetraptera fue descrito por Nitzsch (1821) como parásito de *Mus musculus*. En 1927, Schultz demostró que los ratones de campo y los animales domésticos no eran parasitados por la misma especie, y basándose en pequeños rasgos morfológicos dio nombre a una nueva especie *A. dinniki*. Además de estas dos especies dentro del género *Aspiculuris* se encuentra *A. americana* (Erickson, 1938) y *A. africana* (Quentin, 1966) y más recientemente se ha descrito la especie *A. tianjinensis* (Liu *et al.*, 2012). En la figura 3, se presentan las diferentes especies de *Aspiculuris* descritas indicando la especie hospedadora tras su análisis filogenético.

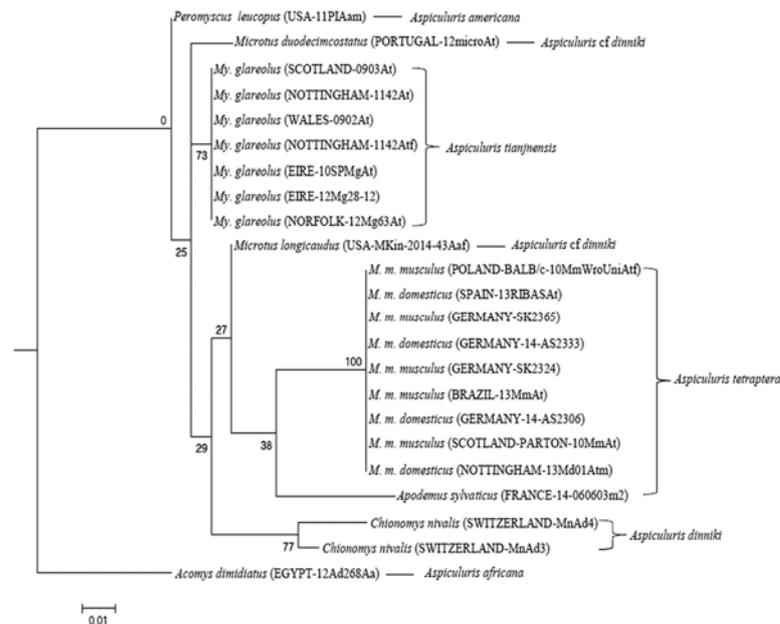


Figura 3.- Árbol filogenético de las especies de múridos domésticos y de campo basado en el gen mitocondrial del citocromo oxidasa 1 (CO1) después del análisis de máxima verosimilitud con 100 réplicas de arranque implementadas a través del paquete RaXML con las especies de *Aspiculuris* que los parasitan. Las puntuaciones en los nodos representan el soporte de arranque para ese nodo. La barra de escala es proporcional a la distancia genética en sustituciones por sitio (Behnke *et al.*, 2015).

El ciclo biológico de *A. tetraptera* consta de 3 fases larvarias y una fase adulta con machos y hembras diferenciados (Anya, 1966) (Figura 4). Los machos tienen un único juego de cromosomas (haploides) por lo que se desarrollan a partir de huevos no fecundados; las hembras, sin embargo, son diploides, y surgirán a partir de huevos fecundados por la coexistencia de machos y hembras (Adamson, 1984).

Después de la ingestión de los huevos por parte del hospedador, estos eclosionan en el duodeno liberando el primer estadio o larva (L1), las cuales descienden hasta la primera porción del colon y se anclan a la mucosa (Figura 4). Durante un periodo de 7 días, las larvas entran en contacto estrecho con los tejidos del hospedador donde evolucionan al estadio L2. Durante el estadio L2, invaden las criptas del colon donde se desarrollan las larvas L3 para volver al lumen colónico, donde evolucionarán hasta dar lugar a los adultos tras 8-10 días (Philipot *et al.*, 1924).

Las hembras serán grávidas a los 24 días post infección (d.p.i.) y comenzará la puesta de huevos, completándose el periodo prepatente (Derothe *et al.*, 1997).

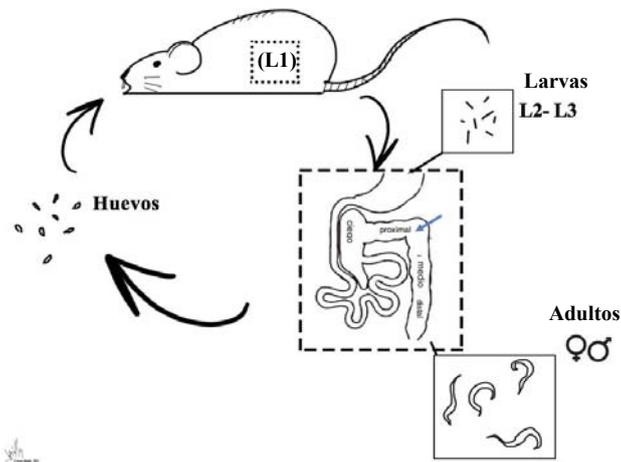


Figura 4.- Ciclo de vida de *A. tetraptera*. Estadios evolutivos.

A los 40 días de vida los nematodos han alcanzado su tamaño máximo; los machos adultos miden 3 mm de longitud y 0,1 mm de diámetro mientras que las hembras miden 4,5 mm de longitud y, dependiendo del número de unidades de huevos en las vías sexuales, su diámetro varía entre 0,12 y 0,18 mm. En una infección natural el número de hembras siempre es superior al de los machos. El tiempo de vida media de los machos es de 65 días, en cambio las hembras son capaces de sobrevivir 90 días (Neuser, 1974).

Machos y hembras poseen aletas cefálicas cortadas (Figura 5); un esófago con bulbo, de mayor tamaño en hembras que en machos, con anillo nervioso y poro excretor. El macho tiene doce papilas caudales con espícula y ausencia de gobernáculo. En la hembra la vulva se encuentra a 1,1 mm de la parte anterior (Maghales *et al.*, 2003).

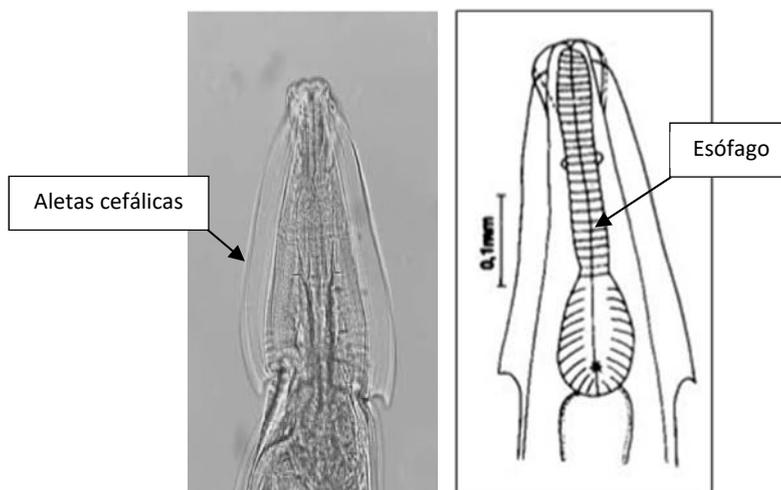


Figura 5.- Porción anterior donde se observan las aletas cefálicas y esófago del macho adulto de *A. tetraptera* fotografiado a 250x (Baker, 2007) y dibujo (Neuser, 1974).

Los huevos de *A. tetraptera* son elipsoidales (Figura 6), midiendo de 70 a 98 μm de largo y de 30 a 50 μm de ancho (Thienpont *et al.*, 1990). El huevo está protegido por cinco envolturas. La capa lipídica interna tiene 40 nm de espesor y contiene tanto lípidos como proteínas.

Los huevos son incoloros cuando se obtienen directamente de las hembras fecundadas y marrones cuando se extraen de las heces. Estos huevos embrionarán en un máximo de 10 días en condiciones medioambientales adecuadas y darán lugar a los huevos infectantes (Neuser, 1974).

En 1924, Philipot ya describió un rápido desarrollo de los huevos en el exterior y observó movimiento de los embriones en el interior de los huevos después de 68h a 22°C y después de 20h a 27°C. Entre 5 y 7 días, a una temperatura de 25°C, los huevos son infectantes para los ratones. El desarrollo de las etapas depende de la humedad, el oxígeno, y que el intervalo de temperatura sea el adecuado, entre 20 y 30°C. Temperaturas más altas conducen a una reducción en el número de huevos infectantes (Anya, 1966). Los huevos pueden sobrevivir durante un largo periodo a temperatura ambiente.

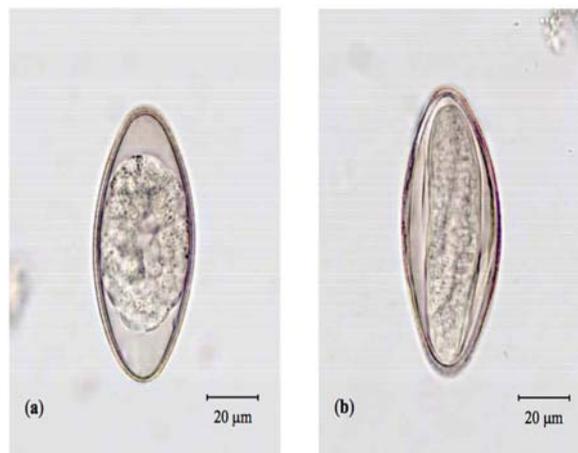


Figura 6.- Características morfológicas del huevo de *A. tetraptera* y fases de la embrionación del huevo. a) Huevo con mórula tras la puesta; b) Huevo infectante con larva L1 en su interior (Baker, 2007).

1.4. RESPUESTA INMUNITARIA ASOCIADA A LAS NEMATODOSIS

A pesar de ser un grupo muy heterogéneo en cuanto a biología y localización en el hospedador, la mayoría de las helmintiasis inducen respuestas adaptativas similares, caracterizadas por producción de anticuerpos, con predominio del isotipo IgE y eosinofilia. Normalmente estas respuestas son lentas y suelen acompañarse de una respuesta con un gran carácter T regulador (van Riet *et al.*, 2007; Jackson *et al.*, 2008; Solano-Parada, 2010). Estudios anteriores han demostrado que la capacidad de expulsión de nematodos está mediada por la actividad de los linfocitos T cooperadores o “T helpers” (Th) CD4+ mediante la secreción de citoquinas que impulsan la producción de anticuerpos (Vallance *et al.*, 1999; Tuner *et al.*, 2013; Oliphant *et al.*, 2014).

Los primeros estudios sobre la polarización de la respuesta inmunitaria frente a los agentes infecciosos (Mosmann *et al.*, 1986) expusieron el paradigma de que la respuesta inmunitaria estaba mediada por dos posibles subpoblaciones de linfocitos T cooperadores, Th1 y Th2 según los perfiles de las citoquinas implicadas, siendo las relacionadas con la respuesta Th1, tales como IL-1 o IFN- γ , efectivas frente a organismos intracelulares; y las relacionadas con la respuesta Th2 (IL-4, IL-5 e IL-13) frente a patógenos extracelulares. Recientemente, otros tipos de respuesta Th han sido añadidos al binomio inicial, tales como Treg, Th9, Tfh y Th17 (Figura 7).

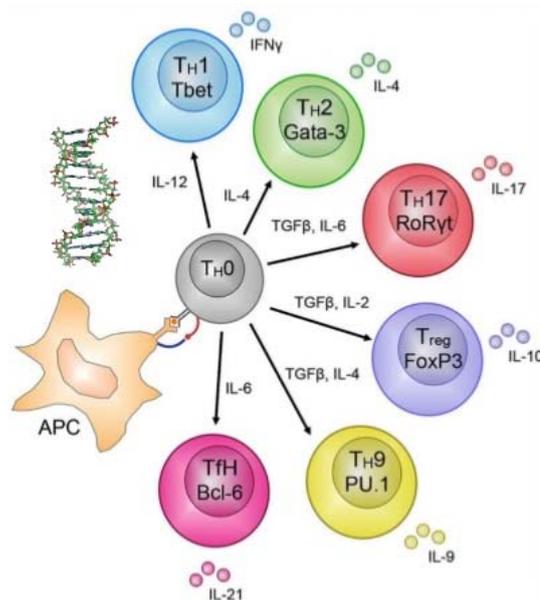


Figura 7.- Esquema de vías de diferenciación a partir de T cooperador nativo (Th0) (Russ *et al.*, 2013).

La respuesta inmunológica del hospedador tras la infección con nematodos, ha sido asociada a la activación de los linfocitos Th2 al detectarse un aumento en la concentración de IL-4, IL-5 e IL-13 (Cooper *et al.*, 1991; Faulker *et al.*, 2002) y un aumento de mastocitos tisulares y eosinófilos (Ottessen *et al.*, 1985). Muchos de estos ensayos han demostrado dicha respuesta Th2 con inducción de mastocitosis en la mucosa intestinal, así como eosinofilia y aumento de IgE

en suero (Else & Grecis 1991), por lo que la respuesta inmunitaria local puede tener un papel importante en la expulsión de los nematodos intestinales.

La expresión de la interleuquina IL-4 secundaria asociada a Th2 frente a *Trichinella spiralis* ha demostrado su capacidad de eliminación del parásito (Pond *et al.*, 1989; Kopf *et al.*, 1993). Además, como consecuencia de la activación de la IL-9, aumenta la interleuquina IL-13 de la cual se ha demostrado su capacidad de intervención en el aumento del peristaltismo intestinal, pudiendo colaborar en la expulsión (Gronke & Diefenbach, 2016).

En el trabajo de Hepworth & Grecis (2009), se analizaron las variaciones en la respuesta inmunitaria provocada por una infección experimental con *Trichuris muris*, en función del género y la cepa de ratón empleada. Según este estudio, la resistencia que ofrecen a la infección depende del género del hospedador, tanto en ratones normales, como en ratones knock-out (KO), modificados por ingeniería genética, para IL-4 (Figura 8).

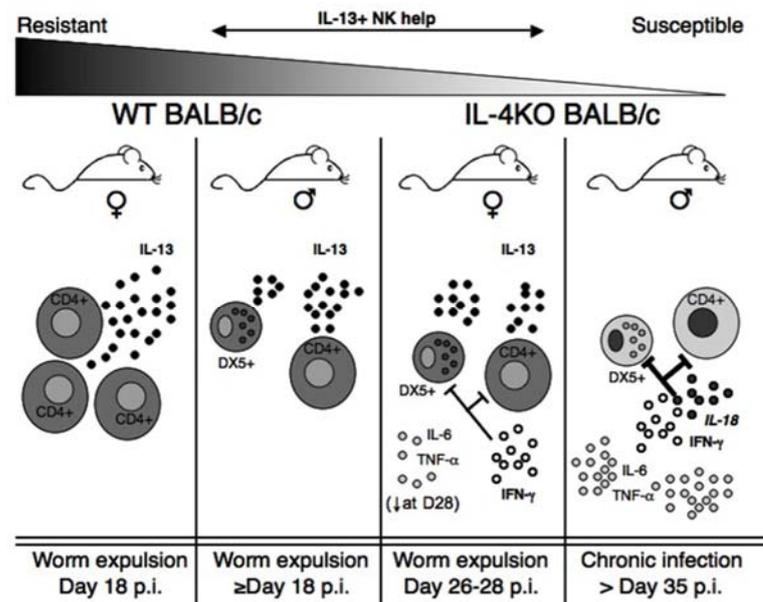


Figura 8.- Variaciones en la respuesta inmunitaria dependiendo del género y la cepa de ratón infectados con *Trichuris muris* (Hepworth & Grecis, 2009).

Los ratones Balb/c de la cepa salvaje (WT) hembra son altamente resistentes y expulsan al parásito tras una respuesta Th2 rápida y eficiente a los 18 días post-infección, mientras que los ratones machos exhibieron una expulsión retardada. Los ratones hembra IL-4KO también son más resistentes a *T. muris* que los machos, a pesar de los altos niveles de IFN- γ , aunque la expulsión de los gusanos adultos se retrasa en comparación con las hembras normales. Esta expulsión tardía del nematodo se asocia tanto a las células T productoras de IL-13 como a las células NK (DX5+) y a una reducción simultánea de los niveles de citoquinas proinflamatorias el día 28 post-infección.

Los ratones IL-4KO BALB/c macho son susceptibles a la infección por helmintos y desarrollan infecciones crónicas asociadas con altos niveles de IFN- γ , IL-6 y TNF- α . Estos datos sugieren una interacción compleja entre el género del hospedador y el desarrollo de respuestas inmunitarias en entornos normales o alterados.

La respuesta Th2 no solo está relacionada con la protección sino también con la regeneración de los tejidos del hospedador por su relación con los macrófagos activados por las interleuquinas IL-4 e IL-13, los cuales producen factores que ayudan a la regeneración celular. Además, cabe destacar la función de IL-5, cuya principal función es la activación de los eosinófilos, que contienen una proteasa básica en sus gránulos que atacará el tegumento de los helmintos de forma eficaz (Anthony *et al.*, 2007).

La IL-13 desempeña una función protectora clave en muchas infecciones por helmintos, en particular, participa en la expulsión de los parásitos del intestino al provocar contracciones peristálticas por mediación de las células Tuft (Gronke & Diefenbach, 2016) que expresan altos niveles de IL-25 (Figura 9). El estudio realizado por Fallon *et al.* (2006) con *Nocardia brasiliensis* indica la función de la IL-25 en la inducción de la expulsión del gusano, incluso en ausencia de células T. Aunque normalmente se requieren células T para la expulsión de los gusanos, el tratamiento con IL-25 exógena puede llegar a sustituir a estas células. El mecanismo de eliminación del helminto es claramente dependiente de las citoquinas tipo 2. Las funciones efectoras tipo 2 se observan tras la administración de IL-25, incluyendo la inflamación y la producción de moco.

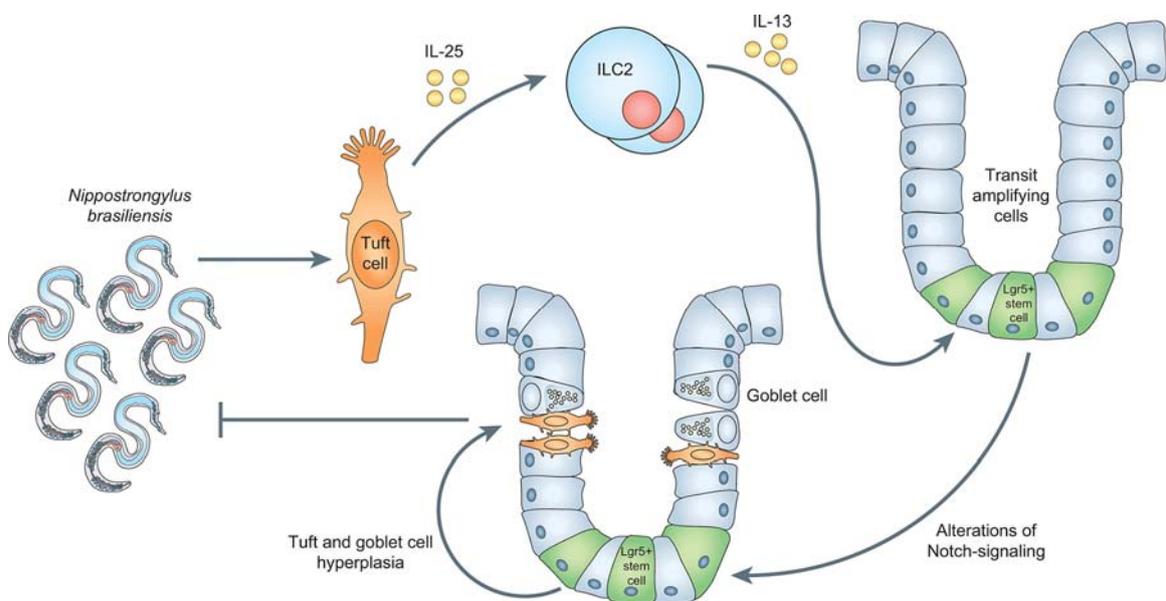


Figura 9.- Las células Tuft expresan altos niveles de IL-25 que modulan una respuesta Th2 con la liberación de IL-13 que favorece la diferenciación de células epiteliales progenitoras de células de Goblet y células Tuft (Gronke & Diefenbach, 2016).

Aunque se ha demostrado que la función de IL-4 en la eliminación de los nematodos es crucial, parece no ser la única responsable de la expulsión. Como ya se ha comentado anteriormente, en los últimos años se han descubierto nuevas células T cooperadoras (Th) que han sido denominadas Th17, Th9, Th22, Tfh (Crotty, 2011; Russ *et al.*, 2013) y ThGM (Zhang *et al.*, 2013).

En células dendríticas se han propuesto tres posibles escenarios de diferenciación a Th2 en infecciones por helmintos. En el primer escenario (Figura 10A) el antígeno es presentado

por las células dendríticas a células T CD4+ específicas. La baja avididad (fuerza de enlaces) en las interacciones entre las células T CD4+ y las células dendríticas da como resultado una respuesta Th2; en cambio una alta avididad en la interacción, desvía la respuesta a Th1 o Th17. El segundo modelo propone que las células dendríticas condicionadas por las citoquinas o por la respuesta innata inducidas por el parásito, o bien condicionadas directamente por los productos de excreción/secreción del parásito, adquieren la habilidad de polarizar la respuesta a Th2. (Figura 10B). Las respuestas Th1 o Th17 serían iniciadas por las células dendríticas condicionadas por otras respuestas innatas. Por último, en el tercer modelo propuesto (Figura 10C) un subconjunto de células dendríticas específicas, capaz de captar material del parásito, es programado para generar una respuesta inmune Th2, mientras que la activación de otras respuestas requiere otras subpoblaciones de células dendríticas.

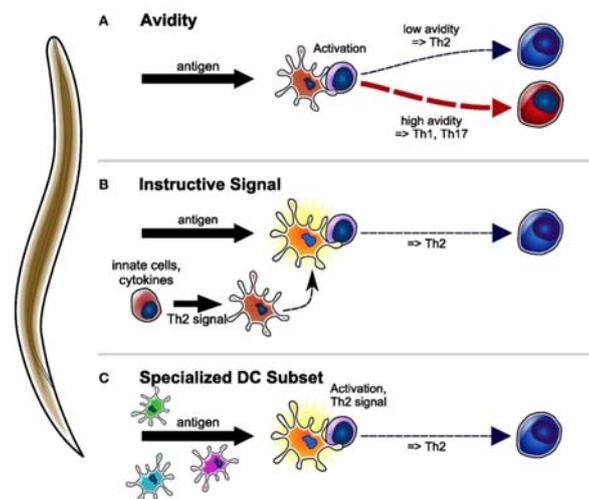


Figura 10.- Proposición de tres posibles escenarios de la diferenciación de Th2 inducida por antígenos de helmintos, presentados por células dendríticas (Bouchery *et al.*, 2014).

Si centramos nuestra atención en la respuesta denominada Th17, la diferenciación de los linfocitos a Th17 está mediada por citoquinas tales como TGF- β , IL-1 β , IL-6, IL-21 e IL-23 (Korn *et al.*, 2009; Sutton *et al.*, 2009; Hirahara *et al.*, 2010). Asimismo, este grupo de células T cooperadoras son capaces de secretar IL-17, IL-21 e IL-22, interleuquinas con propiedades proinflamatorias.

Th17 se identificó en 2005 como un subconjunto de células distinto de las resultantes de la diferenciación a Th1/Th2 por Harrington y colaboradores, en un estudio basado en la producción celular de IL-17 en ausencia de IFN- γ o IL-4. Estas células se consideran proinflamatorias, ya que expresan altos niveles de IL-17, así como IL-22, bajo el control del factor de transcripción ROR γ t. Las combinaciones de IL-23, TGF- β , IL-6 e IL-21 dirigen la diferenciación de las células T CD4+ nativas a células Th17 (Quintaja *et al.*, 2008).

El papel de Th17 en la infección por helmintos se ha estudiado principalmente en modelos experimentales con el trematodo *Schistosoma mansoni* (Philips *et al.*, 1978; Mathew *et al.*, 1986) y en *Angiostrongylus costaricensis* donde la respuesta inmunitaria en mucosas donde se induce la respuesta inmunitaria debido a la localización de los huevos. Por otro lado, en el modelo de *Echinostoma caproni*, se ha descrito que este parásito establece una infección

crónica en ratones mientras que en ratas se establece una infección aguda, ya que son capaces de expulsar los helmintos tras 4 semanas de infección. En ratas, las citoquinas IL-17, IL-23 y TGF- β de la familia Th17 fueron reguladas positivamente, pero no en ratones, lo que sugiere que la activación de la respuesta Th17 puede tener efectos protectores en este modelo a nivel sistémico (Sotillo *et al.*, 2011).

Hasta la fecha, sólo unos pocos estudios han intentado abordar el papel de la respuesta denominada Th22 y la interleuquina IL-22 en el contexto de la infección por helmintos. La IL-22 está regulada positivamente en la mucosa intestinal en humanos después de la infección por *Trichuris trichuria* o *Necator americanus* (Broadhurst *et al.*, 2010; Gaze *et al.*, 2012; McSorley *et al.*, 2012). Mientras que la infección por helmintos induce claramente la IL-22, hasta ahora no se ha demostrado ningún papel para la respuesta Th22 ni en la protección, ni en la patología inmunitaria. De hecho, los ratones deficientes en IL-22 infectados con *Schistosoma mansoni* no presentaron respuestas inmunitarias significativamente modificadas en comparación con los controles de tipo salvaje, tampoco la ausencia de IL-22 modificó el establecimiento del parásito o el desarrollo de la patología (Wilson *et al.*, 2010). Pero en ensayos realizados por Turner *et al.* 2012 se demostró como la producción de IL-22 producida por las células Th17, interviene en funciones epiteliales fundamentales para la expulsión del parásito, en este caso *Trichuris muris*, como la producción de mucinas y de péptidos antimicrobianos procedentes de las células caliciformes.

La interleuquina 9 (IL-9) se asoció originalmente con la respuesta tipo Th2, en estudios que describían que la expresión de IL-9 por las células T CD4+ era alta en ratones BALB/c susceptibles a ser infectados con *Leishmania major* (Gessner *et al.*, 1993). La implicación de la IL-9 en la inmunidad protectora del hospedador contra la infección intestinal por nematodos fue confirmada unos pocos años después (Faulkner *et al.*, 1997, 1998). Trabajos recientes han demostrado que la expresión de IL-9 proviene de otro subtipo Th, llamado Th9. Sin embargo, también se ha demostrado que las células Th17 y Treg también son productoras de una cantidad detectable de IL-9 (Staudt *et al.*, 2010). El estado de Th9 como un subconjunto Th se ha fortalecido aún más tras el descubrimiento de que IL-4 y TGF- β facilitan la diferenciación a Th9 (Veldhoen *et al.*, 2008). Es importante señalar que, aunque Th9 se considera un subconjunto distinto, su proximidad a las células Th2 se refuerza tanto por la demostración de que IL-4 es necesaria para diferenciar las células Th0 en Th9, como por la observación de la interconversión de Th2 en Th9 en presencia de TGF- β (Veldhoen *et al.*, 2008).

El papel de la IL-9 en la infección por helmintos ha sido estudiado en dos trabajos consecutivos que muestran que los ratones C57BL/6 transgénicos que sobreexpresaban IL-9 infectados con *Trichuris muris* o *Trichinella spiralis* tuvieron una respuesta Th2 aumentada y una expulsión más rápida del parásito desde el intestino, sin que hubiese detección de anticuerpos en suero (Faulkner *et al.*, 1997, 1998). En estos estudios, el aumento del número de mastocitos y de eosinófilos se correlacionó con el aumento de los niveles de IL-9 y un aumento de la contractilidad del músculo del yeyuno. Sin embargo, estudios adicionales mostraron que los ratones vacunados con el complejo IL-9-OVA (IL-9 acompañado de ovoalbúmina) reclutaron un número similar de mastocitos y eosinófilos en el intestino de ratones infectados con *T. muris*, aunque el tratamiento inhibió la expulsión del parásito (Richard *et al.*, 2000). Por el contrario, la vacunación con el complejo IL-9-OVA facilitó la expulsión de *T. spiralis*, lo que ilustra que a pesar

de la asociación general de inmunidad tipo 2 con helmintos, la efectividad de cada subtipo se ajusta a las especies parásitas involucradas (Khan *et al.*, 2003).

Más recientemente, se ha demostrado que la IL-9 es producida por células T durante la infección por *N. brasiliensis* (Licona-Limón *et al.*, 2013; Turner *et al.*, 2013). La transferencia adoptiva de células Th9 demuestra ser suficiente como para mediar en la expulsión de los helmintos (Licona-Limón *et al.*, 2013). Sin embargo, la alta variabilidad experimental y los tiempos estudiados indican que se necesita más trabajo para determinar el papel de IL-9 (Turner *et al.*, 2013).

Teniendo en cuenta que todos los subconjuntos de T cooperadores conocidos hasta la fecha se han observado durante las infecciones por helmintos, y que estos diferentes subconjuntos contribuyen de diversas maneras a la protección, cicatrización, susceptibilidad o inmunopatología, se ha propuesto que la respuesta inmunitaria frente a los helmintos se puede resumir como un mapa 2D que condensa lo que es sabido sobre las contribuciones directas de los subconjuntos y su regulación cruzada el uno del otro. El mapa 2D está definido por un eje horizontal de susceptibilidad-cronicidad/protección y un eje vertical de patología/control de daños (Figura 11). Este modelo demuestra una mejor comprensión de las respuestas inmunitarias equilibradas durante la infección por helmintos.

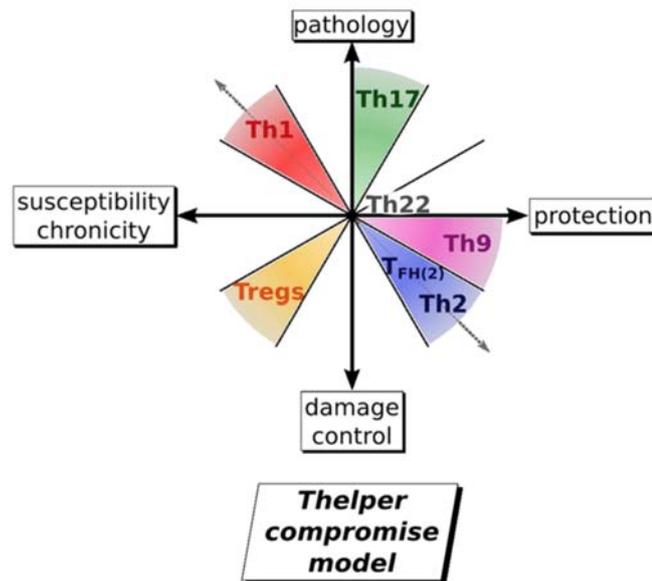


Figura 11.- Evolución de los Th ante una infección por helmintos y su relación con la evolución de la infección y los daños en el hospedador (Bouchery *et al.*, 2014).

Para una respuesta óptima contra un helminto, el hospedador ha de reaccionar incrementando la respuesta Th2/Th9 y con una respuesta de T reguladores baja y una respuesta Th1/Th17 casi inexistente. El brazo Th2 de la respuesta inmunitaria protege contra helmintos mediante la liberación de interleuquinas, eosinófilos, mastocitos y basófilos, todos ellos involucrados en la expulsión del parásito, o mediante la activación de macrófagos. La respuesta Th9 protege al aumentar la hiperplasia de las células secretoras de moco y la contractilidad

muscular en el intestino. La patología inducida por Th17 es principalmente mediada por neutrófilos y macrófagos inflamatorios. Por el contrario, la activación de la respuesta mediada por Tregs induce el desarrollo de macrófagos reguladores, que controlan la patología (Papadakis, 2004; Bouchery *et al.*, 2014).

1.5. MECANISMOS DE EVASIÓN INMUNITARIA

Los nematodos intestinales son capaces de modular o evadir la respuesta inmunitaria del hospedador al que parasitan para evitar su expulsión, garantizar su supervivencia y continuar el ciclo de vida. Actualmente, se relaciona el aumento de enfermedades autoinmunes y el desarrollo de alergias en países desarrollados, con el descenso de infecciones por microorganismos y algunos nematodos. Esto es debido a la modulación de la infección por parásitos, desde una respuesta Th1 primaria a una respuesta Th9 (Papadakis, 2004).

Los nematodos modulan la respuesta inmunitaria del hospedador llegando a vivir en él durante largos periodos de tiempo, como es el caso de *Necator americanus* capaz de sobrevivir entre 15-17 años (Timothy *et al.*, 1993) u *Onchocerca volvulus* que se mantiene en el hospedador hasta 18 años (Roberts *et al.*, 1967; Plaisier, 1991).

Los mecanismos de evasión del sistema inmunitario que a día de hoy se conocen se pueden resumir en:

- *Enzimas antioxidantes*: estas enzimas se encuentran en los nematodos en concentraciones mayores que en los hospedadores, por lo que podrían utilizarlas para protegerse de los radicales libres provocados por la respuesta inmunitaria del hospedador (Callahan *et al.*, 1998). La enzima que se ha descrito en cantidades más elevadas en helmintos ha sido la superóxido dismutasa (Rhoads *et al.*, 1983; Sánchez-Moreno *et al.*, 1994, 1996). También se han encontrado estas enzimas en los productos de excreción/secreción de *Echinostoma caproni* (Cortés *et al.*, 2017) y en *Fasciola hepática*, tras el daño hepático, se ve un aumento de dichos enzimas en hígado para reparar el daño oxidativo (Kolodziejczyk *et al.*, 2005).
- *Recolocación en los tejidos*: una separación del tejido y posterior recolocación del parásito en un nuevo sitio puede ser una buena solución, al menos temporal, para evitar la respuesta inmunitaria local del hospedador (Timothy *et al.*, 1993).
- *Mimetismo molecular*: el parásito puede sufrir una evolución paralela con el hospedador, creando una similitud antigénica entre los dos que haría que la respuesta del hospedador fuese menor y se pudiese llegar a la cronicidad. Una muestra de ello es el caso estudiado por Lillywhite *et al.* (1995) donde se describe que *Trichuris muris* es capaz de secretar una molécula de 47kDa similar al INF- γ , capaz de cronificar la infección al desviar la respuesta inmunitaria correcta por parte del hospedador.

- *Inmunomodulación*: los productos de excreción/secreción del parásito pueden modular la respuesta del hospedador para ejercer una respuesta protectora, como en el caso de *Ascaris* que libera proteínas capaces de detener las respuestas Th1 y Th2 (Faquim-Mauro & Macedo, 1998); y no sólo podrán suprimir respuestas, sino también activar a las células T reguladoras, que permitirían el equilibrio entre parásito y hospedador. Más recientemente, se ha estudiado el papel en la comunicación parásito-hospedador de los productos de excreción/secreción y de las vesículas extracelulares que contienen proteínas con demostrado carácter inmunomodulador (Marcilla *et al.*, 2012; Trelis *et al.*, 2016).

Por tanto, es importante conocer los mecanismos de supervivencia de los nematodos, con el objeto de definir nuevas dianas terapéuticas para tratamiento o prevención. En el marco de la profilaxis, las vacunas más comunes, se basan en la resistencia natural del hospedador ante la infección, exponiendo al hospedador a un reconocimiento de los antígenos más inmunógenos del parásito y consiguiendo una respuesta secundaria ante la parasitación, si ésta tuviese lugar. Este mecanismo ha sido continuamente utilizado, pero hay que resaltar que, en el caso de los nematodos, esta inmunidad adquirida es débil y hasta la fecha, en el hospedador no se alcanzan los valores de inmunidad deseados. Se sabe que los nematodos consiguen establecerse de forma crónica en el hospedador, pero el mecanismo por el cual lo consiguen es todavía incierto (Timothy *et al.*, 1993).

1.6. TRATAMIENTO DE LAS INFECCIONES POR NEMATODOS

Hasta el momento el método de control de las nematodosis más utilizado en ganadería ha sido el tratamiento farmacológico antihelmíntico, consistente en los denominados “tratamientos estratégicos”. En ganadería, dada la alta prevalencia de parasitación, los fármacos se emplean en el momento previo a la eliminación de huevos (periodo prepatente), para así evitar la contaminación de los pastos o bien, un mes antes del sacrificio del ganado. Asimismo, se tratan las hembras gestantes previamente al parto, para evitar el aumento de la transmisión que ocurre durante el mismo (Angulo-Cubillán, 2005).

Los fármacos disponibles comercialmente pertenecen a los cinco grupos o familias siguientes:

- imidazotiazoles (levamisol y tetramisol);
- tetrahidropirimidinas (morantel y pirantel);
- benzimidazoles (tiabendazol, fenbendazol, albendazol, oxfendazol, parbendazol, cambendazol, mebendazol, flubendazol, luxabendazol, triclabendazol) y probenzimidazoles (thiofanato, febantel y netobimin);
- salicilanilidas (oxiclosanida, rafoxanide, closantel y niclosanida);
- avermectinas (abamectina, doramectina y moxidectina).

Estos tratamientos antihelmínticos tienen inconvenientes, tanto en su administración como en sus efectos *a posteriori*. Debido al bajo coste de estos medicamentos, su venta y administración es masiva, sin rotación en los principios activos disponibles, lo cual desemboca en un uso incontrolado, sin diagnóstico previo, ni posterior, a menudo con sobredosificación y con el consiguiente desarrollo de poblaciones parasitarias resistentes, contaminación del ambiente y presencia de residuos en carnes y leche.

Los antiparasitarios solamente mejoran la producción de carne cuando la disminución en la ganancia de peso se debe a cargas parasitarias elevadas de especies patógenas susceptibles al fármaco utilizado, combinados con un nivel alimentario adecuado (Angulo-Cubillán, 2005; Caracostantogolo *et al.*, 2005).

El gran problema de los antihelmínticos y al que hay que prestar una mayor atención es la creación de resistencias. La resistencia es la capacidad heredable de una población parasitaria de reducir la sensibilidad a una o más sustancias farmacológicas. Esta reducción se transformará en un aumento del número de individuos de una misma población que serán capaces de tolerar la dosis al fármaco que para la mayoría de los individuos de su misma especie sería letal. La resistencia no debe de ser confundida con la tolerancia. Esta última es la falta de respuesta innata de una población a una molécula (Conder *et al.*, 1995).

Esta resistencia a los antihelmínticos está más extendida en los nematodos del ganado bovino que en el ovino en la mayoría en países, como Nueva Zelanda, Reino Unido y Argentina. La creciente resistencia a antihelmínticos, se da de forma más rápida en regiones tales como Australia, Nueva Zelanda, Sudáfrica y Sudamérica, cuyas condiciones climáticas y sistemas de pastoreo son más propensos a las reinfecciones continuadas, a la adquisición de altas cargas parasitarias y en las que los programas antihelmínticos se basan en la utilización de estos fármacos como único recurso.

La mayoría de los antihelmínticos utilizados pertenecen al grupo de los imidazotiazoles y benzimidazoles, los cuales debido a sus mecanismos de acción disminuyen rápidamente su concentración plasmática, dando poca oportunidad de tomar ventaja a los parásitos que presentan genes de resistencia sobre los susceptibles (Nari, 1987). Sin embargo, en el grupo de los bovinos se han visto desarrolladas resistencias a los benzimidazoles, en regímenes de desparasitaciones de 12 tratamientos al año (Sangster, 1999).

Un estudio en ovinos demostró que los animales hacinados tenían un 90% más de posibilidades de presentar resistencia, frente al 30-40% que tenían aquellos animales que no vivían en estas condiciones, además se demostró que la resistencia en estos últimos avanzaba de forma mucho más lenta (Martin, 1985). A todo hay que sumar que en las últimas décadas no se han introducido nuevos fármacos en el mercado, salvo en el caso de los amino-acetonitrilos, de amplio espectro contra nematodos gastrointestinales, pero que no aportan ninguna novedad importante respecto a los existentes.

Dados estos inconvenientes, son cada vez más frecuentes los estudios para el diseño de alternativas a la utilización de fármacos antihelmínticos. Una de ellas es el control biológico, basado en procedimientos de mejora de los pastos, y que están orientados a reducir el nivel de

larvas infectantes y otros, como la utilización de hongos (*Duddingtomia flagrans*) depredadores de larvas de *Haemonchus* y *Cooperia* (Caracostantogolo *et al.*, 2005; Mendoza *et al.*, 2005).

1.7. DESARROLLO DE VACUNAS FRENTE A NEMATODOS

Una buena opción para el control de las helmintiasis es la prevención mediante el uso de vacunas, que constituyen el medio más deseado para combatir las infecciones del ganado (Márquez, 2003).

La vacunación contra helmintos parásitos representa una alternativa prometedora al tratamiento con antihelmínticos (Bergquiste & Lustigman, 2010). En teoría, podrían ser utilizadas varios tipos de vacunas: organismos vivos atenuados, organismos muertos, antígenos nativos en diferente grado de pureza y las constituidas por antígenos recombinantes junto a las vacunas de DNA. Hasta el momento las vacunas que han sido comercializadas son para el ganado vacuno, Huskvac® (Intervet) y BovilisDictol® (Schering Plough Animal Health), contra *Dictyocaulus viviparus*, un parásito altamente nocivo para el ganado. Ambas utilizan una suspensión acuosa de larvas L3 de *D. viviparus* atenuadas por radiación. Sin embargo, el uso de larvas es cada vez más reducido debido a las complicaciones logísticas derivadas del manejo de material biológico vivo, su traslado e indudablemente su obtención (Bethony *et al.*, 2006).

El uso de proteínas nativas o recombinantes para la creación de vacunas puede ser una vía de producción más fiable. En el caso de los nematodos la obtención de proteínas nativas puede ser más complicada debido, por una parte, al problema para conseguir dosis suficientes de dichas proteínas como consecuencia de la dificultad de mantener los ciclos biológicos y por otra, a la obtención de la fórmula comercializada estable. Por estas razones, el desarrollo y comercialización de este tipo de vacunas podría depender del uso de proteínas recombinantes (Smith, 1996).

Las vacunas de este último tipo que se han diseñado frente a nematodos intestinales se han dividido en dos clases, una de ellas es la de antígenos ocultos o encubiertos, que no están expuestos directamente al sistema inmunitario del hospedador; y la otra clase es la constituida por los antígenos presentes bien en los productos de excreción/secreción, o bien los antígenos superficiales de parásito.

Los antígenos ocultos son muy efectivos en nematodos que se alimentan de sangre como *Haemonchus contortus*, debido al contacto directo del parásito con las células inmunológicas del hospedador. Con el otro tipo de antígenos cabe esperar una respuesta similar, además de activar la respuesta inmunitaria primaria en el hospedador (Newton *et al.*, 1999). En el primer caso, se ha descrito una aminopeptidasa recombinante de *H. contortus*, la llamada H11, una glicoproteína de membrana de 110 kDa purificada de parásitos adultos de *H. contortus*, induce un alto nivel de anticuerpos, llegando a una reducción en el 90% de huevos en heces y 75% menos de carga parasitaria. Utilizando esta proteína como vacuna se han obtenido datos de protección elevados tanto en ovejas como en corderos (Newton *et al.*, 1999).

Utilizando antígenos de bajo peso molecular (15 y 24 kDa) obtenidos a partir de los productos de excreción/secreción de larvas L4 y adultos de *H. contortus*, se ha descrito una función protectora tras la segunda infección comparado con el nivel de anticuerpos de la primera infección (Schallig *et al.*, 1994). Cuando estos antígenos fueron utilizados en ovejas de 3, 6 y 9 meses, se vio una respuesta humoral a los 6 y 9 meses, pudiéndose hablar de un 77% y un 82% de descenso de la carga parasitaria, respectivamente. Esta respuesta inmunológica fue correlacionada con altos niveles de IgG, IgA e IgE y con presencia de mastocitos tisulares (Vervelde *et al.*, 2001).

Muchos ensayos utilizando antígenos recombinantes han fracasado. Una de las causas más comunes podría ser la ausencia o diferencias en la glicosilación y conformación de la proteína recombinante en relación con la proteína nativa (Bassetto *et al.*, 2015). Sin embargo, otros ensayos utilizando mezclas más complejas de moléculas recombinantes han conseguido cierta protección, como es el caso de *Teladorsagia circumcincta*, el principal patógeno que causa gastroenteritis parasitaria en pequeños rumiantes en regiones templadas (Nisbet *et al.*, 2013). Para la vacunación de ovejas contra este parásito, en este trabajo, se utilizó una vacuna que constaba de una mezcla de 8 moléculas recombinantes, y que fue administrada en tres inmunizaciones seriadas, consiguiéndose una reducción del número de huevos eliminados del 70% y del 58% y un descenso en la carga parasitaria del 75% y del 56% en dos ensayos que se diferenciaron en cuanto a los tiempos de inmunización y de infección y de la edad del hospedador vacunado. Aunque no se observa una protección del 100%, este ensayo podría ser exitoso, ya que datos que oscilen entre un 60-80% de protección en rumiantes podrían darse como válidos cuando estén dentro de los dos primeros meses de la infección, ya que es el momento en el que el parásito excreta mayor cantidad de huevos al medio y hay más posibilidades de reinfección (Geldhof *et al.*, 2002; Solano-Parada *et al.*, 2010).

Otro estudio se basó en el empleo de la proteína recombinante de *Ascaris* spp. As16 (Tsuji *et al.*, 2003), un antígeno inmunogénico de bajo peso molecular expresado por las especies parasitarias de humanos y cerdos. Se realizó una inmunización intranasal en cerdos utilizándose como coadyuvante la toxina colérica (TC). Esta vacunación redujo en un 38% la migración de larvas de *A. suum* a los pulmones. Esta proteína ha sido localizada por inmunofluorescencia en el tracto digestivo de los estadios larvarios L2, lo que sugiere que la respuesta del hospedador para protegerse de la infección pasa por inhibir las funciones del tejido intestinal de *Ascaris* spp.

Strube y colaboradores (2015) estudiaron el efecto protector del antígeno recombinante paramiosina (RPMY) de *Dictyocaulus viviparus* comparando su efecto con el de la vacuna ya comercializada Bovilis©Dictol. Aunque los datos de protección no fueron mejores, sí se obtuvo información relevante que en un futuro podría ayudar a mejorar la vacuna existente, como es el uso de diferentes adyuvantes o la combinación de varias proteínas antigénicas. En este caso, una proteína de 100 kDa se inoculó en dos ensayos diferentes a bovinos de 6 meses de edad por vía intramuscular en 3 inmunizaciones seriadas de 21 días, el adyuvante utilizado fue QuilA. La respuesta inmunológica que se obtuvo en los animales vacunados fue un aumento de IgG e IgA local, lo cual podría ser responsable de una expulsión del parásito por acción de la respuesta local de la mucosa intestinal.

En el caso de vacunas de DNA frente a helmintos, hasta el momento el nivel de protección que se ha conseguido es muy bajo. Hay que destacar algunos ensayos como los realizados por Espino *et al.* (2005) frente a *Fasciola hepatica* en el que la secuencia utilizada tuvo baja inmunogenicidad y el de Zhu *et al.* (2006) frente a *Schistosoma japonicum* con un descenso del 48,3% de vermes adultos en cerdos. Cabe resaltar la vacuna de DNA frente a *T. spiralis* del grupo Liu *et al.* (2015) que consiguieron una reducción del 73,2% de parásitos adultos.

1.7.1. Adyuvantes

Los adyuvantes son compuestos que incrementan la respuesta inmunitaria frente al antígeno inoculado. La primera descripción tuvo lugar hacia 1920 cuando se observó que los caballos que desarrollaban abscesos en la zona de inyección de la vacuna de la toxina diftérica tenían un nivel de inmunidad más alto que aquellos animales que no los poseían (Ramon, 1924), y se demostró posteriormente, que los abscesos generados por la inyección de sustancias extrañas inyectadas junto al toxoide aumentaban la protección. Ya en 1926, Glenny y colaboradores descubrieron que la asociación de sales alumínicas a las vacunas tenía un efecto potenciador de éstas. Los estudios sobre los adyuvantes en la toxina diftérica prosiguieron con Freund (1937), Greenberg & Fleming (1947) y Stuart-Harris (1969).

En la actualidad se han descrito cientos de compuestos, que pueden ser naturales o sintéticos, que potencian la respuesta inmunitaria mediada por anticuerpos (Espino *et al.*, 2005). Para elegir un adyuvante es necesario conocer el tipo de antígeno, la especie a vacunar, la vía de administración y la posibilidad de efectos adversos debidos a la vacunación. Las reacciones adversas que pueden desarrollarse debido a los adyuvantes pueden ser locales, como inflamación local, necrosis en el sitio de la inoculación, formación de abscesos, linfadenopatías en la zona de inoculación, o bien sistémicas incluyendo náuseas, fiebre, anafilaxis o inmunotoxicidad entre otros (Allison *et al.*, 1991). Un adyuvante ideal debe ser estable, biodegradable, no causar reacción inmunológica y a su vez potenciar el efecto de la molécula a la que va unido en el sistema inmunitario del hospedador (Mohan *et al.*, 2013).

Hay diferentes tipos de adyuvantes que se pueden clasificar según su modo de acción, de su naturaleza química o de su origen. Entre los adyuvantes inorgánicos, podemos destacar las sales de aluminio o los hidróxidos de aluminio. Han sido muy utilizadas en vacunas para uso humano y animal, ya que son los únicos adyuvantes aprobados para su uso clínico. Estas sales han sido empleadas en vacunas contra tétanos, difteria y poliomielitis en humanos, y contra virus y bacterias, así como en vacunas antiparasitarias, en veterinaria. El inconveniente de estos adyuvantes es que, aunque son buenos potenciadores de la inmunidad humoral, son malos inductores de la inmunidad celular (Schrimbeck *et al.*, 1994; Jennings *et al.*, 1995; Neutra *et al.*, 1996).

El fosfato de calcio también ha sido muy utilizado y se encuentra en la vacuna de difteria-tétanos-pertusis (Gupta & Siber, 1995). Aunque tiene propiedades similares al aluminio tiene algunas ventajas sobre este, ya que es bien tolerado por el cuerpo por formar parte de él,

permite una liberación lenta de antígenos e incrementa los niveles de IgG sin afectar a los niveles de IgE (Relyveld *et al.*, 1986).

Otro tipo de adyuvantes son las emulsiones, entre las más destacadas están las soluciones acuosas del antígeno en aceites minerales o vegetales. Destacan por una liberación del antígeno lenta y por la estimulación de las células B, que contribuyen a la producción de anticuerpos. Como en el caso anterior, no están exentas de producir efectos adversos, como reacciones inflamatorias o úlceras en el lugar de la inoculación (Martínez-Fernández *et al.*, 2004).

También pueden usarse como adyuvantes, los tensioactivos que derivan directamente de las saponinas de origen vegetal (Morein *et al.*, 1984). Entre sus propiedades físico-químicas se incluye la propiedad de saponificación, y especialmente su capacidad de estimular el sistema inmunitario. Entre ellos cabe destacar el compuesto inmunopotenciador Quil-A (Marty *et al.*, 2016) obtenido del árbol *Quillaja saponaria*. Las saponinas destacan por su efecto sobre la activación de la respuesta mediada tanto por linfocitos T-dependientes como T-independientes y estimulan la respuesta Th1, así como a los linfocitos T citotóxicos. Además, potencian las vacunas administradas a través de las mucosas (Kauffmann *et al.*, 2004).

Otro grupo, es el constituido por los adyuvantes derivados de microorganismos, adyuvantes basados en endotoxinas, como el caso de los lipopolisacáridos (LPS) de la pared bacteriana de las bacterias gram-negativas o el peptidoglicano, dos sustancias capaces de aumentar la respuesta inmunitaria (Barton *et al.*, 2002). El adyuvante LPS, fue descubierto en 1956 por Johnson y su equipo en la superficie de las bacterias gram-negativas y su mayor componente estructural es el lípido A. Para que se conserve la actividad de adyuvante, pero disminuya su toxicidad, se mantiene en pH ácido al cual se hidroliza dando lugar al monofosforil-lípido A (Kolanowski *et al.*, 2016).

Como muestra de adyuvantes derivados de sistemas particulados de liberación de antígenos destacaremos:

- **Liposomas:** esferas sintéticas formadas por bicapas lipídicas que encapsulan el antígeno, lo que hace que actúen tanto como sistema de liberación antigénico, como de adyuvante. La eficacia depende de varios factores tales como el número de capas, vesículas multilaminares (MLV) o unilaminares (ULV) (Shek *et al.*, 1983); la composición y método de preparación (Allison *et al.*, 1974; Heat *et al.*, 1976; Bozzuto *et al.*, 2015) y la carga eléctrica. El fenómeno “co-delivery”, en el que se basa el uso de liposomas como método de inmunización, potencia tanto la respuesta humoral como la celular, para antígenos de naturaleza proteica y polisacárida (Bozzuto *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2016). La vida media de los antígenos encapsulados en liposomas en sangre es muy larga, lo que asegura una exposición mayor a las células presentadoras de antígeno (APC). El inconveniente de los liposomas es su estabilidad, manufactura y la calidad de los componentes, lo que por el momento los hace inviables en vacunación a humanos.

- ISCOM: son micropartículas coloidales formadas por la saponina Quil-A, fosfolípidos, colesterol y el antígeno seleccionado (Morein *et al.*, 1984). La unión de estos compuestos se establece mediante interacciones hidrofóbicas, creando unos anillos constituidos por la unión de un tensioactivo y el colesterol. Una de las habilidades de estos complejos es la facilitación de la entrada del antígeno al citoplasma celular de las células dendríticas (APC), activando las CD4+, mientras que la presentación antigénica de las CD8+ ocurre directamente (Beacock-Sharp *et al.*, 2003). Los antígenos hidrofóbicos se unen a estos complejos si se inoculan en ISCOM vacíos (Bigaeva *et al.*, 2016).
- Lipopéptidos: biomoléculas formadas al añadir restos lipídicos a un péptido sintético o recombinante (Benmohamed *et al.*, 1997). El auge del uso de lipopéptidos como vacuna vino tras el trabajo de Schildt *et al.* (1991) donde encontraron que los antígenos del virus de la gripe (influenza) eran más efectivos como vacuna en forma de lipopéptido que los péptidos en solitario, dando una respuesta T citotóxica. Esto se cree que puede ser debido a que el lipopéptido puede interactuar con diferentes tipos de APC (Benmohamed *et al.*, 2010). Tienen además ventajas tales como la facilidad de purificación, el aumento del tamaño del péptido, la facilidad de formulación del lípido, y también la capacidad para formar micelas o agregaciones que pueden proteger los epítomos más importantes del péptido. El trabajo más reciente en el cual se ha empleado de forma efectiva la combinación de ácido oleico, unido mediante enlace covalente, con una proteína recombinante para el tratamiento de *Trichuris muris* es el de Gómez-Samblas y colaboradores (2017).

1.7.2. Vías de inoculación para la administración de vacunas

La vía de administración es uno de los factores más relevantes para el diseño y desarrollo de vacunas. Las dos vías más usuales son la intramuscular y la subcutánea. Sin embargo, en los últimos años se han desarrollado vacunas para su inoculación a través de mucosas, que ofrecen ventajas tales como la facilidad de administración, reducción de efectos adversos y una activación local del sistema inmunitario (Neutra *et al.*, 1996).

La inmunidad de mucosas, ruta de entrada de la mayor parte de los patógenos que afectan a un individuo, está mediada por la secreción de anticuerpos IgA locales y su asociación con un aumento de la producción de moco y contractilidad muscular, con lo que se neutraliza a los agentes infecciosos y se evita la colonización de la mucosa epitelial (tracto respiratorio o digestivo). La gran mayoría de las vacunas existentes que emplean la vía de la mucosa están formadas por organismos vivos atenuados, aunque existen diversos estudios con antígenos solubles.

Otras vías de inmunización son la oral, muy usual en vacunas con organismos vivos, que permite una rapidez mayor en la vacunación. La vía aerógena se utiliza para vacunas víricas o bacterianas vivas en aves y porcinos. La vía parenteral, sobre todo para administrar antígenos atenuados y que, a diferencia de las anteriores, aunque causa más molestias en animales se consigue una administración más específica para cada animal, destacando las vías subcutánea e intramuscular. Y, por último, la vía tópica, en mucosa nasal o conjuntiva ocular.

1.8. PROTEÍNAS DE NEMATODOS CANDIDATAS PARA VACUNACIÓN

El descubrimiento de una vacuna contra los helmintos parásitos que afectan tanto a los animales domésticos como a los humanos, constituye un gran desafío para los investigadores. Algunas revisiones publicadas recientemente sobre este tema describen los antígenos y adyuvantes utilizados, su efectividad y su forma de administración.

En muchos casos, las diferentes proteínas diana seleccionadas para combatir a los nematodos son aquellas que son vitales para su supervivencia o bien para su desarrollo. Por ejemplo, las catepsinas K y Z están involucradas en el cambio de estadio de *Onchocerca volvulus* (Lustgiman *et al.*, 2004). Aboobaker *et al.* (2003) identificaron la RNA polimerasa II y la β -Tubulina como proteínas diana contra *Brugia malayi*.

Existen diversos estudios que describen la efectividad de una proteína serina/treonina fosfatasa como vacuna frente a nematodos. Hu y colaboradores en 2007, identificaron el gen que codifica esta fosfatasa en *Trichostrongylus vitrinus* y midieron la expresión de dicha proteína en diferentes estadios del ciclo, determinando que sólo se daba en adultos macho, lo cual marca esta proteína como esencial en la espermatogénesis. Esta serina/treonina fosfatasa es una enzima involucrada en muchos procesos celulares, especialmente en embriogénesis y diferenciación.

En 2010, Solano-Parada *et al.* realizaron un rastreo inmunológico utilizando suero de pacientes diagnosticados con angiostrongiloidosis abdominal contra una librería de cDNA de vermes adultos de *Angiostrongylus costaricensis*. Identificaron una proteína que poseía una alta homología con 2 dominios pertenecientes a la subunidad catalítica de la familia "serine/threonine phosphatase 2A" (PP2A). Su análisis mostró una alta identidad con secuencias de otros nematodos (67% de similitud con *Caenorhabditis elegans*). Tras el análisis inmunogénico de la secuencia de esta proteína, se inmunizaron ratones demostrándose que el inmunosuero era capaz de reconocer la proteína nativa y además no había reacciones cruzadas. Con estos datos Solano-Parada *et al.* (2010) estudiaron la efectividad de una vacuna, utilizando un péptido recombinante, correspondiente a la subunidad catalítica de la serina/treonina fosfatasa 2A (PP2Ar) contra el parásito *A. costaricensis*. Los resultados mostraron que la vacunación con PP2Ar puede constituir un método útil de inmunización al proporcionar una respuesta inmunitaria protectora frente *A. costaricensis*.

Posteriormente se han realizado diferentes ensayos de inmunoprotección con esta proteína, como el caso de los estudios de Fawzi *et al.* (2013) y Gómez-Samblas *et al.* (2017), en los que dicha proteína ha mostrado buenos resultados en su utilización como tratamiento frente a diferentes nematodos que compartían homología. Por tanto, esta proteína fosfatasa puede constituir un antígeno útil de inmunización frente a nematodos.

La fosforilación reversible de proteínas es un mecanismo fundamental para numerosos procesos celulares (Hunter *et al.*, 1999; Andersen *et al.*, 2004), y se regula por medio de quinasas y fosfatasas. Hay tres tipos de proteínas fosfatasas: “Proteínas Serina/Treonina fosfatasas” (PSTPasas), ubicadas en el citoplasma y relacionadas con la transducción de señales (Barford *et al.*, 1998); “Proteínas Tirosina Fosfatasas” (PTPasas), usualmente en la membrana y con la misma función que las anteriores (Harris *et al.*, 2013) y “Fosfatasas Duales Específicas” (DSPasas).

Hoy en día las PSTPasas se clasifican en subfamilias de acuerdo con la especificidad de sustrato, dependencia de iones metálicos y sensibilidad a inhibidores: las PSTPasas de tipo 1 o PP1 y las PSTPasas de tipo 2, las cuales se subdividen en PP2A, PP2B y PP2C. Otros estudios posteriores han detectado otras proteínas llamadas PP2A-like entre las que encontramos PP4, PP5, PP6 y PP7 (Cohen *et al.*, 1990).

La mayoría de PSTPasas son proteínas multiméricas formadas por una subunidad catalítica y una o más proteínas accesorias. Las proteínas accesorias confieren especificidad de sustrato, regulan la actividad enzimática y controlan la localización subcelular de la holoenzima (Faux *et al.*, 1996). Algunas de estas enzimas, están relacionadas estrechamente con la espermatogénesis y/o regulación de la movilidad del espermatozoide (Janssens & Goris, 2001; Ventelä *et al.*, 2012), lo que haría de ellas unas dianas de vacunación o tratamiento excepcionales.

La fosfatasa más prevalente en eucariotas es la PP2A, que se puede encontrar en el citosol y en el núcleo (Turowski *et al.*, 1997) e interviene en procesos vitales tales como la mitosis (Goris *et al.*, 1989), apoptosis (Santoro *et al.*, 1998), replicación y reparación del DNA (Zimmermann *et al.*, 2012) y transducción de señales (Janssens & Goris, 2001). Dentro de la familia de la PP2A podemos encontrar proteínas diméricas o triméricas, por lo general compuestas por una subunidad catalítica (C), una subunidad estructural (A) y una reguladora (B) (Figura 12).

La subunidad C catalítica (PP2Ac) es una proteína globular de 36 kDa (Green *et al.*, 1987) expresada prácticamente en todos los tejidos, aunque es más abundante en corazón y cerebro de mamíferos (Seshacharyulu *et al.*, 2013). Tiene dos isoformas (C α and C β), la isoforma C α está expresada predominantemente en la membrana plasmática y la C β en el citoplasma y el núcleo. PP2Ac representa una gran familia de proteínas fosfatasas altamente conservadas (Lammers & Lavi, 2007).

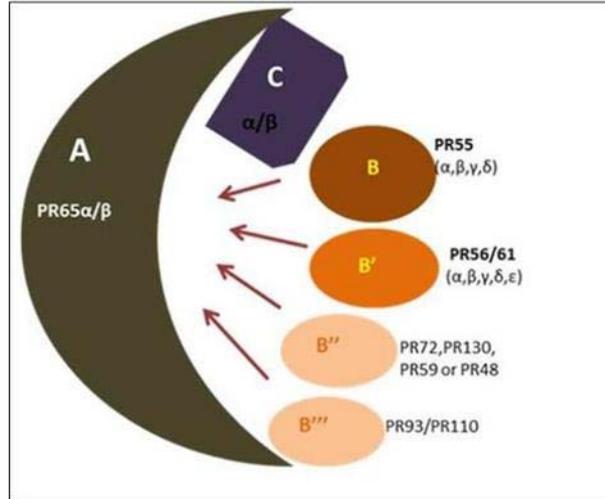


Figura 12.- Representación esquemática de la diversidad estructural de la holoenzima de la PP2A: La serina/treonina fosfatasa PP2A está formada por tres subunidades: subunidad catalítica (C), subunidad reguladora o estructural (A) y las subunidades variables B (B, B', B'', B''') (Seshacharyulu *et al.*, 2013).

La subunidad estructural A (PR65): es una proteína de 65 kDa asociada a PP2Ac, formando un dímero al que se les une una subunidad B específica (Ruediger *et al.*, 1992) (Figura 12). De la misma forma que PP2Ac, la subunidad A está codificada por dos genes, originando dos isoformas (A α and A β) siendo la primera de ellas más abundante. La estructura de PR65 (subunidad A) está compuesta por 15 repeticiones en tándem de 39 aminoácidos, llamada "HEAT" (Huntington/Elongation/A-subunit/TOR) (Andrade *et al.*, 1995), ésta repetición en tándem se encuentra en varias proteínas importantes (Grooves *et al.*, 1999). En su forma heterotrimérica, PP2A-A actúa como una base estructural para acompañar a la subunidad catalítica y facilitar su interacción con la subunidad reguladora y otros sustratos. En su forma dimérica, sin embargo, PP2A-A actúa como reguladora cambiando la especificidad catalítica (Seshacharyulu *et al.*, 2013).

La subunidad reguladora PP2A-B es estructuralmente diversa. En mamíferos está clasificada en cuatro familias (B, B', B'' y B''') (Figura 12) cuyos miembros están expresados de forma diferente dependiendo del estadio de desarrollo y de forma específica de tejido (Stark *et al.*, 1996). La unión de la subunidad A y la subunidad C forma el núcleo dimérico, que puede unirse con cualquiera de las subunidades B. La subunidad B es el principal regulador de la PP2A, actuando como un modulador de orientación para proporcionar especificidad temporal y espacial a la holoenzima PP2A.

Los miembros de la familia de la subunidad B están relacionados entre otros, con el control de la división celular (Goris *et al.*, 1989), transducción de señales (Narayanan *et al.*, 2007) y apoptosis (Santoro *et al.*, 1998). Su papel en la supervivencia celular ha sido muy estudiado viendo que las subunidades PR55 y PR72 intervienen en la regulación negativa de la apoptosis (Silverstein *et al.*, 2002).

La principal característica de PP2A es su capacidad de formar complejos estables, a través de los cuales interactúa con moléculas vitales de señalización intermedia que están presentes en el citoplasma. Estudios de PP2A en *Drosophila melanogaster* han revelado su intervención en procesos de regulación del ciclo celular y la señalización intracelular, viendo que PP2Ac se encuentra en todos los estadios del ciclo, siendo más abundante en el periodo embrionario (Orgad *et al.*, 1990) lo que sugirió que estas proteínas son esenciales para la función celular.

Estudios realizados con *Trypanosoma cruzi* (González *et al.*, 2003) han identificado proteínas de la familia PP2A como importantes para la completa transformación de tripomastigotes en amastigotes durante el ciclo de vida del parásito. En el caso de *Plasmodium falciparum*, estas fosfatasa se han visto asociadas al ciclo del parásito, ya que la utilización de un inhibidor de la PP2A inhibía el desarrollo de tres diferentes estadios evolutivos (Yokoyama *et al.*, 1998; Kumar *et al.*, 2002). Todo ello sugiere la posible utilización de PP2A como antígeno para futuras vacunas.

En el caso de los nematodos, PP2A ha sido identificada en *B. malayi* (Ghedini *et al.*, 2007), *T. spiralis* (Smith *et al.*, 2000), *C. elegans* (Ahn *et al.*, 2006), *Oesophagostomum dentatum* (Boag *et al.*, 2003), *Trichostrongylus vitrinus* (Hu *et al.*, 2007) y *Toxocara canis* (Ma *et al.*, 2014).

La elevada homología de secuencia de aminoácidos de la PP2A (Figura 13) entre diversas especies de nematodos y los resultados que se han obtenido empleándola como antígeno en otros ensayos de inmunoprotección, nos hace considerar a la PP2A como un antígeno a ensayar en la elaboración de vacunas multivalentes para nematodos parásitos.



Figura 13.- Clustal W2 de las secuencias de la región catalítica de la PP2A en diferentes nematodos. Cr.- *Caenorhabditis elegans*; Cb.- *Caenorhabditis briggsae*; Tv.- *Trichostrongylus vitrinus*; Od.- *Oesophagostomun dentatum*; Te.- *Trichinella spiralis*; Bm.- *Brugia malayi*; As.- *Ascaris suum* (Fawzi *et al.*, 2013).

Solano-Parada *et al.* estudiaron en 2010 la efectividad de una vacuna compuesta por el péptido PP2A recombinante (PP2Ar) y usando diferentes adyuvantes (ISCOM Matrix, ISACON) y la subunidad B de la toxina colérica, contra el parásito *A. costaricensis*. Los resultados mostraron que la vacunación con PP2Ar puede constituir un método útil de inmunización al proporcionar una respuesta inmunitaria protectora frente *A. costaricensis*. Basándonos en estos resultados, el presente estudio pretende consolidar al binomio *A. tetraptera*-ratón como modelo experimental y su aplicación en ensayos de vacunación cruzada frente a nematodiasis.

En esta Tesis se ha evaluado la eficacia protectora de la PP2A de *A. costaricensis* para inducir respuestas cruzadas frente *A. tetraoptera* en ratones cuando se administra dicho péptido recombinante preferentemente vía intranasal. Se ha estudiado la capacidad protectora de la PP2A formando parte de diferentes fórmulas vacunales conteniendo diferentes adyuvantes. Se muestra la eficacia y seguridad de las fórmulas empleadas, y en profundidad se presenta el análisis de la formulación con mejores resultados, con la que se ha realizado un estudio más específico con el objetivo de disponer de una fórmula con los mejores resultados en cuanto a inmunoprotección.

2. OBJETIVOS

El **objetivo general** de la presente Tesis Doctoral es caracterizar el modelo experimental *Aspicularis tetraptera*-ratón (CD1) para su uso en la investigación de las nematodosis. Este modelo será empleado en ensayos de vacunación con la proteína recombinante PP2Ar como antígeno en presencia de distintos adyuvantes.

Para abordar este objetivo general se han definido los siguientes **objetivos específicos**:

1. Establecer las condiciones óptimas de infección para el empleo en el laboratorio del modelo *Aspicularis tetraptera*-ratón en cuanto a dosis infectante y tiempo de infección.
2. Describir la respuesta inmunológica del ratón, asociada a la infección experimental con *A. tetraptera* tanto a nivel sistémico (suero) como local (mucosa).
3. Estudiar la eficacia y seguridad de las formulaciones vacunales propuestas, en función de los adyuvantes utilizados y según las vías de administración.
4. Analizar la capacidad protectora de las formulaciones y vías seleccionadas frente a la infección por *A. tetraptera* y selección de la mejor candidata para la vacunación animal.
5. Estudiar el efecto inmunomodulador de la formula vacunal con mayor eficacia y estudiar los mecanismos de inmunidad implicados en su capacidad protectora.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. MATERIAL BIOLÓGICO

3.1.1. Material parasitológico: *Aspicularis tetraptera*

Aspicularis tetraptera es un nematodo perteneciente a la familia de los oxiúridos que parasita el ciego y el colon del ratón casero, ratón doméstico o ratón común (*Mus musculus*) y, en menor medida, de las ratas. Posee un ciclo directo que se completa en 23 días y la infección se adquiere a través de la ingesta de huevos embrionados (Taffs, 1976).

Para nuestro estudio se utilizaron hembras grávidas aisladas de animales infectados de forma natural, a partir de la parte superior del colon o colon proximal (Figura 14).

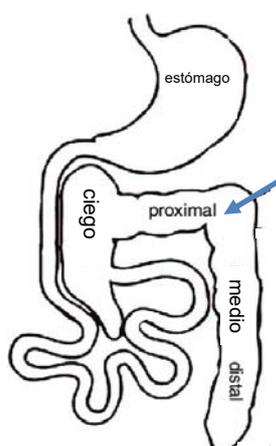


Figura 14.- Partes del intestino grueso de ratón y hábitat más habitual de *A. tetraptera*.

3.1.2. Animales de experimentación: ratón ICR (CD1)

Se emplearon como hospedadores ratones machos ICR (CD1) de 5 semanas de edad, los cuales fueron sometidos a procesos de infección experimental y ensayos de vacunación

Puesto que el ciclo biológico de *A. tetraptera* es directo y, por tanto, se trata de una infección de fácil diseminación entre animales estabulados, los protocolos experimentales se llevaron a cabo en una zona del animalario de nivel de contención 2 (P2), un área de mantenimiento de roedores preparada para procedimientos experimentales con utilización de agentes clasificados como grupo 2 según el Real Decreto 664/1997. Esta área mantiene una ventilación, luz y temperatura controladas y registradas; con aire filtrado a través de filtros HEPA. Además, los animales fueron alimentados *ad libitum* con pienso esterilizado en autoclave, realizándose un cambio de los lechos de las jaulas cada 2 días. Los ratones fueron sacrificados según la normativa vigente por dislocación cervical.

3.2. CONSIDERACIONES ÉTICAS

Para la realización de los estudios que conforman esta Tesis, se aprobó un primer procedimiento A1369308766163 por el Comité de Ética de Experimentación y Bienestar Animal (CEBA) de la Universidad de Valencia, el 17 de Julio de 2013, y un segundo procedimiento 2015/VSC/PT33/00069 aprobado por la Generalitat Valenciana el 1 de Abril de 2015.

3.3. INFECCIONES EXPERIMENTALES

Las hembras de *A. tetraptera* empleadas en los ensayos de infección se obtuvieron tras el sacrificio de ratones CD1 infectados de forma natural, tras su sacrificio. Asimismo, se recopilaban también el resto de estadios evolutivos hallados para su posterior uso como antígeno total.

Las hembras grávidas se recuperaron de la parte superior del colon y se incubaron en agua destilada con Penicilina/Estreptomicina (1%) a 24°C durante 7 días, cambiando la solución acuosa cada 2 días, con el fin de que se completara la embrionación intrauterina de los huevos.

Para la realización de infecciones controladas, y tras comprobar la embrionación de los huevos, se administraron vía oral las hembras enteras en suero salino con ayuda de una sonda gástrica (Derothe *et al.*, 1997) (Figura 15).



Figura 15.- Infección vía oral con sonda gástrica.
(Fuente: <http://www.bioterios.com>)

Con el fin de establecer las condiciones óptimas para llevar a cabo la infección experimental, se infectaron 2 grupos de 11 animales con dosis de 2 y 4 hembras, respectivamente. A su vez, estos dos grupos fueron subdivididos en otros dos, los cuales se sacrificaron a diferentes tiempos, 30 y 60 días post-infección, tal y como se indica en la Figura 16.

Para poder analizar los efectos de la infección en el hospedador, de forma paralela, se contó con un grupo de animales control (10 animales) de las mismas características y mantenidos en las mismas condiciones que los infectados que fueron sacrificados a los 30 y 60 días, divididos en dos grupos de 5 animales para cada tiempo.

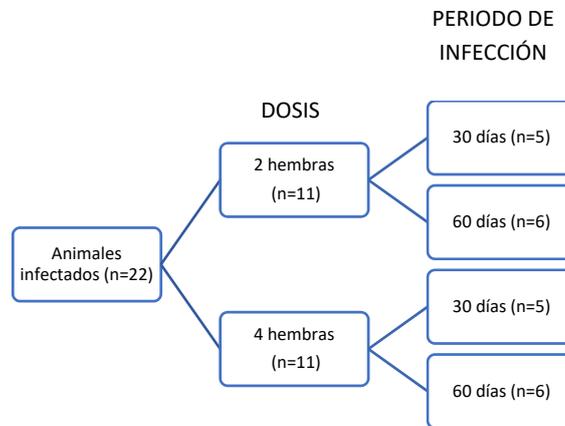


Figura 16.- Grupos y subgrupos de animales empleados en ensayos de infección.

Tras el sacrificio (30 y 60 días después de la infección) se aisló el intestino grueso donde se alojan preferentemente estos nematodos y se diseccionó longitudinalmente, bajo la lupa binocular, para proceder al recuento de los vermes.

De todos los animales del ensayo, se tomaron muestras de intestino (colon proximal), mucosa intestinal y se extrajeron tejidos y órganos inmunoactivos como placas de Peyer (PP), Nódulos Linfáticos Mesentéricos (NLM) y bazo. Estas últimas muestras se almacenaron en RNAlater® (Sigma-Aldrich) solución que estabiliza y protege el RNA total mediante la inactivación inmediata de las RNAsas.

A lo largo de los ensayos se tomaron muestras de sangre antes de la infección y cada 10 días hasta el sacrificio, tal y como indica la Figura 17.

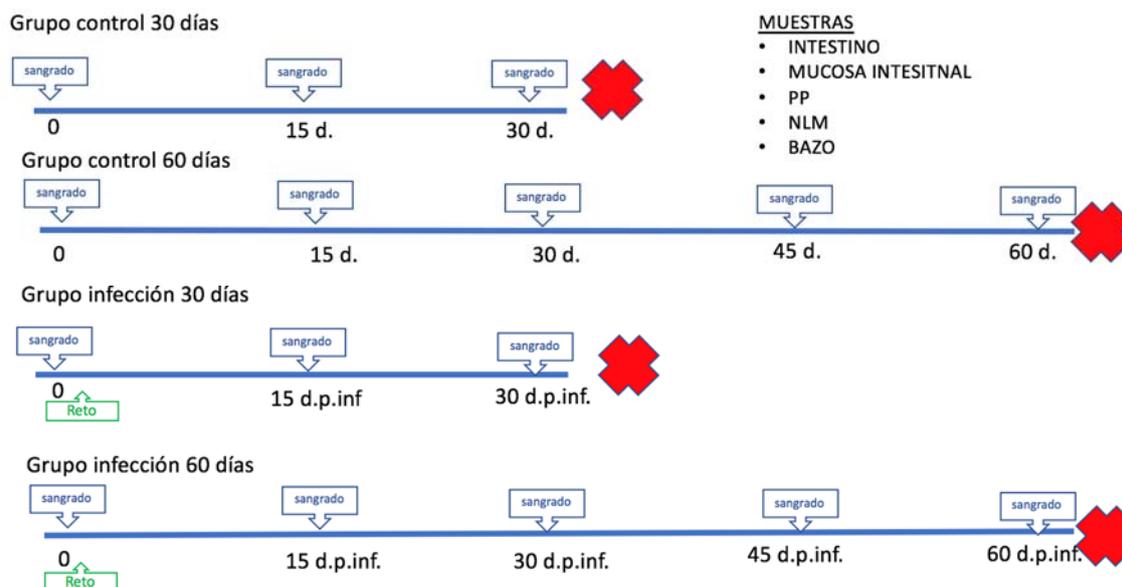


Figura 17.- Esquema de infección y toma de muestras seguidos en los ensayos de infección (d= días; d.p.inf= días post- infección)

3.4. ENSAYOS DE INMUNIZACIÓN

3.4.1. Obtención del antígeno: PP2Ar

La proteína PP2A empleada en los ensayos de inmunización pertenece a la región catalítica de la enzima serina/treonina fosfatasa 2A (PP2A) del nematodo *Angiostrongylus costaricensis*. Para los ensayos de vacunación se empleó como antígeno la proteína recombinante (PP2Ar) clonada por el grupo de Parasitología Molecular del Instituto de Biotecnología de la Universidad de Granada de acuerdo a la metodología descrita por Solano-Parada *et al.* (2010).

Para la expresión de la proteína recombinante PP2A se partió de un cultivo de *Escherichia coli* BL21, previamente transformada con el inserto de PP2A subclonado en el vector pGex2TK (Amersham) por el grupo de Parasitología Molecular antes mencionado. La purificación se llevó a cabo, durante una estancia en la Universidad de Granada, a partir de cultivos de una colonia aislada, en medio 2xYT/ampicilina (100 µg/mL) e incubados a 37 °C durante 12-15h. Se le añadió al cultivo IPTG a una concentración final de 0,5 mM en las 3 últimas horas de cultivo, para inducir la expresión de la proteína recombinante. El cultivo fue centrifugado a 6.000 r.p.m. durante 10 min y el precipitado se resuspendió en tampón de lisis (Tris-HCl 50 mM pH 8,0; NaCl 500 mM; EDTA 10 mM; β-mercaptoetanol 5 mM; lysozima 0,35 mg/mL) e incubado a temperatura ambiente durante 30 min, tiempo tras el cual se sonicó y centrifugó a 13.000 r.p.m. durante 30 min. La proteína PP2Ar se encontró en el precipitado formando cuerpos de inclusión, lo cual se comprobó mediante electroforesis SDS-PAGE al 12,5%

y, posteriormente por inmunodetección con suero de conejos inmunizados con la proteína recombinante. El procedimiento de *Western-blot* e inmunodetección se describe en el apartado 3.8.3.

Una vez obtenido, el precipitado se resuspendió en PBS con Tritón X-100 (Sigma-Aldrich®) al 1%, se sonicó y se centrifugó a 13.000 r.p.m. durante 30 minutos. El procedimiento se repitió dos veces. Finalmente, se resuspendió en PBS (NaCl 137mM; KCl 2,7mM; Na₂HPO₄ 10Mm y KH₂PO₄ 1,8mM) y se almacenó a -20°C hasta su utilización como antígeno en los ensayos de inmunización.

3.4.2. Vías de inmunización

Los ensayos de inmunización realizados en esta Tesis, se han llevado a cabo principalmente a través de mucosa intranasal, combinando esta vía de administración con la inmunización vía subcutánea.

Mayoritariamente se ha utilizado la inmunización intranasal (Figura 18). Para ello, se inmoviliza el ratón con una de las manos y en posición cúbito prono, se depositan con una pipeta automática, pequeñas gotas en la cavidad nasal que el animal absorbe al inspirar. Este método sólo es recomendable para administrar dosis pequeñas de alrededor de 50 µL.



Figura 18.- Administración vía intranasal en ratón con micropipeta.

La otra vía de administración empleada, en combinación con la intranasal, ha sido la vía subcutánea (Figura 19). Para la inoculación en este caso, se cogió la parte superior del tronco del animal y se inyectó bajo la piel la solución inmunógena en un volumen de 100 µL.



Figura 19.- Inmunización vía subcutánea con inyección.

3.4.3. Diseño experimental

El protocolo general seguido en los ensayos de vacunación se muestra en la Figura 20. Se realizaron varias tandas experimentales utilizando diferentes grupos de animales en función de las fórmulas vacunales y las vías de administración. En todos los casos se realizó una extracción de sangre inicial y una extracción cada 10 días. En el momento del sacrificio se obtuvieron muestras de intestino, mucosa, tejidos y órganos inmunosactivos.

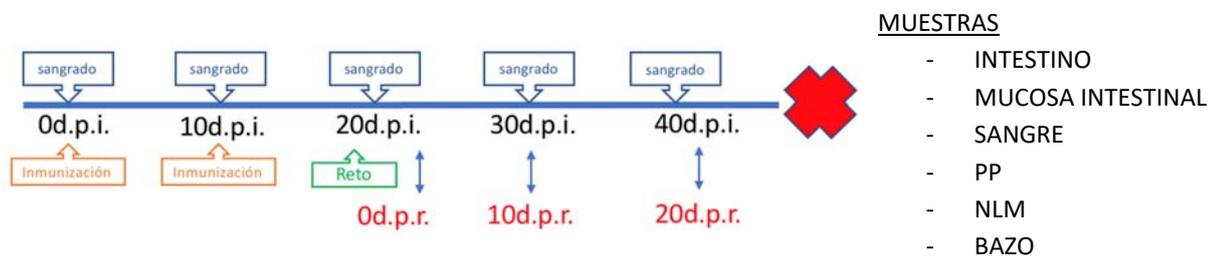


Figura 20.- Diseño experimental de los ensayos de inmunización frente *A. tetraoptera*. Se realizaron dos inmunizaciones y se retó a los 20 d.p.i. (días post-inmunización) cambiando la nomenclatura a d.p.r (días post-reto). A lo largo del experimento se obtuvieron muestras de sangre cada 10 días.

Los animales destinados a los diferentes ensayos de inmunización se distribuyeron en 3 grupos: grupo control de animales NO INMUNIZADOS, grupo control denominado ADYUVANTES, y un grupo experimental denominado FORMULA VACUNAL (Figura 21).

El grupo de NO INMUNIZADOS (NI), recibió PBS en lugar de vacunación y posteriormente se subdividió en 2 subgrupos: el subgrupo Control (C), que no recibió ningún tratamiento más y fue sacrificado a los 20 días tras la administración del PBS (20 d.p.i); y el subgrupo denominado "Infectados" (INF), en el que los animales fueron retados con 2 hembras, equivalente a 100 huevos de *A. tetraoptera*/ratón, constituyendo un control del curso de la infección.

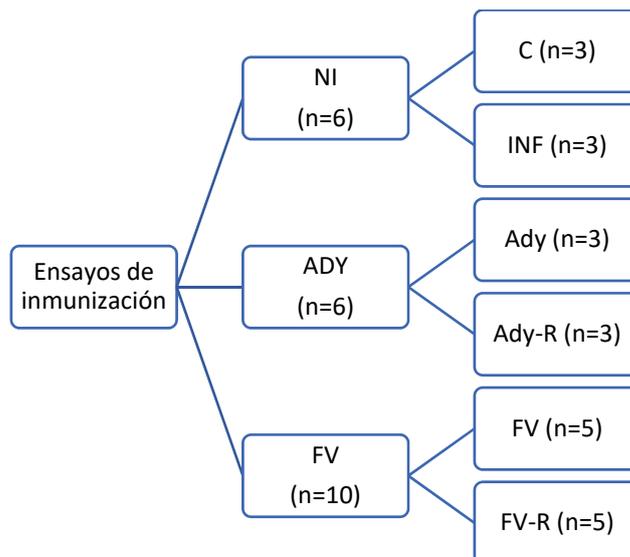


Figura 21.- Grupos y subgrupos de animales que constituyeron los ensayos de inmunización.

En el segundo grupo control, denominado “ADYUVANTES” (grupo ADY), los animales fueron inoculados en la fase de inmunización, tan sólo con la solución adyuvante utilizada en la vacunación combinada con la proteína recombinante PP2Ar, para observar la respuesta que podían generar por sí mismos los adyuvantes. Igual que en el caso anterior, se dividieron en dos subgrupos, el primero de ellos “Adyuvantes” (Ady), no fue infectado posteriormente, mientras que el resto de animales se retaron con 100 huevos de *A. tetraptera*/ratón constituyendo el subgrupo “Adyuvantes+Reto” (Ady-R).

El grupo experimental fue inoculado con diferentes fórmulas vacunales que contenían el antígeno y que se denominó FÓRMULA VACUNAL (FV). Cada grupo FV también se subdividió en dos subgrupos: uno, solo inmunizado (FV), y otro inmunizado y retado con 100 huevos de *A. tetraptera*/ratón, el subgrupo “FV+Reto” (FV-R). Las distintas fórmulas vacunales empleadas se describirán más adelante.

Como se indica en la Figura 20, tanto el PBS, como los diferentes adyuvantes y fórmulas vacunales fueron administradas dos veces, con 10 días de diferencia entre ellas. Se emplearon vías de administración combinadas: intranasal/intranasal (in/in) y subcutánea/intranasal (sc/in).

3.4.4. Fórmulas vacunales

Las diferentes fórmulas vacunales ensayadas se administraron en un volumen de 50µL para la inmunización intranasal y de 100 µL para la vía subcutánea.

A continuación, se describen las fórmulas vacunales utilizadas en esta Tesis y se detallan las cantidades de antígeno y adyuvantes administradas por ratón.

3.4.4.1. Fórmula vacunal PP2Ar-Paredes bacterianas-Carboximetilcelulosa: FV-CMC

En esta fórmula se utilizó como antígeno 4µg de la proteína recombinante PP2Ar obtenida tal y como se ha descrito en el apartado 3.4.1. Como adyuvantes se utilizó una combinación de paredes bacterianas (PB) y carboximetilcelulosa CMC (que le da nombre a la fórmula) en las siguientes proporciones para un volumen final de 50 µL:

- **FV-CMC:** 4 µl (1 µg/µL) PP2Ar + 0,2 µL PB (0,8 µg/ µL) + 45,8 µL CMC (1% en PBS).

El monofosforil lípido A es un componente no tóxico derivado del lipopolisacárido de las paredes celulares bacterianas que se utiliza en la inmunización. Las paredes bacterianas se obtienen a partir de bacterias *E. coli* Estas promueven la captura y la maduración de las células dendríticas, estimulando así una fuerte respuesta Th2 cuando la vía de administración es por mucosa. Por lo tanto, los antígenos cuando se administran por vía intranasal se absorben y desencadenan una respuesta inmunitaria en la mucosa, que abre un futuro muy prometedor para su uso en vacunas (Onah & Nawa, 2000). Las paredes bacterianas fueron obtenidas en el Instituto de Biotecnología de la Universidad de Granada.

Por su parte, los mucoadhesivos se emplean como adyuvantes en inmunización de mucosas porque ejercen un efecto “parche” que permite la absorción y presentación del antígeno de forma más escalonada. Entre ellos hemos utilizado la CMC (Guinama Laboratorios®), un compuesto orgánico derivado de la celulosa compuesto por grupos carboximetilo enlazados con los grupos hidroxilo de la celulosa. Utilizado como carboximetilcelulosa sódica (NaCMC) al 1% tiene propiedades hidrófilas. Debido a su estructura lineal, posee una alta viscosidad y facilidad para formar películas, por lo que es empleado como espesante y estabilizante de emulsiones. En la formulación de vacunas sus propiedades adhesivas pueden ayudar en la administración intranasal, favoreciendo la retención del antígeno en la mucosa y retrasando la liberación de los péptidos asociados (Banerjee *et al.*, 2012; Ninan *et al.*, 2013).

3.4.4.2. Fórmula vacunal PP2Ar-Paredes bacterianas-Plurónico: FV-PLU

En esta fórmula se utilizaron también 4µg de la proteína recombinante PP2Ar como antígeno. Como adyuvantes se utilizó una combinación de paredes bacterianas (PB) y Plurónico F127®, PLU (Sigma-Aldrich®) (que le da nombre a la fórmula) en las siguientes proporciones para un volumen final de 50 µL:

- **FV-PLU:** 4 µl (1 µg/µL) PP2Ar + 0,2 µL PB (0,8 µg/ µL) + 45,8 µL PLU.

El Pluronic F127®, es un copolímero de polioxietileno-polioxipropileno termorreversible, capaz de pasar de estado líquido a gel a la temperatura corporal. Además, es un tensioactivo no iónico de baja toxicidad con propiedades bioadhesivas y humectantes. Se ha comprobado su efectividad en la administración intranasal de fármacos, disminuyendo la eliminación del fármaco de la cavidad nasal debido al aclaramiento mucociliar y ayudando a disminuir la irritación (Müller *et al.*, 2015).

3.4.4.3. Fórmula vacunal PP2Ar-Polietilenimina: FV-PEI

En este caso la mezcla consiste en 4µg de la proteína recombinante PP2Ar con Polietilenimina (PEI) (Sigma-Aldrich®) como adyuvante:

- **FV-PEI:** 4 µl (1 µg/µL) PP2Ar + 50 µL Polietilenimina.

La Polietilenimina (PEI) se obtiene a partir de monómeros de etilenimina y es el polímero orgánico de mayor carga orgánica conocida, además es inocuo y no pierde sus propiedades tampón en medio fisiológico (Arenal *et al.*, 2003). A nivel inmunológico es capaz de formar complejos a nanoescala con el antígeno y facilita la captación por parte de las Células Presentadoras de Antígeno (APC).

3.4.4.4. Fórmula vacunal PP2Ar-OVS: Lipopéptido

En esta última fórmula vacunal, el antígeno empleado para los ensayos de inmunización es el resultado de la unión química de la proteína recombinante PP2Ar, a moléculas de oleico-vinil sulfona (OVS), formando una biomolécula o lipopéptido de PP2Ar. Este péptido fue sintetizado en el Instituto de Biotecnología de la Universidad de Granada (por parte del equipo del Prof. Santoyo de Química Orgánica). La concentración a la que se inoculó el lipopéptido fue de 1,6 µg/µL en 50 µL de PBS.

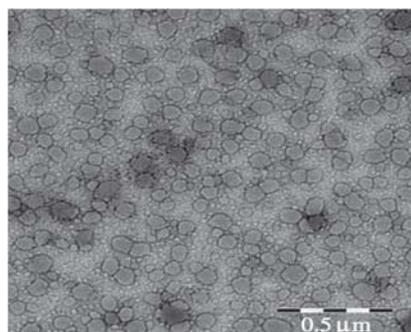


Figura 22.- Micelas formadas por el lipopéptido PP2Ar-OVS. Imágenes obtenidas con microscopía electrónica de transmisión (Gómez-Sambas *et al.*, 2017).

El lipopéptido forma micelas de $46,66 \pm 6,40$ nm de diámetro (Figura 22) (Gómez-Samblas *et al.*, 2017), lo cual condiciona y facilita la presentación antigénica del péptido recombinante.

3.5. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS PROTEICOS

Los adultos de *A. tetrapetra* se obtuvieron a partir de animales infectados de forma natural, así como a partir de los ratones infectados experimentalmente. Como se ha descrito en el apartado anterior, tras el sacrificio, se aisló la fracción del intestino grueso donde se alojan estos nematodos y se diseccionó longitudinalmente, bajo la lupa binocular, para la extracción de los vermes que se lavaron exhaustivamente con tampón PBS para eliminar material contaminante. Se recogieron 200 adultos en 700 μ L de PBS en presencia de inhibidor de proteasas (Complete Mini EDTA-free, Roche®) y se congelaron a -80°C .

Para la obtención del extracto total o antígeno completo, los vermes, aún congelados, se sonicaron en hielo siguiendo el siguiente protocolo: 5 ciclos de 30 segundos con un intervalo de 30 segundos entre ellos para evitar el sobrecalentamiento de la muestra. La suspensión resultante se trituró con un pistón acoplado a un taladro hasta que la mezcla fue totalmente homogénea. A continuación, se centrifugó a 13.200 r.p.m. durante 10 minutos se recuperó el sobrenadante (proteínas solubles).

La concentración total de proteína del extracto se determinó mediante el sistema comercial *Protein Assay* (Bio-Rad®), basado en el método de Bradford de cuantificación de proteínas solubles (Bradford, 1976). Éste se fundamenta en los cambios de coloración que se producen en el Azul de Coomassie brillante G-250 cuando se une a diferentes concentraciones de proteína. Para la cuantificación de cada muestra se mezcló 10 μ L de cada una de ellas con 200 μ L del reactivo de Bradford (1:5). Para la cuantificación de los extractos se realizó una recta patrón empleando concentraciones crecientes de una dilución de BSA (de 0,1 mg/mL a 10 mg/mL). Cada muestra se analizó por duplicado. Se procedió a la lectura de los datos de absorbancia a 595 nm en lector *iMark Microplate* (Bio-Rad®), y utilizando el software *Microplate Manager 5.0* (Bio-Rad®). El sobrenadante con el extracto de proteínas se almacenó a -20°C hasta su uso.

3.6. OBTENCIÓN DE SECCIONES DE COLON Y MUCOSA INTESTINAL

Con el fin de analizar la respuesta inmunitaria a nivel intestinal se obtuvieron tanto secciones intestinales, como un raspado de la mucosa del intestino grueso. Una vez sacrificados los animales se tomó una parte de colon proximal de 0,5 cm de longitud cercana al ciego, y se fijó en 300 μ L de solución *Karnovsky* (Paraformaldehído 2%-Glutaraldehído 2,5%). Para el

posterior análisis histológico e inmunohistoquímica se realizaron cortes en la sección de Microscopia del SCSIE de la Universitat de València.

El resto de intestino grueso se empleó para la obtención de mucosa intestinal. Para ello, se diseccionó longitudinalmente con una tijera fina y se añadió sobre él un 1 mL de EDTA 50mM (Sigma-Aldrich®), inhibidor de proteasas (1X) (Complete Mini EDTA-free, Roche®) y azida de sodio (0,05%) como bacteriostático y se raspó suavemente con un cubreobjetos hasta obtener la mucosa. El material mucoso resultado del raspado se recogió en tubos de 15 mL. Se centrifugó 20 min a 2.500 r.p.m., se recuperó el sobrenadante en microtubos y se conservó a -80°C hasta su utilización.

3.7. OBTENCIÓN DE MUESTRAS SANGUÍNEAS

Para analizar los niveles y la cinética de los anticuerpos séricos se extrajo sangre de los animales en varios tiempos y situaciones experimentales, tal y como se esquematiza en los protocolos experimentales anteriores: a tiempo 0 al inicio del estudio; a diferentes tiempos post-inmunización (d.p.i.); a diferentes tiempos post-infección (d.p.inf o d.p.r); y en el punto final de los estudios. La sangre se recogió en microtubos con anticoagulante EDTA (Deltalab®).

La sangre total fue extraída mediante punción en el seno venoso submandibular tras la inmovilización del animal (Figura 23). En las extracciones rutinarias se obtuvieron un máximo de 100 µL de sangre por animal, y en la extracción en el punto final se llegó hasta los 300 µL. Las gotas de sangre se recogieron en microtubos con EDTA y se centrifugaron a 10.000 r.p.m. durante 10 minutos para separar el plasma del paquete globular. El plasma se guardó a -80°C para su posterior utilización.



Figura 23.- Extracción sanguínea submandibular.
(Fuente: www.usal.es)

Para el recuento leucocitario por citometría de flujo se necesitaron 100 µL de sangre total obtenida del seno venoso. Adicionalmente, antes de sacrificar a los animales, se tomó una gota de sangre de la cola y se realizó un frotis sobre un portaobjetos para el recuento leucocitario por microscopia.

3.8. RECUENTO LEUCOCITARIO

Durante este trabajo se ha realizado el recuento leucocitario utilizando dos técnicas. Inicialmente para el recuento leucocitario por microscopía se utilizaron los frotis de sangre obtenidos a partir de la sangre de la cola del animal. Los frotis se fijaron por inmersión en metanol durante 3 minutos, para posteriormente teñirse mediante Tinción comercial Giemsa (Sigma-Aldrich®) (conteniendo azul de metileno, eosina y varios azúcares en dilución acuosa) diluida 1:10 en PBS y pH 6,8. Los portaobjetos con los frotis se sometieron a inmersión vertical durante de 10 minutos en esta solución, seguido de un lavado con abundante agua corriente tras el cual los portaobjetos se dejaron secar al aire para poder examinarlos con el objetivo de inmersión.

La tinción empleada permite la diferenciación de leucocitos en base a la morfología nuclear y la coloración de los gránulos citoplasmáticos (Figura 24).

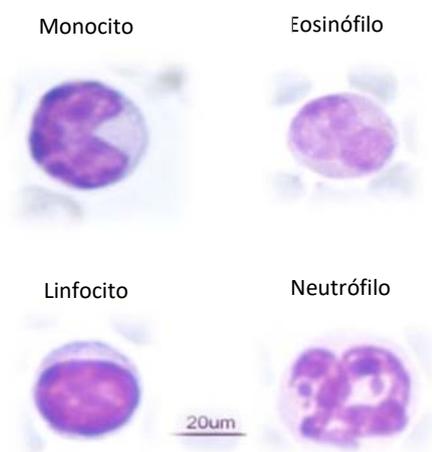


Figura 24.- Características morfológicas de los diferentes grupos de leucocitos en sangre periférica de ratón teñido con hematoxilina-eosina.

Para la visualización y estudio de los frotis se utilizó el microscopio Nikon Eclipse 50I® conectado a un video monitor en color. Sólo las células con un núcleo visible y contorno rojo fueron contadas como positivas. El recuento se realizó a 100x sobre un total de 200 células de la línea blanca (eosinófilos, monocitos, neutrófilos y linfocitos) expresando el resultado en tanto por ciento.

En los ensayos de vacunación el recuento leucocitario se llevó a cabo mediante citometría de flujo. Se recogieron 100 µL de sangre total del seno venoso y se realizó el marcaje celular con anticuerpos anti-CD45. Se trata de un marcador molecular que está expresado de manera constitutiva en todas las células hematopoyéticas, en los diferentes linajes leucocitarios. Sin embargo, mientras que las células eritroides y las plaquetas pierden su expresión a lo largo de su diferenciación, permanece estable en las células leucocitarias maduras permitiendo su detección y conteo.

Como se ha mencionado, 100 μ L de cada muestra de sangre se incubaron con 10 μ L el anticuerpo anti-CD45 conjugado con FITC (eBiosScience™) (0,2 μ g/ μ L), durante 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad.

Tras la incubación, se añadió a cada muestra 2 mL de la solución de lisis BD Pharmalyse™ (1X). BD PharmaLyse™ es un reactivo de lisis concentrado (10X) a base de cloruro de amonio tamponado. Cuando se diluye a una concentración de 1X y se usa según lo recomendado, lisa glóbulos rojos después de la tinción con anticuerpos monoclonales. La solución de lisis da como resultado una buena separación por dispersión de luz de los linfocitos y los restos de glóbulos rojos cuando se analiza mediante citometría de flujo. Se dejó incubar 5 minutos a temperatura ambiente y se analizaron los resultados con el citómetro de flujo Amnis ImageStream®. Al realizar citometría el tamaño celular es muy pequeño y por eso se debe proceder de forma precisa a la hora de fijar el umbral (threshold) que permita distinguir las células de interés del ruido de fondo ya que es probable que alguna partícula presente en nuestra muestra pueda ser de tamaño similar a donde fijamos el umbral. El tiempo que dure el corte en la llegada de fotones al detector será proporcional al diámetro, y por tanto el volumen, celular. Este estudio de interrupción frontal del haz laser se denomina en términos anglosajones como Forward Scatter.

3.7. ENZIMOINMUNOENSAYO (ELISA INDIRECTO)

Con la finalidad de analizar los niveles de anticuerpos en plasma y mucosa asociados a la infección por *A. tetraoptera* y a los ensayos de vacunación, se realizó la técnica ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) de forma indirecta.

Se empleó este método inmunoenzimático para la detección de los isotipos de inmunoglobulinas IgM, IgG, IgE e IgA en plasma; e IgAs, IgE e IgG en mucosa. Las diluciones óptimas de trabajo se determinaron previamente probando diferentes concentraciones de anticuerpo primario (plasma y mucosa) y secundario (Tabla 2). Se utilizaron anticuerpos secundarios anti-ratón frente a cada isotipo conjugados con peroxidasa (goat anti-mouse marcado con peroxidasa, GAM-PO) (Nordic-MUBio, Netherlands).

Tabla 2.- Diluciones de anticuerpos utilizadas en los ensayos ELISA.

	PLASMA		MUCOSA	
	Primario	Secundario	Primario	Secundario
IgA	1/200	1/2.000	1/100	1/2.000
IgG	1/200	1/4.000	1/100	1/2.000
IgM	1/200	1/4.000	-	-
IgE	1/200	1/2.000	1/100	1/2.000

Se tapizaron placas multipocillo con 100 μ L de volumen final conteniendo 3 μ g de extracto total de *A. tetraoptera* en un "tampón de tapizado" carbonato/bicarbonato, pH 9,6, y se mantuvieron a 4°C durante la noche. Las placas se bloquearon con leche desnatada en polvo al

5% (p/v) en PBS-Tween (Tris-HCl 10mM, NaCl 150 mM y 0,05% Tween; pH 7,6) (PBS-T) durante 1 hora a 37°C, en agitación y posteriormente se incubaron con 100 µL de mezclas de plasma o mucosa a las diluciones indicadas en la Tabla 2, durante 90 minutos a 37°C en agitación suave. Tras ello, se realizaron 3 lavados con PBS-T y se añadieron 100 µL del anticuerpo secundario GAM-PO (obtenidos en cabra y acoplados a peroxidasa) a las diluciones indicadas para el análisis de cada isotipo, y se incubó la placa durante 1 hora a 37°C con agitación. Se utilizó una solución de revelado (solución con cromógeno ortofenilendiamina 0,04% en tampón fosfato-citrato (Na₂HPO₄ 0,2M, ácido cítrico 0,1M; pH5) y sustrato H₂O₂ 0,001%) añadiéndose 100 µL/pocillo y se incubó en oscuridad. La reacción se detuvo con 100 µL/pocillo de HCl 3N. Finalmente se determinaron las absorbancias a 490nm en un lector ELISA (iMark™-Bio-Rad). Cada muestra, se analizó en seis pocillos y los resultados se proporcionaron como la D.O. (densidad óptica) media con la correspondiente S.D. (desviación estándar).

3.8. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

3.8.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida

La separación de proteínas del extracto total de *A. tetraoptera* mediante electroforesis, se llevó a cabo en condiciones desnaturalizantes en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) (Bio-Rad®) al 10%, según el protocolo descrito por Laemmli (1970). Los geles SDS-PAGE constan de una zona superior de empaquetamiento (acrilamida: bisacrilamida al 6%, Tris-HCl 125 mM pH 6,8, SDS 0,1%) y una zona inferior de separación (acrilamida: bisacrilamida al 10%, Tris-HCl 375 mM pH 8,8, SDS 0,1%).

Las muestras se mezclaron con tampón Laemmli (2x) (Sigma-Aldrich®) (SDS 4%, glicerol 20%, 2-mercaptoetanol 10%, azul de bromofenol 0,004% y Tris-HCl 0,125M, pH 6,8) (Harlow & Lane, 1988). Tras hervir las muestras a 100°C durante 5 minutos para la desnaturalización de las proteínas, se cargaron en cada pocillo un máximo 40 µg de lisado total de proteínas en un volumen de 25 µL de muestra. En todos los geles se cargó un marcador de peso molecular para proteínas, concretamente el marcador Precision Plus Protein (Bio-Rad®). La primera parte de la electroforesis (empaquetamiento) se realizó a 40 V mientras que para la segunda parte (resolución) se utilizó 100 V, en un equipo de electroforesis vertical modelo Mini-Protean 3 (Bio-Rad®). El tampón de electroforesis usado estaba compuesto por glicina 0,19 M, SDS 0,1%, pH 8,3 ajustado con Tris.

3.8.2. Tinción de geles

Para visualizar las bandas proteicas obtenidas en el gel, tras la electroforesis del extracto total, este se tiñó con una solución de Azul de Coomassie (Coomassie Brilliant Blue R-250, Bio-Rad®) durante 45 min en agitación, y posteriormente se decoloró con una solución decolorante (Metanol 25%; ácido acético 0,7%).

3.8.3. Transferencia a membranas (*Western-blot*) e inmunodetección

Para detectar las proteínas inmunoreactivas, tras la electroforesis, las proteínas fueron electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa (Amersham Hybond-ECL, Healthcare®). Para la transferencia se utilizó el sistema Mini-Trans-Blot (Bio-Rad®). El proceso se realizó a 200 mA durante 1 hora y 30 minutos en tampón de transferencia (Tris 0,25M, glicina 1,92M y metanol 20%). Al finalizar, las proteínas transferidas a las membranas se tiñeron sumergiéndolas durante 5 minutos en agitación, en una solución de Rojo Ponceau (Sigma-Aldrich®) al 0,5% (p/v) en acético glacial 1%, y decolorando con una solución de ácido acético glacial 1% hasta la aparición de las bandas. Esta tinción se realizó para comprobar la eficiencia de la transferencia proteica y obtener un control interno de carga.

Para la inmunodetección de las inmunoglobulinas presentes en el plasma de los animales en respuesta a la infección y/o inmunización, en primer lugar, se bloquearon todos los sitios de unión no específicos utilizando una solución de bloqueo de leche desnatada en polvo 5% (p/v) en PBS-T durante 1h en agitación. Tras eliminar la solución de bloqueo, se incubaron con el anticuerpo primario, en nuestro caso presente en los plasmas o mucosas (diluidos 1/100 en PBS-T) durante 1 hora a 37°C en agitación. Tras esto, se realizaron 3 lavados de 15 minutos con PBS-T. Como anticuerpo secundario se utilizaron anti-inmunoglobulinas de ratón obtenidas en cabra y acopladas a peroxidasa (GAM-PO (Nordic-MUbio, Netherlands)), diluido 1/20.000 en PBS-T) y se incubó en estufa a 37°C durante 1 hora. Se volvió a lavar la membrana 3 veces con PBS-T, durante 15 minutos en agitación para retirar el exceso de anticuerpo secundario, y se reveló por quimioluminiscencia mediante el sistema comercial ECL Select™ Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare®) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para analizar las imágenes se utilizó el aparato ChemiDoc XRS system (Bio-Rad®) y el software Quantity One (Bio-Rad®).

3.9. HISTOLOGÍA INTESTINAL

3.9.1. Obtención de cortes histológicos

Las secciones intestinales obtenidas tras el sacrificio, se deshidrataron mediante una cadena de alcoholes para poder embeberlos en parafina, ya que esta no es miscible en agua y los tejidos están formados principalmente por agua. Primero se sumerge en alcohol al 30% durante 1 hora, tras ellos pasaremos los cortes por alcoholes de diferentes concentraciones durante una hora, la concentración sería 50%, 70%, 90%, 95% y finalmente durante 2-4 horas en alcohol 100%. Se realizaron cortes seriados de 4 µm de espesor (semifinos) de cada sección, utilizando un microtomo. Aprovechando la hidrofobicidad de la parafina, las secciones se colocaron sobre agua calentada a unos 35°C a 40°C y gracias al calor se extienden sin llegar a su punto de fusión, que está en torno a los 60°C. El estiramiento se realizó sobre los propios portaobjetos cubiertos de agua y colocados sobre una plancha térmica regulable. Una vez que el agua se hubo evaporado y se extendieron las tiras de cortes de parafina sobre el portaobjetos,

se procedió a un secado exhaustivo en una estufa a una temperatura de entre 35°C y 40°C durante toda la noche. Una vez secos, los portaobjetos con las secciones están listos para el procesamiento posterior.

Para conseguir la máxima adherencia al vidrio la superficie del portaobjetos, sobre los que se coloca la muestra, debe de estar tratada previamente. Se utilizaron portaobjetos Apex™ Superior Adhesive Slide (Leica Biosystems®) para microscopía, recubiertos por un material adhesivo especial con cargas positivas, que promueven la adhesión del tejido, y proporciona una mayor hidrofilia, lo que crea una base más idónea para una cobertura homogénea usando colorantes y reactivos acuosos, lo que permite una tinción efectiva.

3.9.2. Tinción con Hematoxilina-Eosina

La tinción con Hematoxilina-Eosina (HE) es una de las más utilizadas en histología sobre cortes con parafina; el uso de un colorante básico (hematoxilina) y otro ácido (eosina) permite teñir las estructuras celulares (cromatina nuclear, retículo endoplasmático, matriz extracelular, citoplasma...) de diferentes colores y facilitan el análisis histológico.

Antes de llevar a cabo la tinción se requiere de un tratamiento de desparafinado y posterior hidratación, consistente en 2 pasos de inmersión de los cortes histológicos de 5 minutos en xileno, un paso de 5 minutos en etanol de 100°, un paso de 5 minutos en etanol de 96°, un paso de 5 minutos en etanol de 80° y un último paso de 1 minuto en agua destilada en agitación, como se muestra en la Figura 25.

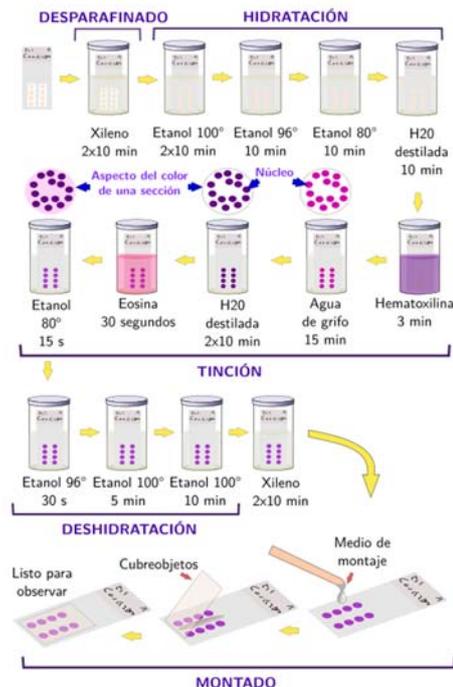


Figura 25.- Tinción histoquímica Hematoxilina-Eosina sobre cortes de parafina. (Fuente: Universidad de Vigo).

Para la tinción se embebieron los cortes en hematoxilina de Mayer (Sigma-Aldrich®) (hematoxilina certificada 1,0 g/L, yodato sódico 0,2 g/L, sulfato alumínico amónico 12H₂O 50 g/L, hidrato de cloral 50 g/L y ácido cítrico 1 g/L) durante 3 minutos, a continuación, un lavado con agua del grifo durante 15 minutos para posteriormente hacer dos lavados con agua destilada de 10 minutos cada uno. Se prosiguió con una inmersión en eosina al 0,2% durante 15 segundos y después etanol 80° durante 15 segundos.

A continuación, se volvió a realizar una deshidratación, pasando de alcohol menos concentrado a más concentrado, 30 segundos en etanol de 96°, 5 y 10 minutos en etanol de 100° y terminamos con 2 inmersiones de 10 minutos en xileno.

Para finalizar, se procedió al montaje para microscopía Eukitt (Sigma-Aldrich®) que contiene un 45% de resina acrílica y un 55% de xilenos. Es un adhesivo y conservante de muestras, de secado rápido, que puede usarse manualmente y en equipos de cobertura automática.

3.9.3. Tinción con PAS-Hematoxilina

Los cortes histológicos de colon fueron sometidos a la tinción PAS (ácido periódico y reactivo de Schiff), que tiñe componentes celulares con hidratos de carbono, como la parte glucídica de las glicoproteínas, las mucinas del moco que recubre el epitelio intestinal y las del interior de las células caliciformes de la mucosa del intestino.

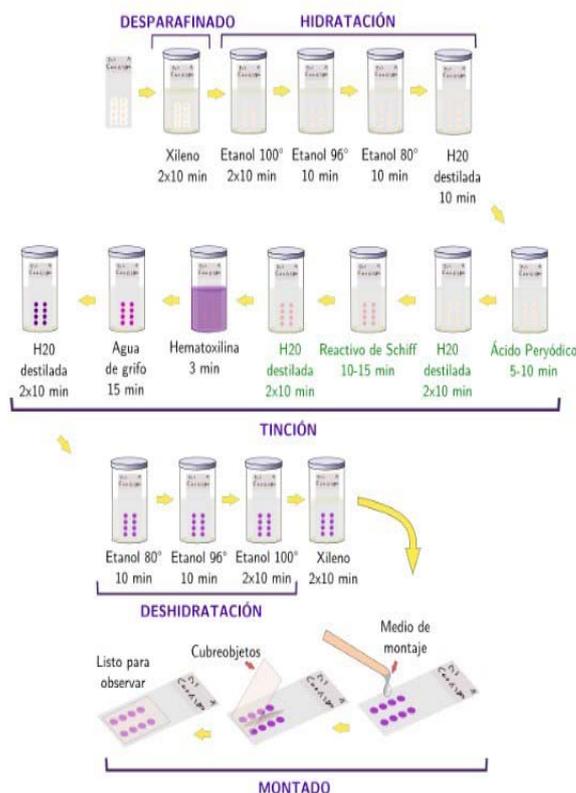


Figura 26.- Tinción histoquímica PAS-Hematoxilina sobre cortes de parafina. Los pasos con letras en color verde son los específicos para esta tinción. (Fuente: Universidad de Vigo).

Como se muestra en la Figura 26, los pasos seguidos fueron similares a los descritos en el apartado anterior: desparafinado con xileno e hidratación de los cortes fijados por cadena de alcoholes y agua. En este caso para la tinción se utilizó ácido peryódico durante 5 minutos; dos lavados de 10 minutos con agua destilada; reactivo de Schiff (Merck®) durante 10 minutos; dos lavados con agua destilada; inmersión durante 3 minutos en hematoxilina de Mayer (Sigma-Aldrich®); un lavado con agua del grifo durante 15 minutos y otros 2 con agua destilada durante 10 minutos cada uno. Por último, se llevó a cabo la cadena de deshidratación de alcoholes y xileno previa al montaje para microscopía con el medio Eukitt (Sigma-Aldrich®).

3.9.4. Inmunohistoquímica

La inmunohistoquímica es un procedimiento que se basa en la utilización de anticuerpos que se unen específicamente a la molécula que se quiere identificar en un tejido. En este trabajo se llevó a cabo esta técnica con el fin de analizar la respuesta inmunitaria intestinal (expresión de quimioquinas y células del sistema inmunitario (neutrófilos) asociada a los ensayos de infección y vacunación realizados.

Como paso preparatorio, todas las muestras deben ser desparafinadas para lo cual fueron incubadas en estufa a 60°C durante 30 minutos para eliminar la parafina, lo que se conoce como “lagrimeo”. Después, se sometieron a una cadena de hidratación, como se ha explicado en el punto 3.9.2. A continuación, se realizó un desenmascaramiento antigénico mediante calor. Esto es necesario debido a que la inclusión en parafina puede alterar la estructura de los antígenos diana e interferir en la respuesta de la unión entre el antígeno y el anticuerpo. Para ello se sumergieron los cortes en una solución de citrato sódico 10 mM a pH 6-7 y se autoclavaron a 120°C durante 10 minutos, tras lo cual se dejaron enfriar a temperatura ambiente.

Para cada molécula se analizaron tres secciones de intestino por ratón. Los portaobjetos fueron cubiertos con 100 µL de cada reactivo a la concentración requerida para una total cobertura. Todo el proceso se realizó sobre un agitador, en cámara húmeda y temperatura ambiente.

Tras la cadena de hidratación se añadió borohidruro de sodio (Sigma-Aldrich®) al 1% (p/v), para estabilizar los enlaces aldehídos, durante 5 minutos para, a continuación, bloquear los sitios de unión inespecíficos con una solución de BSA (albúmina de suero bovino) (Sigma-Aldrich®) al 5% (p/v) y Triton X-100 al 0,2% (v/v) en PBS durante 1 hora. Tras el bloqueo se realizaron 3 lavados con PBS, y se incubó con los anticuerpos primarios (diluido 1/50) durante una hora. Tras realizar otros 3 lavados se añadió el anticuerpo secundario marcado con fluorescencia correspondiente (Alexa Fluor®) (diluido 1/150) durante 30 minutos y en oscuridad (Tabla 3).

Tras realizar 3 lavados con PBS, se añadió Sudan Black B (Sigma-Aldrich®), al 0,3% en etanol durante 10 minutos en oscuridad. Este colorante ayuda a bloquear la autofluorescencia,

la cual puede comprometer significativamente los estudios de inmunofluorescencia y dar lugar a falsos positivos (Oliveira *et al.*, 2010). Los cortes se lavaron 8 veces con PBS y se añadió el marcador fluorescente DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) (Invitrogen®), que se une fuertemente a regiones enriquecidas en adenina y timina en secuencias de DNA.

La disolución de DAPI (5 mg/mL) se diluyó 1/1.000 en PBS, y se añadió un volumen de 100 µL suficiente para cubrir los portaobjetos, manteniéndose durante 1 minuto en oscuridad, tras el cual se realizó un último lavado. Finalmente, se realizó el montaje con el medio Fluoromount (Sigma-Aldrich®) para medio acuoso, que no requiere de deshidratación previa.

Tabla 3.- Anticuerpos utilizados en el estudio, especificidad y fluorocromos.

Ac. Primario	Nº cat.	Ac. Secundario	Nº cat.
<i>Rabbit anti-Gro/CXCL1</i>	Ab17882	Donkey anti-rabbit IgG (H+L) Alexa Fluor® 647	Ab150075
<i>Rabbit anti- IL8</i>	Ab11027	Donkey anti-rabbit IgG Alexa Fluor® 647	Ab150075
<i>Goat anti-CXCL15</i>	AF442	Donkey anti-goat IgG Alexa Fluor® 594	Ab150132
<i>Goat anti-CCL2/MCP1</i>	AF479NA	Donkey anti-goat IgG Alexa Fluor® 594	Ab150132
<i>Goat anti-CCL17/TARC</i>	AF529	Donkey anti-goat IgG Alexa Fluor® 594	Ab150132
<i>Rat anti-Neutrófilo</i> FITC	Ab53453	-	-

Para poder discriminar la posible reactividad inespecífica de los anticuerpos primarios, se utilizaron en todos los grupos y categorías, cortes que se incubaron directamente con el anticuerpo secundario.

El marcaje fluorescente se observó con un microscopio Confocal FV10I-W de Olympus® con el objetivo de 60X y aceite de inmersión.

3.10. EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL Y PCR REVERSA

De cada órgano y tejido aislado (bazo, NLM y placas de Peyer) se obtuvo el RNA total con el kit comercial Rapid Total RNA Purification Kit (Marligen Biosciences Inc.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La cantidad y calidad del RNA se determinó midiendo la relación de absorbancia a 260/280 nm, y para comprobar la integridad del RNA obtenido se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa al 1%.

Si usamos como molde RNA, en lugar de DNA, se habla de una RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa) (*Reverse Transcription-PCR*). La síntesis del cDNA es posible gracias a la reacción llamada transcripción reversa que es controlada por la transcriptasa reversa, capaz de convertir el mRNA en cDNA (cadena complementaria de DNA). 40 ng de RNA total se utilizaron directamente como molde para la síntesis de la primera cadena de cDNA mediante transcripción inversa utilizando el sistema comercial *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems®) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

La retrotranscripción se realizó en un termociclador T100 (Bio-Rad®). Los termocicladores están diseñados para establecer un sistema homogéneo en donde las condiciones de temperatura y tiempo necesarios no se modifiquen en cada uno de los ciclos. En este caso se incubó a 25°C durante 10 min, a 37°C durante 120 min y un último paso de 85°C durante 5 segundos.

3.11. PCR A TIEMPO REAL Y CUANTIFICACIÓN RELATIVA (RT-qPCR)

Los mRNAs de cada citoquina (IL-2, IFN- γ , IL-12, IL-13, TNF- α , IL-4, IL-10, TGF- β , IL-17, IL-23, IL-6, IL-25, IL-21 e IL-9) se amplificaron mediante PCR a tiempo real utilizando cebadores específicos para cada citoquina (Tabla 4). El objetivo de la qPCR es detectar y cuantificar las secuencias específicas de ácidos nucleicos mediante el uso de fluorescencia en la reacción. El término “en tiempo real” se refiere a que la detección de los productos amplificados sucede en cada ciclo de la reacción. Por su parte, el término cuantitativo hace referencia a que es posible cuantificar la cantidad de cDNA amplificado en la muestra de forma relativa respecto a un gen constitutivo como control endógeno cuyos niveles de expresión son estables.

En nuestro caso, hemos utilizado los ensayos *StepOne™ real-Time PCR System* (Applied Biosystems) para el análisis cuantitativo en tiempo real de la expresión de citoquinas. Estos ensayos constan de un par de cebadores de PCR sin marcar para cada citoquina y una sonda TaqMan con fluoróforo de fluoresceína (FAM) en el extremo 5' y un aglutinante menor (MGB) y desactivador de fluorescencia (NFQ) en el extremo 3', solo cuando la sonda se acopla a la cadena molde se emite fluorescencia.

Para un volumen final de 20 μ L, 9 μ L del cDNA obtenido (diluido 1/20 en agua estéril) se añadieron a 10 μ L de TaqMan® Universal PCR Master Mix No AmpErase® UNG (2x) y 1 μ L del TaqMan® Gene Expression Assay (cebadores y sonda). Todos los cebadores de las citoquinas y las sondas marcadas con FAM fueron diseñados por Applied Biosystems® como ensayos TaqMan inventariados (Tabla 4). La TaqMan® Gene Expression Master Mix contiene AmpliTaq Gold® DNA Polymerase que se activa a 94º, una referencia interna pasiva basada en el ROX™ que normaliza las fluctuaciones de la fluorescencia no relacionadas con la PCR.

El termociclador empleado fue el Abi Prism 7000 (Applied Biosystems®) y la amplificación consistió en un paso de 2 minutos a 50°C, un paso de desnaturalización inicial a 94°C durante 10 min y 40 ciclos de amplificación (15 segundos de desnaturalización a 95°C y 1 minuto de alineamiento/elongación a 60ºC). Las muestras se amplificaron por triplicado en

placas de 96 pocillos, conteniendo los controles endógenos (β -actina) y los controles experimentales.

Tabla 4.- Secuencia de oligonucleótidos para cada citoquina y el control endógeno

<i>DIANA</i>		SECUENCIA 5'→3'
<i>β-actina</i>	F	TCCATCATGAAGTGTGACGT
	R	GAGCAATGATCTTGATCTTCAT
<i>IL-2</i>	F	CCACTTCAAGCTCCACTTCA
	R	ATCCTGGGGAGTTTCAGGTT
<i>IFN-γ</i>	F	GCTCTTCTCATGGCTGTTT
	R	GTCACCATCCTTTTGCCAGT
<i>IL-12</i>	F	GACCAAACCAGCACATTGAA
	R	CTACCAAGGCACAGGGTCAT
<i>TNF-α</i>	F	CCCCAAAGGGATGAGAAGTT
	R	CACTTGGTGGTTTGCTACGA
<i>IL-4</i>	F	CCTCACAGCAACGAAGAACA
	R	ATCGAAAAGCCCGAAAGAGT
<i>IL-10</i>	F	CAGAGCCACATGCTCCTAGA
	R	TCATTTCCGATAAGGCTTGG
<i>TGF-β</i>	F	TGGAGCAACATGTGGAATC
	R	AGCCCTGTATTCCGTCTCCT
<i>IL-17</i>	F	TCCAGAAGGCCCTCAGACTA
	R	TCATGTGGTGGTCCAGCTT
<i>IL-23</i>	F	TAATGTGCCCCGTATCCAGT
	R	AGGCTCCCCTTGAAGATGT
<i>IL-6</i>	F	AGTTGCCTTCTGGGACTGA
	R	TCCACGATTTCCAGAGAAC
<i>IL-25</i>	F	ACCACAACCAGACGGTCTTC
<i>IL-21</i>	F	GAGGACCCTTGCTGTCTGG
	R	TCATCTTTTGAAGAAGCCATTT
<i>IL-9</i>	F	TGATTGTACCACACCGTGCT
	R	AGGTCACTCCAACGATACGG

Se calculó el ciclo umbral (Ct). El Ct es el número de ciclos necesarios para que se produzca un aumento de fluorescencia significativo con respecto a la señal de base, y es inversamente proporcional a la cantidad inicial de moléculas molde, para cada muestra y cada control. Para la normalización se utilizó el gen constitutivo de la β -actina como control de expresión. Con el fin de valorar la influencia de la infección o de los ensayos de vacunación en la expresión de citoquinas se empleó un método de cuantificación comparativo (método $2^{-\Delta\Delta Ct}$) (Livak & Schmittgen, 2001), el cual diferencia entre los ciclos umbral del gen de la

citoquina y los ciclos del control para dar resultados de expresión o cantidad relativa (RQ). El cambio en la expresión del gen de interés se normalizó respecto al de la β -actina y a su control negativo para obtener la cuantificación relativa de los niveles de expresión (Klein, 2002).

3.12. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Mediante el programa Statistica® versión 7, los datos fueron sometidos al test de Distribución Normal de *Kolmogorov-Smirnov*, y los análisis de los grupos se realizó aplicando la prueba de *Análisis de Varianza ANOVA* para comprobar si existieron diferencias significativas entre grupos. De existir dichas diferencias, se procedió a una realizar una prueba Duncan para la comparación entre los pares de medias. Cualquier valor de $p < 0,05$ fue considerado significativo.

4. RESULTADOS

4.1. ESTUDIO DEL MODELO EXPERIMENTAL *A. tetraptera* – RATÓN

4.1.1. Determinación de las condiciones óptimas para la infección experimental

Las hembras de *A. tetraptera* realizan la ovoposición de forma periódica, con una puesta durante tres días seguidos y 10 días de descanso. Este proceso se repite alrededor de 5 veces en su vida, con una media de unos 80 huevos por puesta, lo que supone una puesta total de unos 370-400 huevos por hembra (Neuser, 1974).

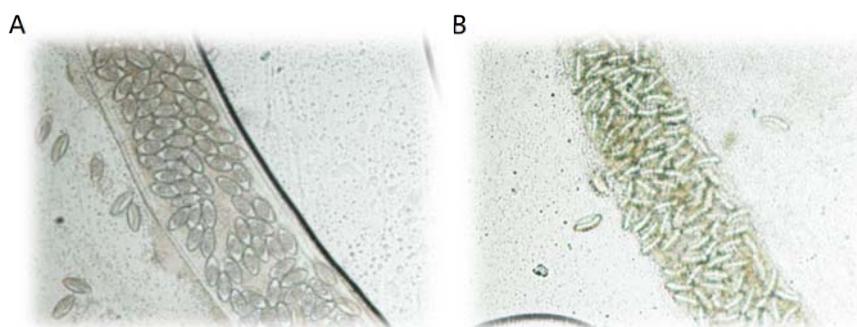


Figura 27.- Útero de una hembra empleada en los ensayos de infección. A: Sección anterior con huevos por embrionar; B: Sección posterior con huevos embrionados tras incubación.

Para realizar la infección experimental, las hembras grávidas (Figura 27A) aisladas a partir de infecciones naturales, se incubaron en estufa a 24°C durante 7 días, ya que los huevos no son infectantes en el momento de la puesta y necesitan entre 6-7 días para completar su embrionación (Figura 27B). Tras la incubación, se contó el número de huevos embrionados por hembra, obteniéndose una media de 50-60 huevos listos para la infección. Basándonos en ensayos de infección previos (Derothe *et al.*, 1996), se realizaron ensayos en grupos de 11 ratones, utilizando 2 y 4 hembras grávidas del nematodo, lo que supondría aproximadamente un total de entre 100 y 120 huevos inoculados, respectivamente. Al mes de la infección y tras sacrificar a los animales se cuantificó el número de parásitos obteniéndose los resultados mostrados en la Tabla 5.

Tabla 5.- Eficacia de la infección según la dosis infectante.

Grupo	n	nº infectados	% infección
2 hembras	11	8	73
4 hembras	11	11	100

En ambos casos se obtuvo un alto porcentaje de infección entre el 73 y el 100%, para animales infectados con 2 y 4 hembras, respectivamente.

En la Tabla 6, se muestra la media de vermes recuperados. Se observa que, aunque se infectaron menos animales retando con 2 hembras, la media de parásitos recuperados es mayor. El rango, que muestra la variación de vermes encontrados en los diferentes animales, también es más amplio en el caso de 2 hembras, lo que significa que, aunque hubo algún animal que no se infectó, los otros estaban más parasitados, hasta llegar a tener 25 vermes, mientras que, en el caso de la infección con 4 hembras, no se cuantificaron más de 13. Por tanto, la tasa de recuperación respecto al número de huevos inoculados es más elevada en el caso de la infección utilizando dos hembras (12,3% vs. 4,7%).

Tabla 6.- Media, rango y tasa de recuperación según la dosis infectante.

Grupo	Media \pm SD	Rango	Tasa de recuperación
2 hembras	9,8 \pm 9,7	[0-25]	12,3 %
4 hembras	6 \pm 4,8	[1-13]	4,7 %

En la Figura 28, vemos una representación gráfica de la distribución de los vermes recuperados por ratón en el caso de 2 y 4 hembras, así como la media representada por una línea.

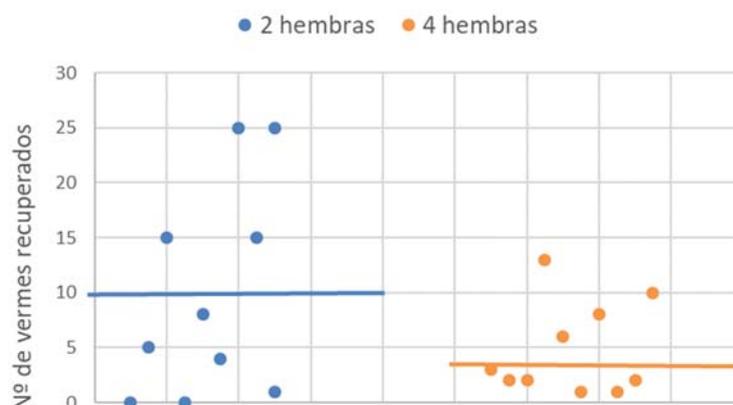


Figura 28.- Representación del número de vermes aislados por animal infectado, con 2 y 4 hembras. Las líneas horizontales muestran la media.

Con los resultados obtenidos se pudo concluir que, aunque el tanto por ciento de infección era inferior en el caso de utilizar 2 hembras, el número de vermes adultos recuperados era mucho mayor, incluso el doble que en el otro grupo. Por tanto, se decidió utilizar esta dosis infectante como la idónea para los estudios posteriores, realizando la infección experimental de los animales con 2 hembras, lo que facilita además la preparación de las dosis infectantes.

El periodo prepatente en el ciclo biológico de *A. tetraoptera* está estimado en 23 días (Anya, 1966). A pesar de que las jaulas se mantengan en una zona experimental de tipo P2 y se limpien cada dos días existe la posibilidad de autoinfección. Por tanto, para el diseño adecuado de los ensayos de vacunación con infecciones controladas primarias se planificó un ensayo determinando el porcentaje de infección y la presencia de distintos estadios evolutivos en el intestino tras diferentes tiempos post-infección, para delimitar así el tiempo de infección para el cual podamos asegurar que no hay probabilidad de autoinfección.

Para ello, se infectaron experimentalmente 22 animales con 2 hembras cada uno y se dividieron en dos grupos de 11 animales según el tiempo de post-infección (30 y 60 días) tras el cual se sacrificaron los animales. Tras 30 días de infección el 73% de los animales estaba infectado, mientras que, a los 60 días, el 100% de los animales estaban parasitados. En la Tabla 7 se muestra la media de parásitos recuperados, el rango, la tasa de recuperación y la presencia de estadios larvarios que aparecen como consecuencia de la autoinfección durante el periodo de estabulación tras la infección primaria.

Tabla 7.- Eficacia de la infección, media, rango, tasa de recuperación y presencia de larvas según el tiempo post-infección (d.p.inf.: días post-infección).

Grupo	Media \pm SD	Rango	Tasa de recuperación	Estadios larvarios
30 d.p.inf.	9,8 \pm 9,7	[0-25]	12,3 %	No
60 d.p.inf.	12,1 \pm 9,1	[1-25]	12,1 %	Sí

El porcentaje de infección y la media de adultos recuperados fue mayor después de 60 días tras la infección, pero es más importante que cuando se sacrificaron los animales tras 30 días de la infección, no se detectó la presencia de estadios larvarios, mientras que después de 60 días sí se encontraron estos estadios larvarios. Estos datos resultan de gran interés en ensayos en los que se busca estandarizar la infección controlando la carga parasitaria.

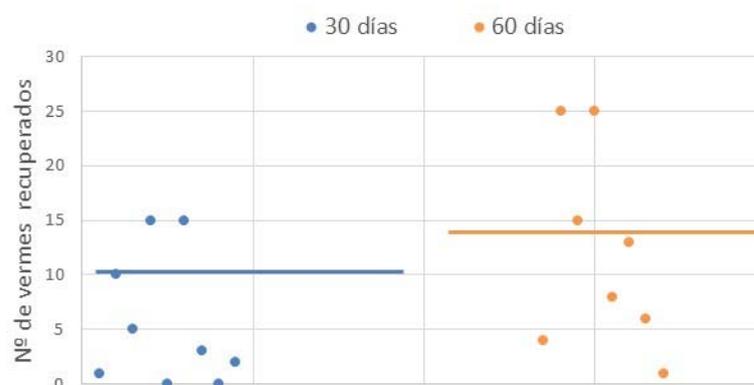


Figura 29.- Representación del número de vermes aislados por animal infectado con 2 hembras, 30 y 60 días tras la infección. Las líneas horizontales muestran la media.

En la Figura 29, vemos representados los datos individuales de vermes recuperados por animal y la media en cada grupo, representada por una línea horizontal. Como hemos comentado, en el caso de los 60 días tras la infección hay mayor número de vermes, pero incluyen estadios larvarios que nos indican infección secundaria tras la experimental y se incapacita la posibilidad de infectar controladamente.

Con estos resultados podemos estandarizar la dosis óptima de infección en dos hembras y el periodo de infección máximo de 30 días.

4.1.2. Variaciones en el recuento leucocitario con la infección

Con el objetivo de caracterizar el modelo de infección experimental *A. tetraptera* – ratón, cada animal fue infectado con dos vermes hembras y se sacrificaron a los 20 días post-infección para así asegurar la ausencia de autoinfección.

Para la determinación de la activación inmunológica a nivel sanguíneo tras la parasitación, se realizó el recuento leucocitario. Mediante el análisis celular de la sangre periférica de los ratones, extraída en el momento del sacrificio, se cuantificaron las diferentes subpoblaciones de leucocitos circulantes.

El recuento leucocitario obtenido para el “grupo estándar de infección”, se comparó con los valores de referencia para ratón (Tabla 8).

Tabla 8.- Recuentos leucocitarios en el grupo de infección y valores de referencia en ratón.

Grupo	Neutrófilos	Linfocitos	Eosinófilos	Otros*
Valores de referencia	[57-67]	[25-33]	[1-3]	[0-7]
Estándar de infección	47,3 %	41,5 %	3,4 %	7,9 %

*monocitos, basófilos.

En sangre circulante de ratón infectado se observó una ligera neutropenia en comparación con los valores normales, y una linfocitosis, con ligeras eosinofilia y monocitosis.

4.1.3. Respuesta inmunológica del ratón frente al nematodo *A. tetraptera*

4.1.3.1. Respuesta de anticuerpos en suero

Con el fin de caracterizar la respuesta inmunológica sistémica del ratón tras la infección estándar con el nematodo *A. tetraptera*, se analizaron mediante ELISA indirecto los niveles de los isotipos IgM, IgG, IgA e IgE, en mezclas de suero (diluidos 1/200) a los tiempos 0 (previo a la infección), 10 y 20 días tras la infección (10 y 20 d.p.inf.). Se procedió como se ha indicado en

Material y Métodos, utilizándose los anticuerpos secundarios a las diluciones indicadas en la Figura 30, y se revelaron los ELISAS midiendo la absorbancia a 490nm.

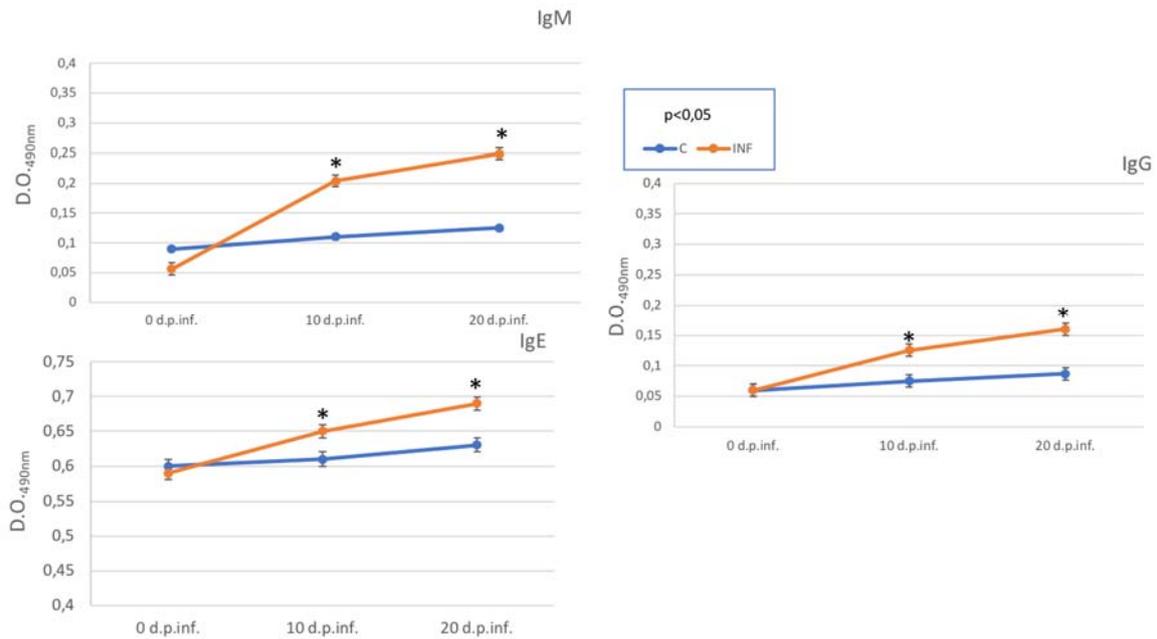


Figura 30.- Respuesta de anticuerpos en suero inducida por la infección de ratones ICR con *A. tetraptera*. La concentración de los isotipos IgM, IgE e IgG se analizó mediante ELISA indirecto frente extracto total de *A. tetraptera* usando mezclas de suero diluidos 1/200 procedentes de animales control (C) o infectados (INF) (n=10/grupo). Los anticuerpos secundarios se diluyeron 1/4.000 para IgM e IgG, y 1/2.000 para IgE. Los datos corresponden a 3 experimentos independientes a tiempo 0 y a 10 y 20 días post-infección-(d.p.inf.). Los datos significativos respecto al control se indican con asteriscos (*) ($p < 0,05$).

Los niveles de IgM en suero aumentan con la infección y alcanzan un valor significativo a los 10 días tras la infección, y continúa aumentando ligeramente a los 20 días (Figura 30). Los valores son significativamente mayores tanto respecto a los valores previos a la infección como respecto a los valores del grupo control, no infectado.

En relación a la IgG en suero, se detectó un incremento progresivo en su concentración, alcanzando su mayor valor a los 20 días tras la infección. Los aumentos detectados en los animales infectados resultaron significativos respecto al control. La variación en la concentración de IgG es muy parecida a IgM, aumentando ambas inmunoglobulinas de forma progresiva.

En el caso de los niveles de IgE, la infección produce un aumento ligero de esta inmunoglobulina a nivel sistémico. Las diferencias respecto al grupo control son significativas. También se estudiaron los valores de IgA, pero no se encontraron diferencias significativas respecto al tiempo de infección ni entre los dos grupos.

4.1.3.2. Respuesta de anticuerpos en mucosa

Como el parásito estudiado es un nematodo intestinal es de esperar que la respuesta inmunitaria más importante sea la que se dé de forma local a nivel de mucosa intestinal. Para valorar si la infección ha provocado un aumento en los niveles de anticuerpos a nivel local, se han determinado mediante ELISA indirecto los niveles de IgA secretora (IgAs) al final del estudio (20 d.p.inf.). Además, como se trataba de caracterizar la respuesta local se analizaron otros dos isotipos: IgG e IgE, que se encuentran aumentados en el suero de animales infectados (Figura 31). Para ello las mucosas se utilizaron diluidas 1/100 y se utilizaron los anticuerpos secundarios diluidos 1:2.000, según se detalla en Material y Métodos.

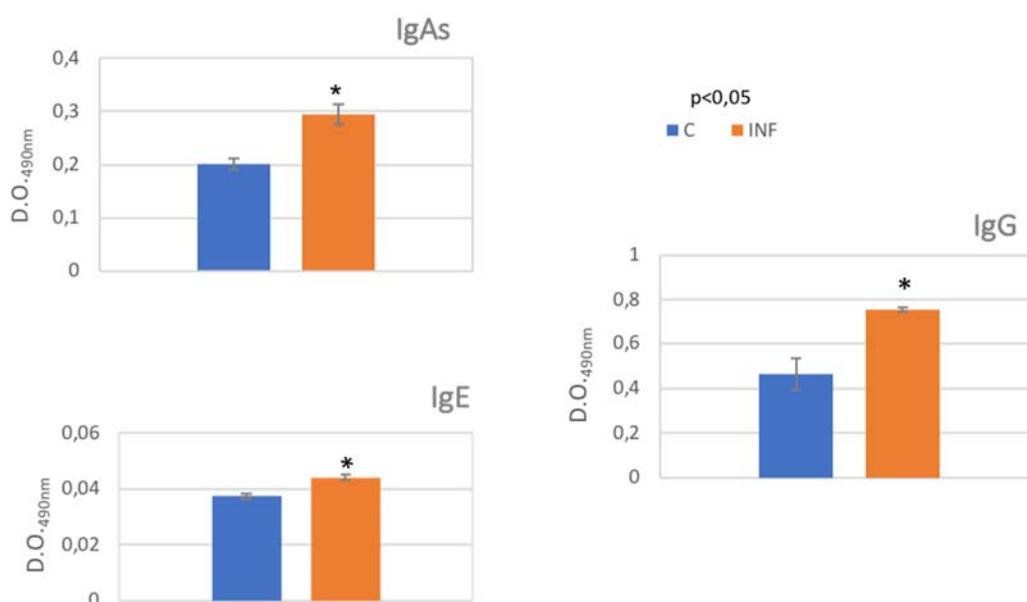


Figura 31.- Respuesta de anticuerpos local en mucosa intestinal inducida por la infección de ratones ICR con *A. tetraaptera*. La concentración de los anticuerpos IgAs, IgG e IgE, fue determinada mediante ELISA indirecto frente extracto total de *A. tetraaptera* usando mezclas de mucosas procedentes de animales control (C) o infectados (INF) (n=10/grupo) obtenidas en el momento del sacrificio y diluidas 1/100. Los anticuerpos secundarios se utilizaron diluidos 1/2.000 para todas las inmunoglobulinas analizadas. Los datos significativos respecto al control se indican con asteriscos (*) (p<0,05).

Se observa un aumento significativo de la concentración de IgA en la mucosa del colon de los animales infectados. El incremento en los niveles de IgA puede ser importante para la neutralización y posterior eliminación del parásito, ya que su liberación específica impide la adhesión del parásito en el intestino (Dixon *et al.*, 2010).

Como es el caso de los resultados descritos en suero, los niveles de IgG aumentan significativamente en la mucosa de los ratones infectados con respecto al control que se relaciona con el aumento a nivel sistémico de la misma.

Igualmente, los niveles de IgE en la mucosa intestinal, también se correlacionan con los datos obtenidos en suero. Como muestra la Figura 31, se ve un aumento significativo de los niveles de IgE en mucosa en el caso de animales infectados respecto a los datos obtenidos en el grupo control, pero este aumento no es tan elevado como en el caso de las otras dos inmunoglobulinas ensayadas.

4.1.4. Análisis de la inmunogenicidad de las proteínas de *A. tetraptera*

Mediante análisis *Western-blot* e inmunodetección, se estudió la especificidad de los anticuerpos anti-*A. tetraptera* analizados mediante ensayo de inmunoenzima, y cuyo aumento se ha descrito en el apartado anterior. Esta técnica nos permitió identificar las bandas correspondientes a las proteínas del extracto total de *A. tetraptera* que son reconocidas por el suero de los animales infectados.

4.1.4.1. Estudio de la especificidad de los anticuerpos en suero

Muestras de 40 µg de proteínas solubles procedentes del lisado total de *A. tetraptera* se separaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 10%, y fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa. Las membranas se tiñeron con Rojo Ponceau para comprobar la eficiencia de la transferencia proteica y disponer de un control interno de carga. Las membranas se cortaron en tiras para enfrentarlas con una mezcla de sueros de animales infectados (INF) y otra de controles. Se analizaron las bandas reconocidas por los anticuerpos IgG.

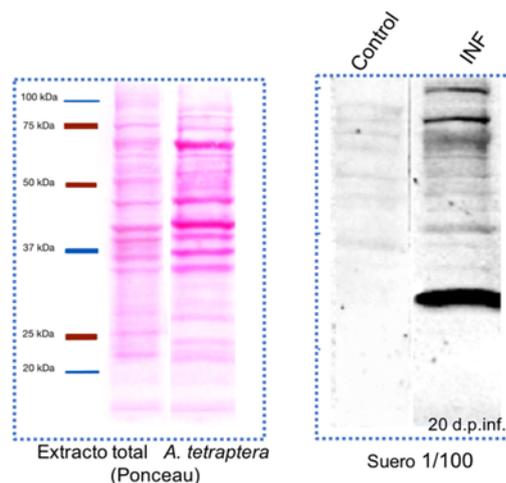


Figura 32.- Las IgGs del suero de animales infectados reconocen específicamente proteínas del extracto total de *A. tetraptera*. 40µg de proteínas de extracto total fueron cargados en un gel SDS-PAGE. Tras la transferencia, las membranas se tiñeron con Ponceau y se incubaron con una mezcla de sueros de ratones control e infectados (20 d.p.inf.) diluida 1/100. Como anticuerpo secundario se utilizó anti-IgG (GAM, diluido 1/20.000).

En el caso de los sueros de animales infectados, se reconoce una banda específica entre 25-37kDa, sugiriendo que la infección por *A. tetraptera* provoca una respuesta inmune específica, en la que una proteína del nematodo es especialmente inmunogénica ya que no se trata de una proteína abundante en el extracto total del parásito, según se observa en la tinción Ponceau.

4.1.4.2. Estudio de la especificidad de los anticuerpos en mucosa

En el caso de la mucosa, se analizaron las bandas inmunogénicas, reconocidas por IgAs, mediante *Western-blot* e inmunodetección, utilizando 40 µg de proteínas del extracto total del parásito y una mezcla de mucosas diluidas obtenidas a partir de los dos grupos de ratones (control e infectado) y utilizando anti-IgA como anticuerpo secundario.

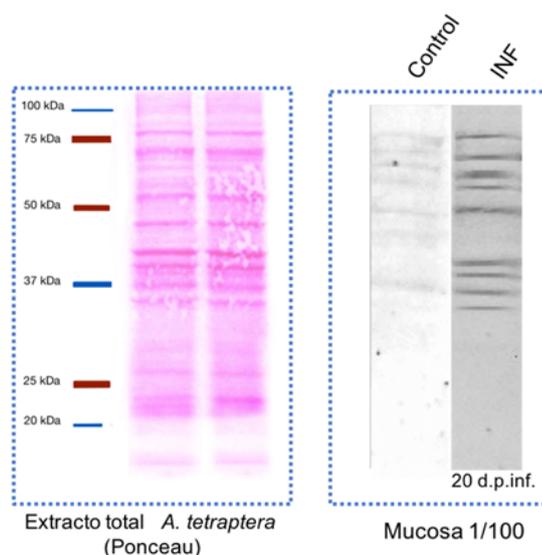


Figura 33.- Las IgAs presentes en la mucosa de animales infectados reconocen específicamente proteínas del extracto total de *A. tetraptera*. 40µg de extracto total de parásito fueron cargados en un gel SDS-PAGE. Tras la transferencia, las membranas se tiñeron con Ponceau y se incubaron con una mezcla de mucosas de ratones control e infectados (20 d.p.inf.) diluida 1/100. Como anticuerpo secundario se utilizó anti-IgA (GAM, diluido 1/2.000).

En la Figura 33, se muestran los patrones de bandas reconocidas por los anticuerpos IgA de mucosa de los animales infectados. En este caso aparecen varias bandas inmunogénicas, por tanto, los anticuerpos locales presentes en mucosa también reconocen específicamente proteínas del parásito, en este caso, diferentes a las reconocidas por las IgG del suero.

4.1.5. Estudio histológico de colon proximal

Para el estudio de los cambios histológicos producidos en colon como consecuencia de la infección por *A. tetraptera* se llevaron a cabo diferentes tinciones de cortes finos intestinales y se analizaron mediante microscopía.

La tinción combinada con hematoxilina-eosina (HE), es muy utilizada en histología debido a que permite visualizar cambios morfológicos facilitando la diferenciación visual de las partes de las células y los diferentes tipos celulares.

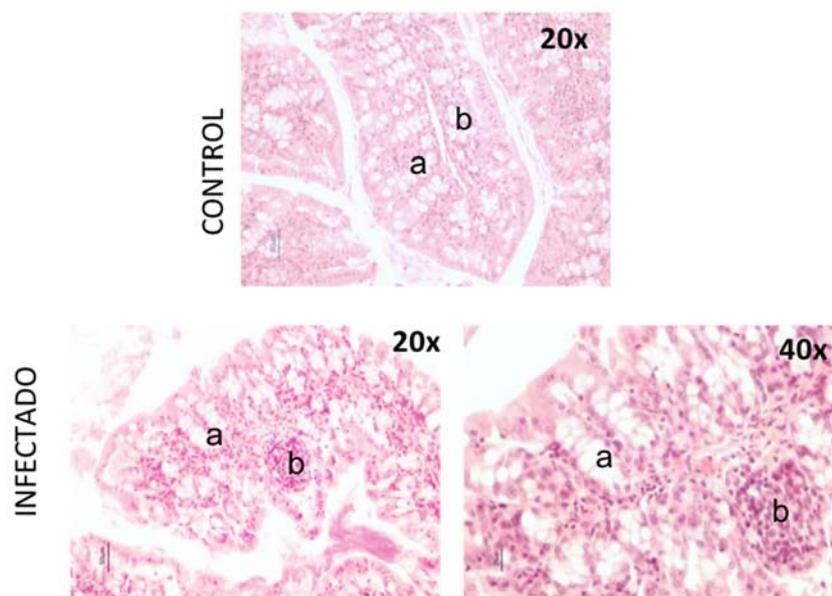


Figura 34.- Corte histológico de mucosa del colon para un animal control y uno infectado teñido con HE. a) Células caliciformes productoras de moco; b) Linfocitos intraepiteliales.

Como consecuencia de la infección, no hay daños a nivel superficial y la morfología general de los pliegues del colon se mantiene. Sin embargo, a nivel celular sí se apreciaron cambios asociados a la infección por el nematodo y la respuesta inmunitaria puesta en marcha, observándose una hipertrofia de las células caliciformes productoras de moco y linfocitosis intraepitelial en el caso de los ratones infectados.

La tinción de PAS (Periodic Acid-Schiff)-hematoxilina es utilizada para marcar los polisacáridos en los tejidos y, por tanto, nos permite observar cambios en la producción de moco (mucinas-glicoproteínas) bien en el interior de las células caliciformes, o bien sobre la superficie de la mucosa, a la que cubre el moco tras ser secretado.

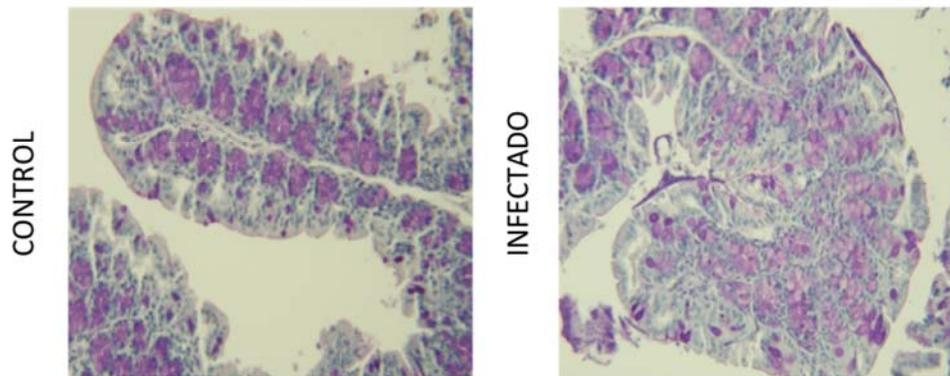


Figura 35.- Corte histológico de la mucosa del colon de un animal control y uno infectado ambos teñidos con PAS-hematoxilina para marcaje de polisacáridos (amplificación 20X).

La tinción con PAS mostró resultados coherentes con los obtenidos para la tinción con Hematoxilina-Eosina. En la Figura 35 se muestra como en el caso de los animales infectados se observa una hipertrofia de las células caliciformes debido a un aumento en la producción de mucinas. El aumento de la producción y secreción de moco constituye uno de los mecanismos de defensa conocidos frente a infecciones intestinales por helmintos impidiendo de forma mecánica el establecimiento del parásito (Trelis *et al.*, 2011).

4.1.6. [Análisis de la expresión de quimioquinas mediante inmunohistoquímica sobre cortes histológicos de colon](#)

Las quimioquinas también conocidas como «citoquinas quimiotácticas» son proteínas de tamaño pequeño y bajo peso molecular (8 a 14 kDa) pertenecientes a la familia de las citoquinas y por tanto clasificadas como moléculas del sistema inmunitario. Las quimioquinas se llaman de este modo debido a que inicialmente fueron identificadas por su capacidad de activar, atraer y dirigir diversas familias de leucocitos circulantes hacia los sitios dañados. Al ser liberadas por células dañadas o infectadas crean un gradiente de concentración que actuará como un quimioatrayente para guiar la migración celular.

Las quimioquinas no sólo participan en la coordinación del movimiento de leucocitos en los procesos inflamatorios, sino que también tienen importancia en múltiples procesos fisiológicos y patológicos: desarrollo, vigilancia, memoria, respuesta y regulación inmunitaria e inflamación...

La inmunohistoquímica, también llamada marcaje inmunohistoquímico se utiliza comúnmente para conocer la ubicación de una proteína dentro de las diferentes partes de una célula o su distribución en un tejido.

A través del empleo de anticuerpos específicos anti-quimioquina marcados con fluorocromos, se pudo localizar y visualizar dichas quimioquinas en cortes histológicos de colon proximal de ratón, tanto en animales control como en animales infectados con *A. tetraptera*, mediante microscopía confocal. El análisis de parámetros inmunohistoquímicos, junto con los histológicos analizados en el punto anterior, nos acercará a una mejor comprensión de la respuesta inmunitaria frente a la infección de los animales de experimentación.

Se analizó la expresión de las quimioquinas CCL2 (MCP-1), CCL17 (TARC), GRO 1 (CXCL1), CXCL15 (Lungkine) e IL-8 (CXCL8). En la Tabla 9, se resumen las células productoras de dichas moléculas y las células sobre las que tienen efecto atrayente.

Tabla 9.- Quimioquinas analizadas: células origen y células atraídas

	PRODUCIDA POR:	ATRAYENTE DE:
<i>CCL2</i>	Monocitos, macrófagos y células dendríticas	Monocitos, linfocitos T de memoria y células dendríticas
<i>CCL17</i>	Células dendríticas	Linfocitos T
<i>GRO 1</i>	Células del melanoma	Macrófagos, neutrófilos y células epiteliales
<i>CXCL15</i>	Células broncoepiteliales	Neutrófilos
<i>IL-8</i>	Fibroblastos, células endoteliales, monocitos, macrófagos y células dendríticas	Neutrófilos

En primer lugar, se definieron las regiones del colon en las que se analizaría la señal de fluorescencia mediante microscopía confocal, tras el marcaje con anticuerpo específicos, mediante microscopía confocal, en función de las quimioquinas analizadas (Figura 36).

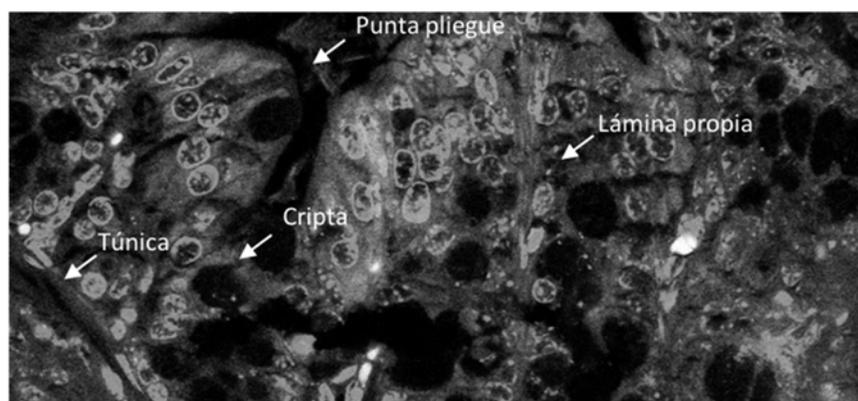


Figura 36.- Regiones principales de la mucosa de colon donde se analizó el marcaje con fluorescencia tras la inmunohistoquímica.

La intensidad de fluorescencia fue claramente mayor en los intestinos de los ratones infectados con *A. tetraoptera*, en el caso de las quimioquinas atrayentes de neutrófilos, GRO 1 y CXCL15, indicativo de una mayor expresión de las mismas asociadas a la infección. Nuestros resultados sugieren que la infección lleva asociada principalmente el reclutamiento de neutrófilos y macrófagos a la zona de infección como mecanismos de defensa. No se observó un aumento de expresión de CCL2, CCL17 ni IL-8 como consecuencia de la infección.

En la Tabla 10 se resumen los resultados obtenidos para las quimioquinas cuyo aumento se ha descrito tras la infección. En cada caso, para tratar de indicar la intensidad de la señal de fluorescencia observada al microscopio, correspondiente al marcaje específico observada al microscopio, se emplearon los siguientes códigos: (-) ausencia de señal; (+) marcaje específico.

Tabla 10.- Intensidad de fluorescencia según la quimioquina y la región analizada.

		CONTROL	INFECTADO
GRO 1	Pliegue	-	-
	Túnica	-	+
	Lámina propia	-	+
	Criptas	-	+
CXCL15	Pliegue	+	++
	Túnica	-	-
	Lámina propia	+	++
	Criptas	-	++

Las señales fluorescentes más intensas se observaron para la quimioquina CXCL15, cuya expresión aumenta tras la infección en varias regiones: punta de pliegue, lámina propia y criptas (Figura 37).

Destaca el marcaje a nivel del citoplasma de los enterocitos epiteliales y el marcaje asociado al moco contenido en las células caliciformes.

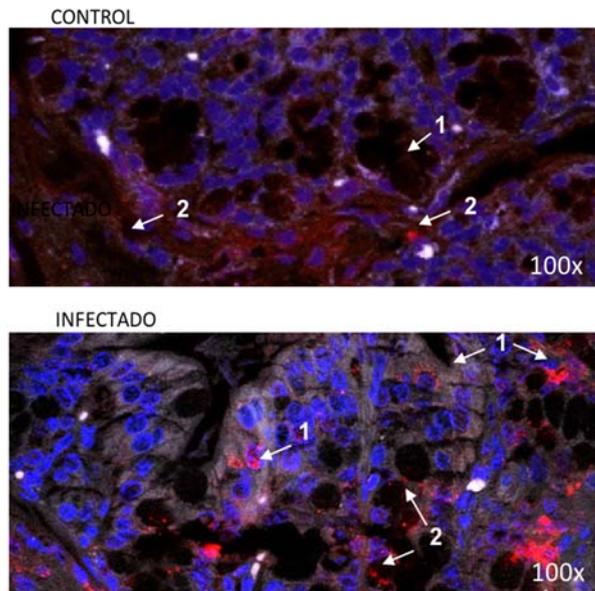


Figura 37.- Marcaje de CXCL15 (rojo) en cortes histológicos de colon de ratón. El color azul corresponde a los núcleos celulares teñidos con DAPI. (1) Enterocitos epiteliales; (2) Moco de las células caliciformes.

4.1.7. Determinación de la expresión de citoquinas en tejidos y órganos linfoides tras la infección

Las citoquinas son las responsables de la polarización de la respuesta inmunitaria en función de la naturaleza del agente infeccioso para orquestar de forma efectiva la defensa. Se llevó a cabo el análisis de su expresión en los órganos y tejidos inmunoactivos: bazo, Nódulo Linfático Mesentérico (NLM) y Placas de Peyer (PP), mediante PCR cuantitativa a tiempo real en muestras procedentes de animales control e infectados, tras su sacrificio. Debido a la importancia de las citoquinas en la modulación de la respuesta inmunitaria, su análisis ofrece datos sobre el tipo de respuesta generada en el hospedador. Las citoquinas analizadas fueron: IFN- γ , IL-12, TNF- α , IL-2, IL-10, TGF- β , IL-4, IL-17, IL-23, IL-6, IL-25, IL-21 e IL-9.

4.1.7.1. Perfil de expresión de citoquinas en bazo

En bazo ha aumentado, de forma significativa, la expresión de las citoquinas IL-23, IL-10, IL-12, IL-13, y TGF- β en los animales infectados (Figura 38).

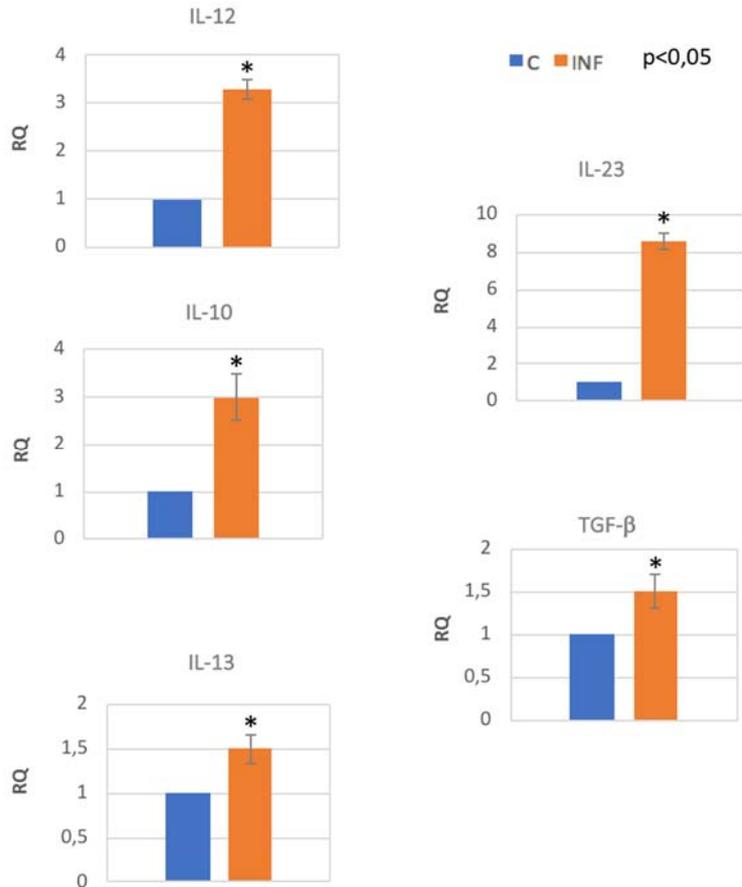


Figura 38.- Niveles de citoquinas expresadas en bazo de ratón tras la infección por *A. tetraoptera*. Cantidades relativas (RQ) de expresión (mRNA) respecto a los animales control y normalizado con β -actina. Las barras verticales muestran la desviación estándar. (C: control; INF: infectado). (*) Diferencia significativa ($p < 0,05$).

Las citoquinas mostradas son marcadores de la respuesta sistémica que genera la infección intestinal con el nematodo. La IL-23 es la citoquina con un mayor aumento en su expresión, seguido de las citoquinas IL-10 e IL-12. El perfil de citoquinas nos indica una respuesta predominante frente a la infección de tipo Th17 en presencia de IL-23 que actúa como factor de proliferación del Th17 desde los Th0 y cierta participación de Tregs productores de TGF- β e IL-10 para controlar el daño del hospedador.

4.1.7.2. Perfil de expresión de citoquinas en Nódulo Linfático Mesentérico

Entre las citoquinas analizadas en NLM, se observa que los niveles de IFN- γ , IL-12, TNF- α , IL-2, IL-10, TGF- β , IL-25 e IL-21 aumentan significativamente tras la infección con *A. tetraoptera* (Figura 39).

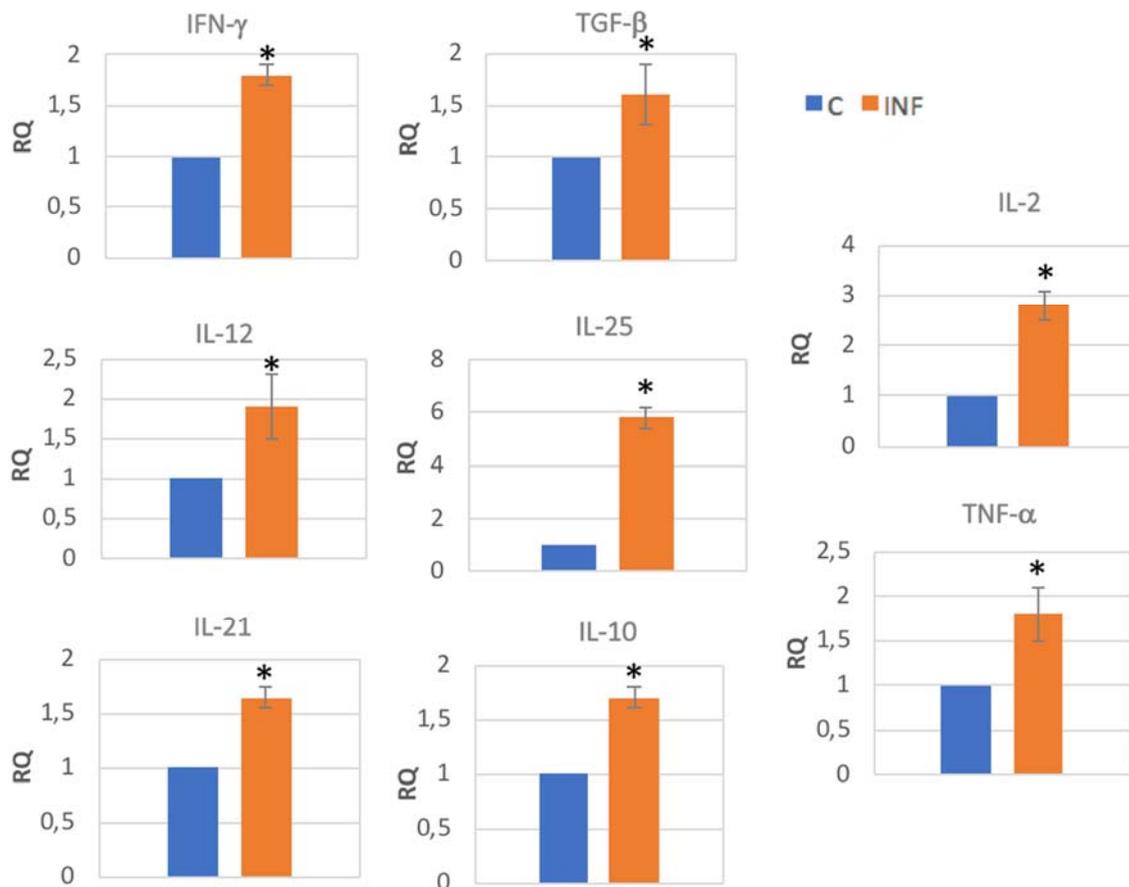


Figura 39.- Niveles de citoquinas expresadas en NLM de ratón tras la infección por *A. tetraptera*. Cantidades relativas (RQ) de expresión (mRNA) respecto a los animales control y normalizado con β -actina. Las barras verticales muestran la desviación estándar. (C: control; INF: infectado). (*) Diferencia significativa ($p < 0,05$).

Entre las citoquinas sobreexpresadas, IFN- γ , IL-2, IL-12 y TNF- α son propias de la respuesta Th1, mientras que IL-21 es producida por los Th17, apareciendo de nuevo cierto carácter regulador asociado (TGF- β e IL-10). Destacan los niveles tan elevados de IL-25, citoquina producida por las células intestinales (Tuft cells) en respuesta a una agresión y cuyo objetivo sería el tratar de activar la vía Th9 para poner en marcha mecanismos de control de la infección.

Estos datos sugieren que la infección genera una respuesta primaria Th1/Th17 que facilita al establecimiento del parásito y ante esta situación de invasión se deriva hacia en una respuesta Th9 por la aparición de IL-25 para controlar la superproducción de IFN- γ y TNF- α con la expulsión o control de la carga parasitaria.

4.1.7.3. Perfil de expresión de citoquinas en Placas de Peyer

Las placas de Peyer constituyen un tipo tejido linfoide situado en la submucosa que acompaña a los enterocitos a lo largo del intestino delgado, generando respuestas locales frente a antígenos intestinales. De nuevo se analizaron para este tejido todas las citoquinas nombradas anteriormente.

Los niveles de expresión de las citoquinas IL-12, IL-6, IL-17, IL-23, IL-25, IL-21, IL-9 e IL-10 incrementaron significativamente tras la infección (Figura 40), destacando por su sobreexpresión la IL-21 y la IL-25. En este caso, siendo el tejido que directamente contacta con el agente infeccioso intestinal y sus productos de excreción/secreción, se observa una respuesta semejante a la detectada en nódulos linfáticos mesentéricos, pero más marcada.

El perfil de citoquinas descrito nos muestra un equilibrio entre una respuesta inicial de instauración de la infección tipo Th17, que se acompaña de la sobreexpresión de: IL-6, IL-23, IL-21 e IL-17, y la respuesta Th9 promovida por el epitelio intestinal de control o eliminación del parásito promovida por la IL-25 y resultando en la producción de IL-9.

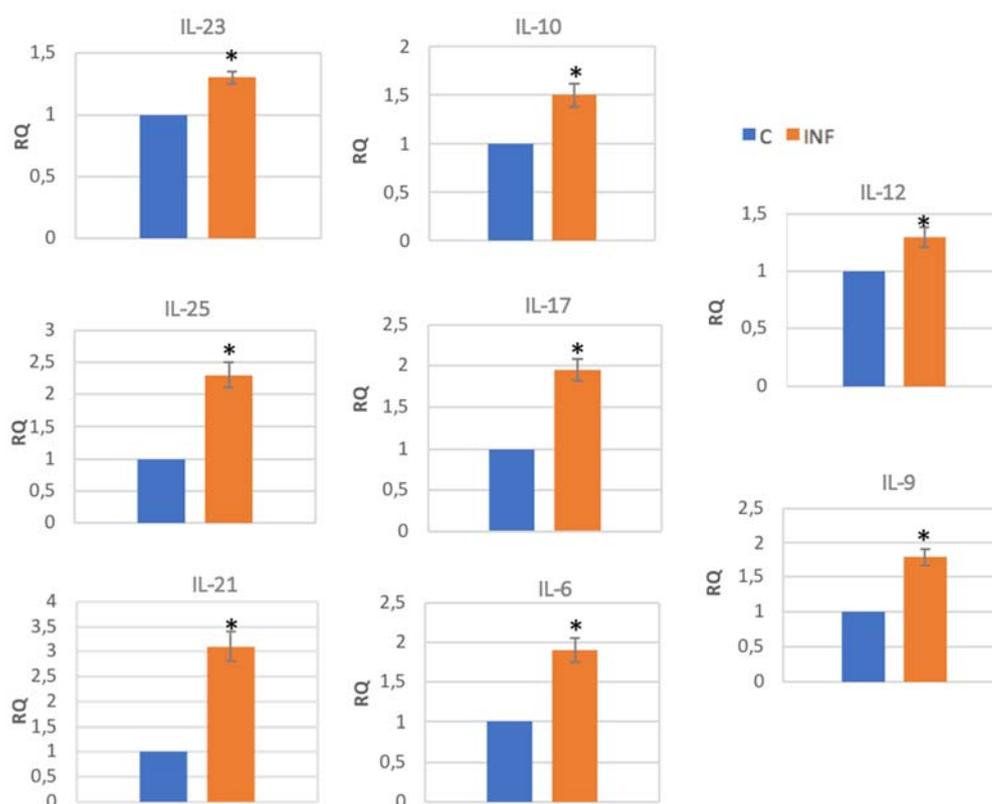


Figura 40.- Niveles de citoquinas expresadas en PP de ratón tras la infección por *A. tetraoptera*. Cantidades relativas (RQ) de expresión (mRNA) respecto a los animales control y normalizado con β -actina. Las barras verticales muestran la desviación estándar. (C: control; INF: infectado). (*) Diferencia significativa ($p < 0,05$).

4.2. ENSAYOS DE VACUNACIÓN EN EL MODELO EXPERIMENTAL *A. tetraptera*-RATÓN

Tras conocer las condiciones óptimas para la infección con *A. tetraptera* en ratón, y una vez caracterizada la respuesta inmunológica del ratón frente al parásito, se empleó este modelo experimental para la realización de ensayos de vacunación estudiando la capacidad protectora del péptido PP2A recombinante (PP2Ar). Estos ensayos se realizaron utilizando el péptido PP2Ar formando parte de diferentes formulaciones. El primer paso fue analizar la eficacia y seguridad de éstas.

4.2.1. Evaluación de la eficacia de la vacunación con el péptido PP2Ar según la fórmula y la vía de administración

Como se ha detallado en el apartado de Material y Métodos, las fórmulas vacunales ensayadas incluyen el antígeno constituido por el péptido recombinante (PP2Ar) combinado con: a) FV-CMC: mucoadhesivos como la carboximetilcelulosa (CMC) para conseguir un efecto “parche” sobre la mucosa nasal y paredes bacterianas como inmunoestimulante; b) FV-PLU: Plurónico (PLU) y paredes bacterianas; c) FV-PEI: Polietilenimina (PEI) por su capacidad de formar complejos a nanoescala con el antígeno; y d) el lipopéptido PP2Ar-OVS, molécula que conjuga la proteína recombinante con la oleico vinil sulfona (OVS).

Con el fin de seleccionar la formulación de la vacuna más efectiva frente a las infecciones por *A. tetraptera*, se analizó la eficacia protectora de las distintas fórmulas empleando diferentes pautas de administración. La vía intranasal (in) constituye una vía de inoculación idónea para los ensayos de vacunación por su fácil administración y por su capacidad para desarrollar respuestas inmunitarias de mucosa. Sin embargo, en este trabajo se investigó si la combinación con la vía de administración subcutánea (sc) potenciaría el efecto de la vacuna. Por tanto, se siguieron dos protocolos de administración, en un caso se realizó una inmunización repetida, consistente en dos inmunizaciones intranasales (in/in); y en un segundo protocolo se realizó una primera inmunización vía subcutánea seguida de otra intranasal (sc/in).

En primer lugar, se analizaron los resultados tras el protocolo de doble inmunización intranasal, con 10 días de diferencia, seguida de la infección experimental o reto. Tras el sacrificio de los animales, a los 20 días post-reto (d.p.r.) se llevó a cabo un recuento de los vermes y se obtuvieron los siguientes datos de infección respecto al grupo denominado “control de infección” (INF), los cuales no recibieron inmunización previa a la infección (Tabla 11).

Las fórmulas que ofrecieron mayor protección, por mostrar valores de infección inferiores al grupo INF, son la fórmula PLU (FV-PLU), con un 80% de protección, sólo 3 de los 15 animales resultaron infectados; y la fórmula CMC (FV-CMC) con la que se obtuvo una protección del 73%. La utilización de ambas fórmulas, además de proporcionar el menor porcentaje de animales infectados, provocó que los animales infectados mostraran una carga parasitaria más baja, con un máximo de 5 vermes con la FV-CMC y 1 verme con la FV-PLU. Estas dos fórmulas tienen en común, por un lado, el empleo de mucoadhesivos o espesantes que probablemente

hayan condicionado la presentación antigénica y hayan dificultado el aclaramiento mucociliar de las mismas y, por otro lado, la inmunomodulación proporcionada por las paredes bacterianas.

Tabla 11.- Número de animales ensayados (n) con cada formulación y resultados de infección tras una doble inmunización intranasal (in/in). Media, desviación estándar y rango de vermes recuperados. (Lipopéptido: PP2Ar-OVS, CMC: carboximetilcelulosa, PLU: plurónic, PEI: polietilenimina).

FV (in/in)	n	nº infectados	% de protección	Media ± SD	Rango
<i>INF</i>	15	12	20	11,4 ± 9,9	[0-20]
<i>Lipopéptido</i>	10	8	20	32,7 ± 26,8	[0-60]
<i>Fórmula CMC</i>	15	4	73	1,8 ± 3,6	[0-5]
<i>Fórmula PLU</i>	15	3	80	0,4 ± 0,5	[0-1]
<i>Fórmula PEI</i>	5	4	20	15,0 ± 21,8	[0-40]

Por el contrario, el grupo que recibió el lipopéptido PP2Ar-OVS, al igual que el grupo inmunizado con FV-PEI, presentaron porcentajes de infección similares al grupo control no inmunizado (INF). En cuanto a la carga parasitaria, en ambos casos se obtuvieron valores medios muy superiores al control. Por tanto, con estos resultados se descartó la utilización de estas dos fórmulas vacunales para la inmunización de ratones frente al nematodo *A. tetraoptera* ya que, lejos de proteger, parecen favorecer la infección tanto por los datos de porcentaje de infección como por las medias de vermes recuperados tras la infección.

Paralelamente, se analizó la eficacia de las distintas formulaciones tras su administración siguiendo la pauta de inmunización combinada, primero subcutánea y a los 10 días una inmunización intranasal, seguida de la infección experimental. El procedimiento seguido es igual al descrito anteriormente, haciéndose un recuento de vermes tras el sacrificio a los 20 d.p.r. (Tabla 12).

Tabla 12.- Número de animales ensayados (n) y resultados de infección tras una doble inmunización subcutánea/intranasal (sc/in). Media, desviación estándar y rango de vermes recuperados. (Lipopéptido: PP2Ar-OVS, CMC: carboximetilcelulosa, PLU: plurónic, PEI: polietilenimina).

FV (sc/in)	n	nº infectados	% protección	Media ± SD	Rango
<i>INF</i>	15	12	20,0	11,4 ± 9,9	[0-20]
<i>Lipopéptido</i>	5	4	20,0	12,7 ± 5,8	[0-30]
<i>Fórmula CMC</i>	10	3	70,0	1,8 ± 1,3	[0-5]
<i>Fórmula PLU</i>	10	4	60,0	2,1 ± 3,2	[0-6]
<i>Fórmula PEI</i>	5	4	20,0	32,4 ± 11,2	[0-40]

Los datos obtenidos con esta vía de inmunización muestran que las fórmulas con mayor capacidad protectora han sido, como en el caso anterior, FV-CMC y FV-PLU; consiguiendo elevados porcentajes de animales no infectados, con un 70% y un 60%, respectivamente. Además de menos animales infectados, en aquellos en los que sí se detectaron vermes, se contabilizaron muy pocos ejemplares. Tampoco en este caso, con el cambio de vía de administración, las otras dos fórmulas, Lipopéptido PP2Ar-OVS y FV-PEI, demostraron conferir protección, por lo que quedan descartadas como posibles fórmulas vacunales ya que a pesar de compartir el mismo péptido recombinante que las otras dos fórmulas, tal vez el efecto de los mucoadhesivos fuera necesario para estimular una respuesta inmunitaria protectora.

Analizado el conjunto de los datos de eficacia de protección obtenidos, se seleccionó a las fórmulas FV-CMC y FV-PLU para continuar con los estudios de vacunación utilizando la doble administración vía intranasal, por mostrar mejores resultados.

Un aspecto esencial en la formulación de vacunas es la elección de los adyuvantes adecuados para potenciar la respuesta frente al antígeno inoculado, así como la combinación con inmunomoduladores que promueva determinados tipos de respuesta. Por ello, se realizaron de forma paralela ensayos incluyendo grupos de animales a los que se les inoculó únicamente los adyuvantes (Ady) (mucoadhesivos y paredes bacterianas) siguiendo el mismo protocolo de vacunación e infección experimental, para evaluar los efectos de los adyuvantes por sí mismos sobre la infección.

Tabla 13.- Niveles de protección obtenidos con FV-CMC y FV-PLU según la vía de administración (in: intranasal; sc: subcutánea). Grupos ensayados: FV-R: fórmula vacunal con PP2Ar y reto; Ady-R: adyuvantes y reto.

	Vías de administración	Inmunización	% de protección
FV-CMC	in/in	Ady-R (n=9)	30,0
		FV-R (n=15)	73,3
	sc/in	Ady-R (n=6)	40,0
		FV-R (n=10)	70,0
FV-PLU	in/in	Ady-R (n=9)	40,0
		FV-R (n=15)	80,0
	sc/in	Ady-R (n=6)	33,3
		FV-R (n=10)	60,0

Según muestra la Tabla 13, la administración de los adyuvantes sin péptido recombinante mostró cierto nivel de protección (entre el 30 y el 40%) que no alcanzó los niveles de las fórmulas que contienen el antígeno PP2Ar, que proporcionaron niveles de protección entre el 60 y el 80%.

Los adyuvantes, por sí mismos, ejercieron un papel protector importante quizás conferido por las paredes bacterianas que ambas fórmulas presentaban, ya que por sí mismas pueden estimular una respuesta Th2 especialmente cuando la vía de administración es a través de mucosa.

Por su parte, como ocurría en los primeros ensayos de eficacia, los mucoadhesivos por su viscosidad y facilidad para formar películas ejerciendo un efecto “parche”, han proporcionado en ambos casos, elevados porcentajes de protección, pero especialmente en el caso del Plurónic F127®.

4.2.2. Evaluación de la seguridad de la vacunación con el péptido PP2Ar según la fórmula y la vía de administración

Para valorar la seguridad de las formulaciones candidatas para la vacunación, FV-CMC y FV-PLU, siguiendo ambas pautas de administración ensayadas, se revisó semanalmente el estado general de los ratones, y se llevó a cabo un registro del porcentaje de daños en general mostrados por el ratón y el porcentaje de muertes dentro del grupo.

En este estudio se analizaron los animales que recibieron la fórmula con PP2Ar (FV), así como los que recibieron solo adyuvantes (Ady), divididos en dos subgrupos: uno en el que solo fueron inmunizados y otro en el que además se retaron (R).

Cuando se inmunizó con CMC y paredes bacterianas, la administración intranasal doble tanto de la fórmula con PP2Ar, como solo de los adyuvantes resultó ser 100% segura (Tabla 14). Solo se registraron daños y muertes al emplearse la vía subcutánea incluyendo o no al antígeno (FV y Ady). En este caso, los animales que inicialmente mostraron heridas y peor estado general finalmente murieron, con una mayor incidencia de daños y muertes en animales que además se expusieron a la infección por *A. tetraoptera*.

En el caso de la fórmula que contenía PLU asociado a paredes bacterianas, ambas pautas de administración resultaron ser 100% seguras para todos los grupos ensayados, no se observó ningún daño y ninguna muerte entre los animales a los que se administró. En este caso, cualquiera de las dos pautas de administración podría ser empleada en términos de seguridad.

Tabla 14.- Animales dañados y muertes con la Fórmula CMC según la vía de administración (in: intranasal; sc: subcutánea). Grupos ensayados: Ady: adyuvantes (CMC y PB), Ady-R: adyuvantes y reto, FV: fórmula vacunal con PP2Ar y FV-R: fórmula vacunal con PP2Ar y reto.

CMC		DAÑOS		MUERTES	
		n	%	n	%
in/in	Ady (n=9)	0	0,0	0	0,0
	Ady-R (n=9)	0	0,0	0	0,0
	FV (n=15)	0	0,0	0	0,0
	FV-R (n=15)	0	0,0	0	0,0
sc/in	Ady (n=9)	1	11,1	1	11,1
	Ady-R (n=9)	2	22,2	2	22,2
	FV (n=15)	1	6,7	1	6,7
	FV-R (n=15)	2	13,3	2	13,3

Realizando una valoración detallada de los resultados expuestos hasta el momento, y con el objetivo de seleccionar la mejor opción para estudios posteriores y su aplicación en la prevención de las nematodiasis, cabe decir que la fórmula FV-CMC ha conseguido prevenir la infección en un mayor número de animales (protección del 73%) con la administración exclusivamente intranasal, considerada a partir de ahora de elección por ser la más segura. Con respecto al control de infección, se observa como la inmunización previa a la infección produce una disminución de la infección en un 50%. La utilización de los adyuvantes CMC y paredes bacterianas, por sí mismos, también disminuye el porcentaje de infección un 10%, pero es un 43,3% mayor en el caso de la fórmula con el antígeno PP2Ar. Adicionalmente la FV-CMC ha producido una disminución en el número de vermes recuperados, con una media de 1,8 vermes por animal, mientras que al inmunizar con solo los adyuvantes la media fue de 8,7 siendo en el grupo control de infección de 11,4 vermes.

Empleando la fórmula con Plurónic (FV-PLU) junto a paredes bacterianas como adyuvantes, para las pruebas de inmunización (in/in), produjo una disminución de la infección en un 60% respecto a los animales control. En este caso también la inmunización con solo los adyuvantes disminuyó el porcentaje de animales infectados en un 10%. Con esta fórmula la media de vermes recuperados es de 0,4 vermes por animal, lo que corrobora el elevado nivel de protección. El grupo Ady-R, tuvo una media de 10 vermes, muy cercano a los 11,4 del grupo infectado por lo que los efectos protectores se deben en gran medida al antígeno PP2A incluido en la vacuna, efectos potenciados por los adyuvantes.

Por lo tanto, con estos resultados hemos seguido analizando la respuesta de los animales a la infección tras la inmunización con estas dos fórmulas y la inmunización doble intranasal.

4.3. ESTUDIO DE LA RESPUESTA DEL RATÓN A LA INFECCIÓN TRAS LA INMUNIZACIÓN.

4.3.1. Análisis de las poblaciones leucocitarias en los ensayos de vacunación

El recuento leucocitario en sangre periférica de ratón se realizó con el objetivo de analizar las variaciones en las poblaciones de leucocitos asociadas a la infección tras la inmunización. La sangre total fue recogida del seno venoso de todos los ratones de cada grupo en el momento del sacrificio en tubos con anticoagulante y se analizó mediante citometría de flujo. Para ello se empleó el marcaje específico del clúster de diferenciación CD45 o antígeno común de linfocitos maduros. Como hemos comentado anteriormente, este marcador permanece estable en leucocitos maduros, mientras que eritrocitos y plaquetas maduras no lo expresan. Todos los leucocitos expresan antígeno CD45: los linfocitos expresan altos niveles, los monocitos niveles intermedios, mientras que los granulocitos expresan bajos niveles, situación que permite el estudio de la expresión de este antígeno de superficie que, juntamente con el tamaño de las distintas poblaciones, permite distinguir el linaje celular.

El recuento leucocitario se ha realizado en los grupos de animales inmunizados con las fórmulas vacunales más eficaces, FV-CMC y FV-PLU tras el reto, y los resultados se han comparado con los datos normales referencia para ratón, los obtenidos en el grupo control de infección (INF) y un grupo control al que se ha inyectado únicamente los adyuvantes y se ha infectado posteriormente (Ady-R).

Se determinaron los porcentajes de neutrófilos, linfocitos y eosinófilos en sangre periférica de animales empleados en los ensayos de inmunización. Los resultados se indican en la Tabla 15, donde se incluyen además el resto de células blancas (mastocitos, basófilos...) englobadas en "Otros".

Todos los animales de los ensayos de vacunación presentan valores de neutrófilos inferiores a los valores normales en ratón, y a los animales control de infección, tanto los inmunizados con la fórmula vacunal, como los que recibieron solo los adyuvantes, demostrando que en todos los casos la inmunización y reto tuvieron efectos inmunomoduladores sobre la leucopoyesis. Esto ha sido ya descrito para algunas infecciones bacterianas, trastornos alérgicos, enfermedad inflamatoria intestinal y tratamientos con ciertos fármacos, en las que los neutrófilos se destruyen con más rapidez de lo que tardan en producirse.

Tabla 15.- Recuento leucocitario (%) obtenido mediante citometría de flujo en los ensayos de vacunación con FV-CMC y FV-PLU. Grupos: INF: control infección, Ady-R: adyuvantes y reto y FV-R: fórmula vacunal con PP2Ar y reto.

		Neutrófilos	Linfocitos	Eosinófilos	“Otros”
<i>Valores referencia</i>		[57-67] %	[25-33] %	[1-3] %	[0-7] %
<i>INF</i>		47,3	41,5	3,4	7,9
<i>CMC</i>	Ady-R	26,4	67,3	1,5	4,8
	FV-R	29,0	65,8	1,6	6,6
<i>PLU</i>	Ady-R	41,9	53,7	1,5	3,0
	FV-R	28,6	67,4	0,6	3,7

Por el contrario, los animales de todos los grupos experimentales presentan niveles elevados de linfocitos, superando al valor de referencia y con valores para los inmunizados y retados mayores que los de los infectados.

En el caso de los eosinófilos, aunque cabría esperar un aumento en sangre periférica asociado a la infección con nematodos, los valores se encuentran dentro de la normalidad para los animales inmunizados en todas sus variantes, aunque están por debajo del grupo control de infección que supera mínimamente el de referencia. Lo mismo ocurre con el grupo de otras células blancas sanguíneas, donde los animales inmunizados previamente a la infección presentan valores inferiores al grupo control INF, aunque dentro de los valores normales, a excepción del grupo FV-CMC-R.

En resumen, aunque con ambas fórmulas, FV-CMC y FV-PLU, se consiguió un porcentaje de infección reducido, a nivel sanguíneo las alteraciones leucocitarias detectadas son muy similares entre grupos y subgrupos de animales inmunizados e infectados y siguen el patrón clásico de infección: bajo porcentaje de neutrófilos y alto de linfocitos y sin llegar a demostrarse eosinofilia, que solo es apreciable en casos de infección sin previa intervención. Sin embargo, para los animales inmunizados con FV-PLU la presencia del antígeno PP2Ar intensifica las alteraciones descritas para neutrófilos y eosinófilos.

Estos resultados podrían explicarse teniendo en cuenta el tiempo al que se sacrificaron los animales tras la infección, que fue de 20 días tras el reto. Probablemente los animales retados se infectaron, pero la expulsión fue rápida a causa de la inmunización previa, y aunque el número de vermes recuperado fue bajo, es posible que los valores sanguíneos aún no se hubieran normalizado. La falta de eosinofilia podría ser también debido a este motivo ya que, la carga parasitaria debido a la inmunización previa fue menor, y no se llegó a desarrollar una respuesta completa a la infección.

4.3.2. Análisis de la respuesta humoral en los ensayos de vacunación. Isotipos y cinética de producción.

Para investigar el efecto de la inmunización modulando la respuesta inmune del hospedador ante la infección, se analizó la respuesta de anticuerpos generados por la inmunización y tras la infección en ratón, para los diferentes ensayos de vacunación. La determinación de anticuerpos se realizó tanto a nivel sistémico, en suero, como a nivel local en mucosa intestinal. Para determinar los niveles de inmunoglobulinas se utilizó la técnica de ELISA indirecto empleando extracto total del nematodo como antígeno tal y como se ha especificado anteriormente. Se analizaron los isotipos: IgG, IgM, IgA e IgE en suero e IgAs, IgG e IgE en mucosa.

4.3.2.1. Respuesta de anticuerpos en suero

Los niveles de anticuerpos en suero se analizaron para cada fórmula vacunal (FV-CMC-R y FV-PLU-R), su control de adyuvantes (Ady-R) y el control de infección (INF), y un grupo de animales sin intervención (C). Los tiempos a los que se tomó muestra sanguínea fueron: antes de cualquier tratamiento (t=0), a los 10 y 20 días tras la inmunización (d.p.i.), a los 10 días de infección experimental o reto (10 d.p.r) y a los 20 días post-reto (20 d.p.r.) coincidiendo con el sacrificio.

Se analizaron los niveles de IgM, IgG, IgA e IgE en sueros de animales inmunizados (PP2Ar junto con CMC y paredes bacterianas) y retados, comparándolos con los correspondientes controles. Los niveles de IgA e IgE, no experimentaron ninguna diferencia entre grupos y únicamente en el caso de la IgE se observó un ligero aumento como consecuencia de la infección, pero sin variación aparente asociada a la inmunización.

Los niveles de IgM e IgG mostraron diferencias significativas entre grupos (Figura 41).

Aunque la infección por si misma produce un aumento en los valores de IgM (grupos INF y Ady-R), se puede observar como los animales inmunizados con FV-CMC y posteriormente retados tienen valores todavía mayores de esta inmunoglobulina. En este grupo la concentración de IgM aumenta significativamente a los 20 días tras la inmunización y tras la infección, con diferencia significativa respecto a sus grupos controles C, INF y Ady-R. Los valores séricos de IgM en el grupo al que se le ha administrado únicamente carboximetilcelulosa y paredes bacterianas (Ady-R), se mantienen cercanos a los valores del grupo control hasta el reto, donde se ve un aumento progresivo muy similar al infectado, por lo que la respuesta más marcada detectada en el grupo que recibió la fórmula vacunal más aumentada parece relacionarse con la presencia de PP2Ar.

Al analizar los niveles séricos de IgG tras el ensayo de vacunación con FV-CMC-R, se observa en comparación con IgM un incremento ligero con la inmunización que es potenciado por la infección, alcanzando niveles destacables a partir de los 10 d.p.r. mostrando una diferencia muy significativa con respecto a los controles. En este caso, la administración de los

adyuvantes exclusivamente produce una ligera variación en los niveles de IgG a tiempo 20 d.p.i. respecto al grupo de ratones INF.

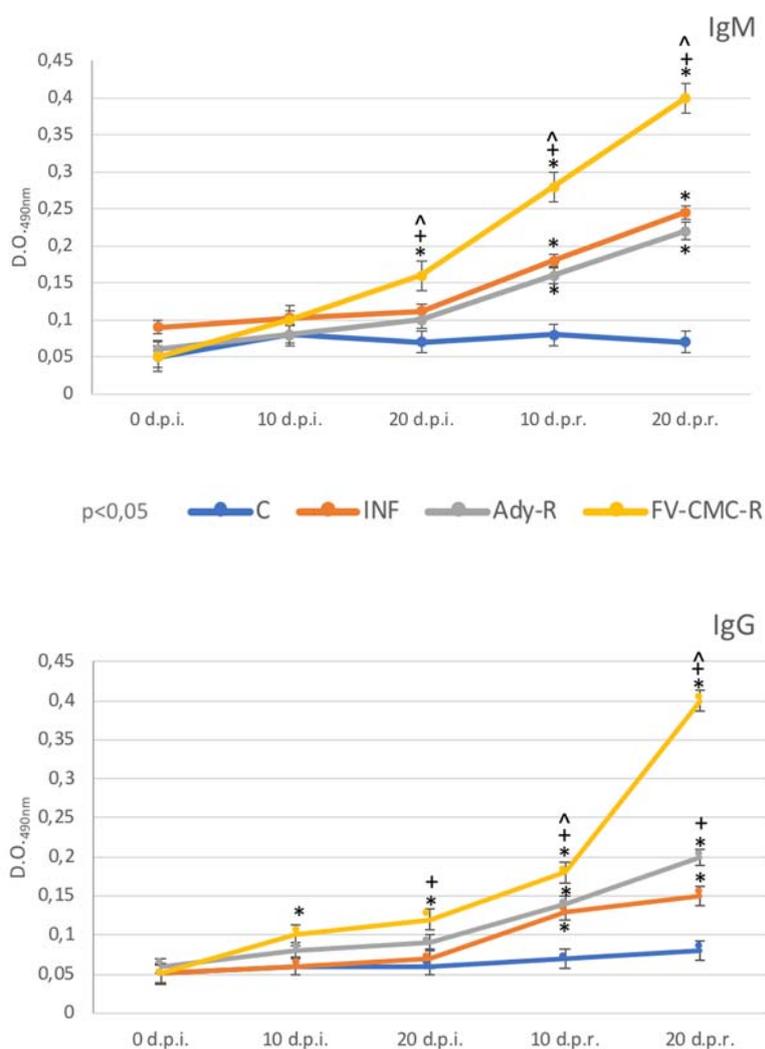


Figura 41.- Variación de la respuesta de anticuerpos en suero inducida por la infección de ratones ICR con *A. tetraptera* tras la inmunización previa con FV-CMC. La concentración y cinética de los anticuerpos IgM e IgG se analizó mediante ELISA indirecto, utilizando 3µg de extracto total de *A. tetraptera* y usando mezclas de suero diluidas 1/200 procedente de animales control (C), ratones infectados (INF), control de adyuvantes retado (Ady-R) y grupo inmunizado con FV-CMC-R conteniendo la proteína PP2Ar y retado (n=10/grupo). Los anticuerpos secundarios se diluyeron 1/4.000. (*) Diferencia significativa con respecto C; (+) diferencia significativa respecto INF; (^) diferencia significativa respecto Ady-R (p<0,05).

Estos resultados sugieren que la inmunización con FV-CMC, conteniendo al péptido PP2Ar, ha potenciado la respuesta humoral frente a la infección elevando los niveles de IgM e IgG a nivel sistémico de forma considerable respecto a los de una infección sin inmunización previa y respecto a los de los animales que únicamente recibieron adyuvantes.

Debido a que no se obtuvieron diferencias entre grupos para IgA e IgE, con la fórmula FV-CMC, no se muestran los resultados.

Los resultados obtenidos cuando se inmunizó con la fórmula FV-PLU (PP2Ar, Plurónic y paredes bacterianas) como paso previo a la infección se muestran en la Figura 42. Los niveles de IgM, aumentaron en todos los casos tras la infección en relación al grupo control. Sin embargo, en el grupo FV-CMC, la inmunización produce un aumento en los niveles de IgM ya desde los 10 días tras la inmunización (10 d.p.i.) y de forma más marcada tras la infección, con diferencias significativas con respecto al resto de grupos.

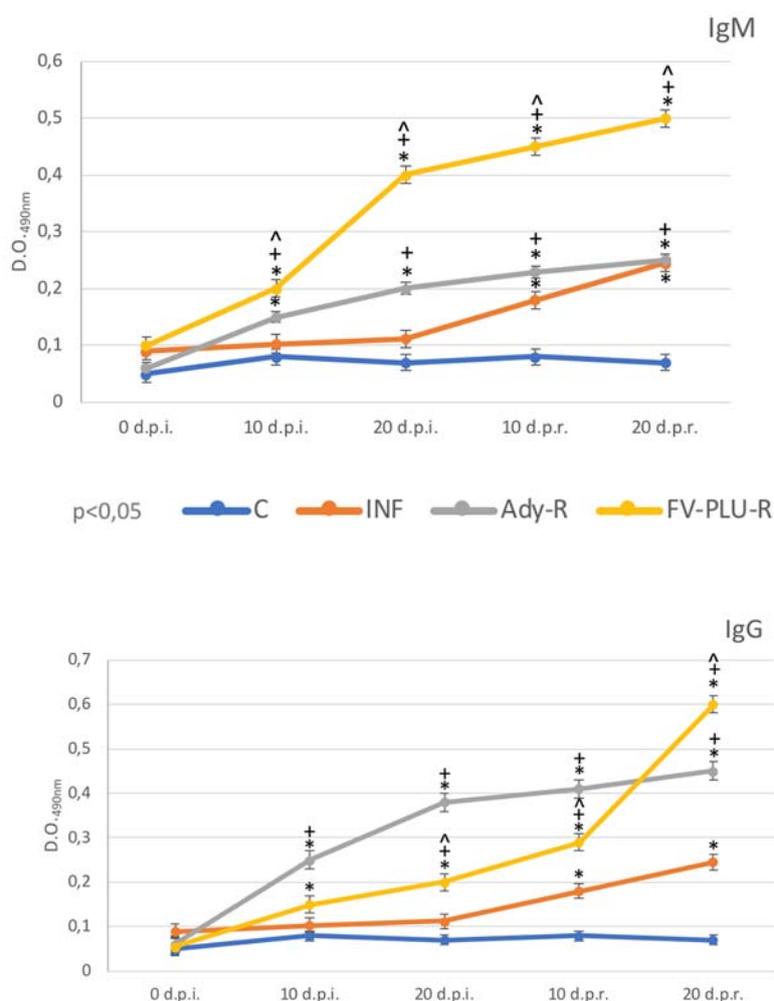


Figura 42.- Variación de la respuesta sistémica inducida por la infección de ratones ICR con *A. tetraoptera* tras la inmunización previa con FV-PLU-R. La concentración y cinética de los anticuerpos IgM e IgG se analizó mediante ELISA indirecto, utilizando 3µg de extracto total de *A. tetraoptera* y usando mezclas de suero diluidas 1/200 procedente de animales control (C), ratones infectados (INF), control de adyuvantes retado (Ady-R) y grupo inmunizado con FV-PLU conteniendo la proteína rPP2A y retado (n=10/grupo). Los anticuerpos secundarios se diluyeron 1/4.000. (*) Diferencia significativa con respecto C, (+) diferencia significativa respecto INF, (^) diferencia significativa respecto Ady-R (p<0,05).

La cinética es similar para los grupos con Ady-R y FV-PLU, en los que los niveles de IgM aumentan progresivamente, aunque la inmunización con PP2Ar produce un aumento más marcado que la administración del adyuvante que consigue niveles similares al grupo control

INF a los 20 d.p.r. La administración del adyuvante no provocó ningún cambio remarcable al provocado por la infección.

Los niveles de IgG siguen una cinética diferente a la descrita para la IgM. En este caso el aumento es progresivo y más marcado para el caso de la inmunización con el adyuvante (Plurónico y paredes bacterianas). En este caso, y a diferencia de lo que ocurría con la fórmula anterior, tanto con la fórmula FV-PLU como con su control de adyuvantes Ady-R, los niveles de IgG detectados fueron significativamente mayores respecto al grupo INF. En este caso, tanto el adyuvante como la fórmula vacunal con PP2Ar potencian el aumento en los niveles de IgG, aumentados a consecuencia de la infección. Es posible que las paredes bacterianas sean probablemente el componente estimulador de la respuesta inmunitaria y que esta respuesta se vea ligeramente potenciada por PP2Ar.

No se obtuvieron diferencias entre grupos para IgA e IgE, y por tanto no se muestran los resultados.

4.3.2.2. Respuesta de anticuerpos en mucosa

Para valorar la respuesta local a la infección a nivel intestinal se obtuvieron las mucosas del colon de los animales, tras el sacrificio, por tanto, se estudió un único tiempo: 20 días post-reto (20 d.p.r). Se analizaron los niveles de IgA secretora (IgAs), IgG e IgE mediante ELISA indirecto frente a extracto total de *A. tetraoptera*.

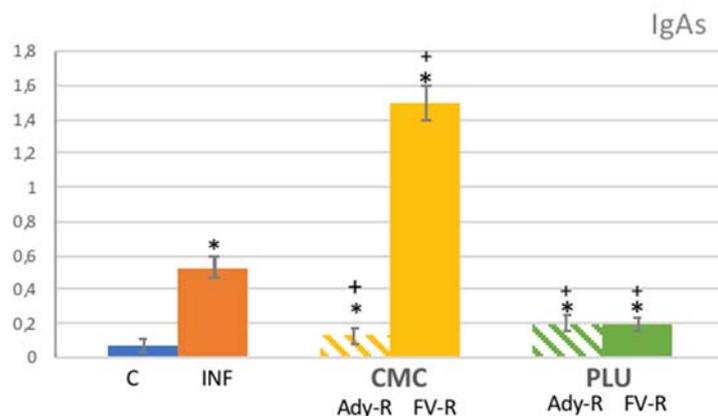


Figura 43.- Variación de la respuesta de IgAs en mucosa intestinal en ratones ICR inducida por la infección con *A. tetraoptera* tras la inmunización con FV-CMC y FV-PLU. La concentración de los anticuerpos IgAs fue determinada mediante ELISA indirecto frente a extracto total de *A. tetraoptera* usando mezclas de mucosas procedente de animales control (C), ratones infectados (INF), control de adyuvantes retado (Ady-R) y grupos inmunizados con PP2Ar y retados (FV-CMC y FV-PLU) (n=10/grupo) obtenidas en el momento del sacrificio y diluidas 1/100. Los anticuerpos secundarios se diluyeron 1/2.000. (*) Diferencia significativa con respecto C, (+) diferencia significativa respecto INF, (^) diferencia significativa respecto a sus controles internos (Ady) (p<0,05).

Como ya se comentó anteriormente los niveles de IgAs (anti-*A. tetraoptera*) a nivel local se encontraron significativamente elevados como consecuencia de la infección (grupo INF) respecto a los animales control (C). En el caso de los animales inmunizados con FV-CMC este aumento en los niveles de IgAs se ve potenciado, mientras que la administración de los adyuvantes (CMC y paredes bacterianas) provocó niveles próximos al animal control, sugiriendo que la carboximetilcelulosa junto a las paredes bacterianas disminuyen el efecto provocado por la infección a nivel de respuesta de anticuerpos local.

En cuanto a los ensayos con la fórmula que contiene Plurónic, ambos grupos inmunizados sin y con PP2Ar (Ady-R y FV-PLU-R) presentan valores que, aunque ligeramente aumentados respecto al grupo control de forma significativa, están por debajo de los niveles de IgAs detectados en el grupo control de la infección (INF) y son mucho menores que en el grupo experimental FV-CMC-R. Con esta fórmula vacunal, parece ser que la inclusión de la proteína recombinante PP2Ar no induce ninguna respuesta local diferente a la provocada por los adyuvantes por sí mismos y en ambos casos la respuesta de anticuerpos se ve reducida respecto al control de infección. Por tanto, los mecanismos que han conferido efecto protector a dicha fórmula (FV-PLU) no parecen ser específicos y probablemente estén asociados a una activación inespecífica por parte de las paredes bacterianas.

Aunque otros mecanismos inmunológicos pueden haber jugado un papel importante en la expulsión temprana de los nematodos tras la inmunización, producción de moco aumentada, hipercontractilidad intestinal, mastocitosis..., la producción e IgAs específica anti-*Aspiculuris* se postula como de mayor relevancia ya que tras la neutralización de los nematodos por los anticuerpos secretados aumenta su susceptibilidad a la expulsión provocada por el resto de fenómenos inmunitarios locales. Por ello, y dado que sólo con FV-CMC parece verse claramente este fenómeno de protección específica frente a *A. tetraoptera* en asociación a la PP2Ar se selecciona a esta fórmula vacunal como la mejor candidata para continuar con el análisis y desarrollo de una vacuna eficaz.

4.3.3. Análisis de las proteínas del extracto de *A. tetraoptera* reconocidas por los anticuerpos del ratón a lo largo del ensayo de vacunación con FV-CMC

Para analizar si la respuesta inmunitaria detectada era debida a proteínas concretas del parásito, realizamos un *Western-blot* e inmunodetección, utilizando extracto total de *A. tetraoptera*, para investigar qué bandas inmunogénicas eran reconocidas por los anticuerpos detectados en suero y mucosa de los ratones sometidos a los ensayos de inmunización con la fórmula FV-CMC, conteniendo los adyuvantes CMC y paredes bacterianas y el antígeno PP2Ar.

En la Figura 44 se muestran los resultados obtenidos a lo largo del ensayo de vacunación tras la inmunización (10 d.p.i. y 20 d.p.i.) y el reto (10 d.p.r. y 20 d.p.r). Como controles se utilizaron el grupo de animales infectados experimentalmente sin inmunización previa (INF) y el grupo no inmunizado ni retado (C).

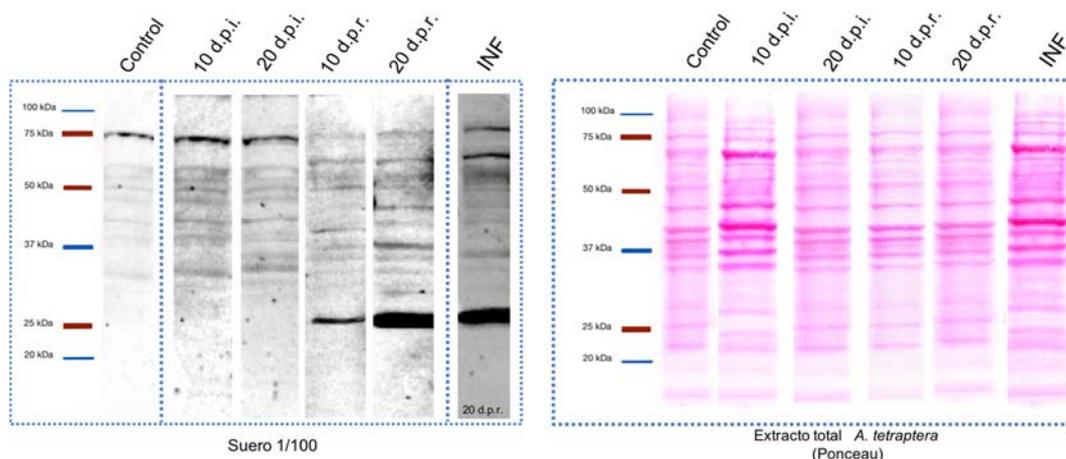


Figura 44.- Las IgGs del suero de animales inmunizados con FV-CMC y retos reconocen específicamente proteínas del extracto total de *A. tetraptera*. 40µg de extracto total de parásito fueron cargados en un gel SDS-PAGE (10%). Tras la transferencia, las membranas se tiñeron con Ponceau para el control de carga, y se incubaron con una mezcla de sueros (diluidos 1/100) de ratones de los grupos control (C y INF) y del grupo de ratones infectados y vacunados, tras la inmunización (10 y 20 d.p.i.) y tras el reto (10 y 20 d.p.r.). Como anticuerpo secundario se utilizó anti-IgG (GAM) diluido 1/20.000.

No se visualiza ninguna banda específica tras la incubación con suero de ratones no retos. Por tanto, la inmunización con PP2Ar no produce la generación de IgGs específicas contra ninguna proteína del parásito. Sin embargo, una banda situada entre 25 y 37kDa es claramente visible como consecuencia de la incubación con suero de animales infectados con *A. tetraptera*, tanto en el grupo control de la infección (INF) como en el grupo inmunizado previamente con FV-CMC. La intensidad de la señal de esta banda aumenta progresivamente con el tiempo de infección, y es más intensa en el grupo inmunizado que en el grupo no inmunizado previamente. Por tanto, aunque la inmunización por sí misma, no produce ninguna respuesta específica sí que potencia la respuesta generada tras la infección. La banda reconocida tiene un tamaño compatible con la proteína PP2A del parásito. Estos resultados son coherentes con los datos obtenidos con los ensayos ELISA descritos anteriormente, en los que los niveles de IgG en suero aumentan de forma más importante tras la infección, alcanzando los valores más altos a los 20 d.p.r. en el grupo inmunizado FV-CMC.

Con el mismo objetivo, se realizó un *Western-blot* e inmunodetección para analizar si proteínas específicas del parásito eran reconocidas por las IgAs de la mucosa generadas en el grupo experimental FV-CMC. Los resultados se compararon con los controles C e INF, siguiendo el mismo diseño anterior (Figura 45) aunque únicamente se disponen de datos a los 20 días post-reto, en las mucosas obtenidas tras el sacrificio de los animales.

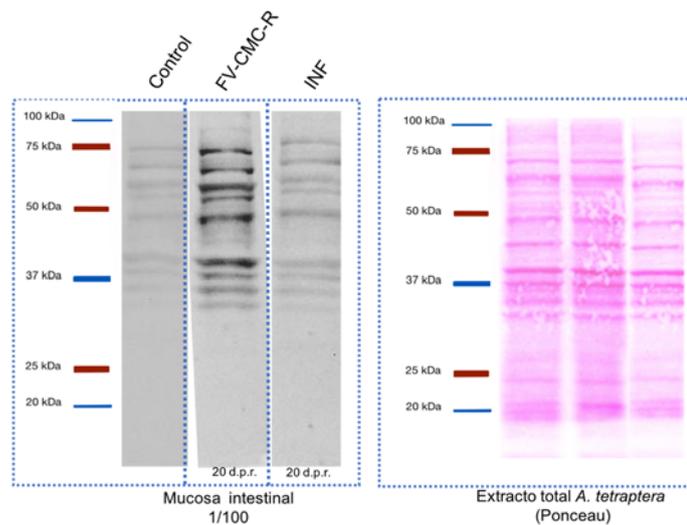


Figura 45.- La IgAs en la mucosa de animales inmunizados con FV-CMC y retados reconocen específicamente proteínas del extracto total de *A. tetraptera*. 40µg de extracto total de parásito fueron cargados en un gel SDS-PAGE (10%). Tras la transferencia, las membranas se tiñeron con Ponceau para el control de carga y se incubaron con una mezcla de mucosas (diluidas 1/100) de ratones de los grupos control (C y INF), infectados y del grupo de ratones infectados y vacunados tras el sacrificio (20 d.p.r.). Como anticuerpo secundario se utilizó anti-IgA (GAM) diluido 1/20.000.

En este caso las IgAs de mucosa parecen reconocer una serie de bandas de distintos pesos moleculares que son reconocidas en los animales no inmunizados pero que dan una señal más intensa cuando los ratones han sido inmunizados previamente, tal y como indican los resultados de ELISA descritos. De nuevo los resultados indican que la inmunización potencia la respuesta inmunológica desencadenada por la infección, aunque, en este caso, de la respuesta generada a nivel local es más generalizada frente a diversas proteínas del parásito.

4.3.4. Análisis histológico del colon proximal de los ratones inmunizados con FV-CMC

Para el estudio de los cambios producidos en el colon como consecuencia de la inmunización con la fórmula FV-CMC previa a la infección con *A. tetraptera* se llevaron a cabo diferentes tinciones de cortes semifinos de colon y se analizaron mediante microscopía. Para ello, y tal como se ha descrito en Material y Métodos, se tomaron muestras del primer tercio del colon de los animales y se obtuvieron cortes histológicos de 4µm. Los análisis de las variaciones histológicas asociadas a los ensayos de vacunación se realizaron empleando la tinción combinada con hematoxilina-eosina (HE) y la tinción PAS-hematoxilina.

El análisis comparado entre grupos se llevó a cabo con animales control (C), infectados experimentalmente (INF), inmunizados con la fórmula FV-CMC, e inmunizados y retados (FV-CMC-R).

El análisis general de la morfología intestinal y de las poblaciones celulares presentes en el tejido se llevó a cabo sobre cortes teñidos con hematoxilina-eosina (HE) (Figura 46). Además

de analizar la integridad de la superficie de los pliegues y el tamaño de los mismos, se ha comparado entre grupos los siguientes rasgos: (a) tamaño de las células caliciformes o productoras de moco y; (b) cantidad de linfocitos intraepiteliales.

Podemos observar cómo, de forma general, no se aprecian grandes alteraciones histológicas relacionadas con la inmunización o con la infección, ya que, en todos los casos, se mantiene la integridad de la mucosa y no se observa aplanamiento de los pliegues por lo que la arquitectura del colon no se ve comprometida.

A nivel celular, si se aprecia un aumento en número y tamaño de las células caliciformes productoras de moco soluble (a) en todos los casos en comparación con los ratones control (C), pero de forma más marcada para los grupos de animales retados (INF y FV-CMC-R). En el grupo inmunizado y no retado (FV-CMC) la inmunización con PP2Ar y adyuvantes ha provocado un cierto aumento de la producción de moco, pero en menor grado que el que acompaña a la infección.

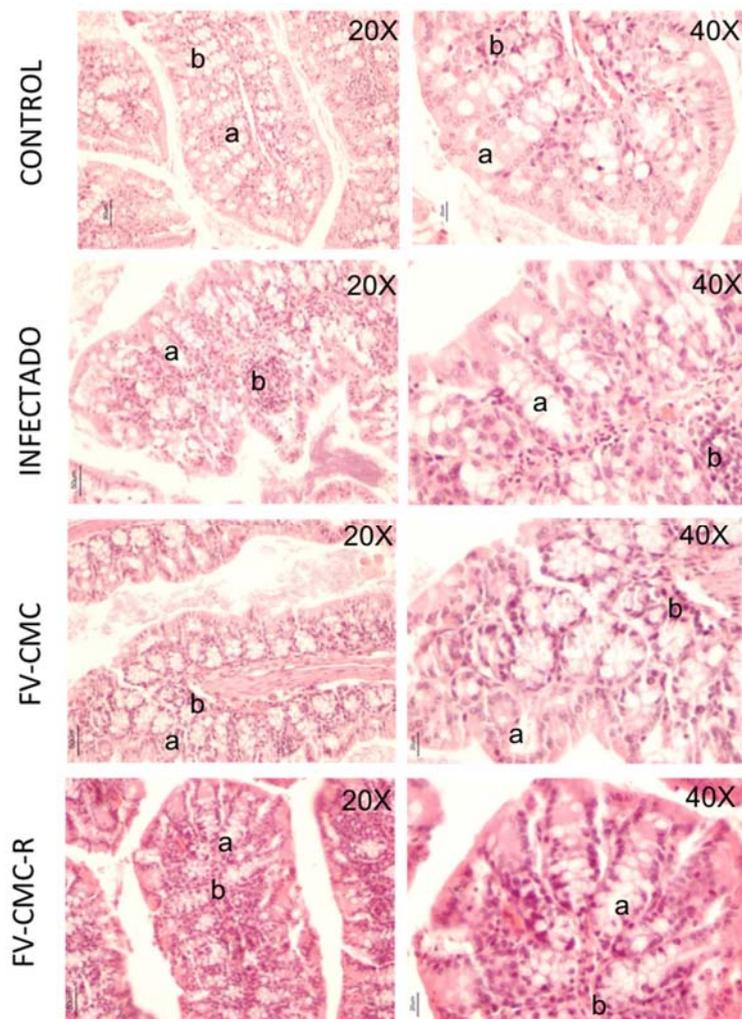


Figura 46.- Corte histológico de colon proximal de animales: control (C), infectado (INF), inmunizado (FV-CMC) e inmunizado y retado (FV-CMC-R) teñidos con HE para análisis morfológico. a) Células caliciformes y b) Linfocitos intraepiteliales. Aumentos empleados 20X y 40X.

También se puede observar el mismo tipo de comportamiento en relación a los linfocitos intraepiteliales (b), aunque en este caso, los animales que muestran una mayor linfocitosis son los inmunizados y posteriormente retados (FV-CMC-R). Parece ser que la inmunización intranasal ha potenciado la respuesta de mucosa frente a la infección, y la activación y proliferación de células caliciformes y linfocitos intraepiteliales pueden ser responsables de la puesta en marcha de los mecanismos inespecíficos (aumento de la producción de moco soluble) y específicos (secreción de IgAs anti-*A. tetraoptera*) que han conferido protección frente a la infección.

Para un análisis más detallado de los cortes histológicos tras el ensayo de vacunación se empleó la tinción PAS-hematoxilina, que tiñe de color morado intenso la parte glucídica de las glicoproteínas, las mucinas del moco que recubre el epitelio intestinal y las del interior de las células caliciformes de la mucosa del intestino (Figura 47).

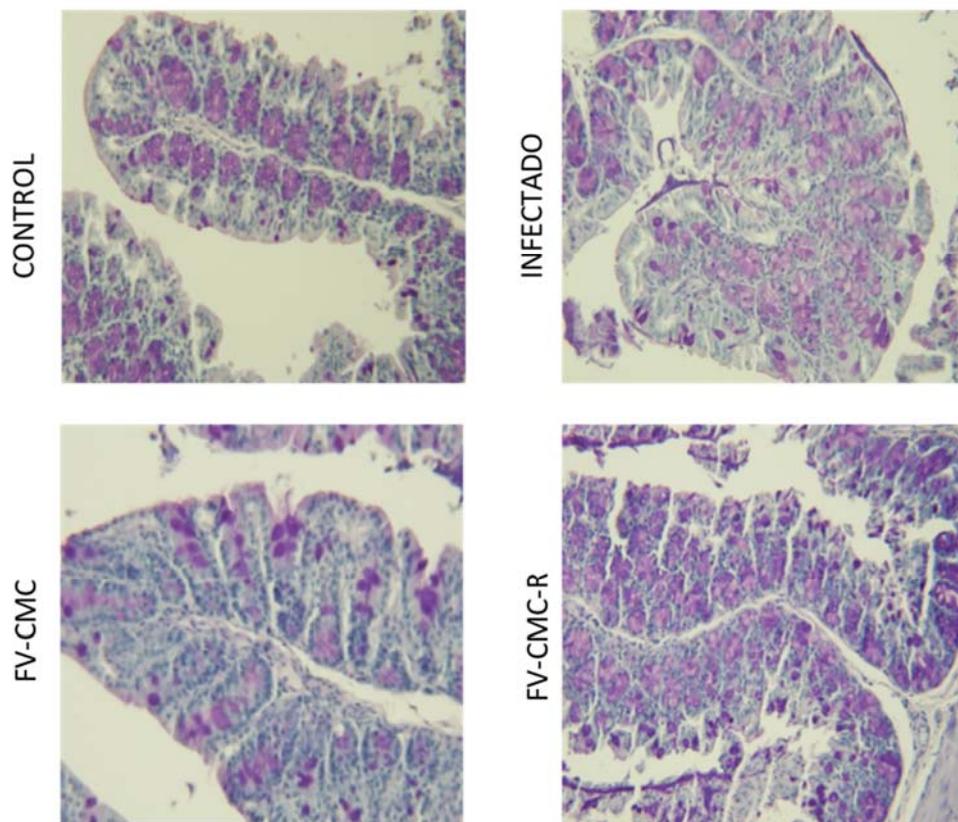


Figura 47.- Corte histológico de colón proximal de animales: control (C), infectado (INF), inmunizado (FV-CMC) e inmunizado y retado (FV-CMC-R) teñidos con PAS-hematoxilina para el marcaje de polisacáridos asociados a glicoproteínas y mucinas. Aumento empleado 20X.

Al analizar de forma comparada el marcaje obtenido con la tinción se observa como en los cortes de los animales inmunizados con la fórmula FV-CMC las células caliciformes han aumentado su tamaño, lo que se relacionaría con una mayor producción de moco soluble que

será secretado para recubrir la superficie epitelial como parte de la barrera natural frente a infecciones. Y como ya se observaba con la tinción HE los cortes de los animales infectados experimentalmente (INF y FV-CMC-R) muestran además de un aumento del tamaño de las células caliciformes, un aumento en número lo que se considera una hiperplasia de las criptas que se extienden hasta el borde del pliegue de la mucosa, todo ello asociado a la infección y más patente en el grupo de animales inmunizados y retados.

4.3.5. Análisis, mediante inmunohistoquímica, de la expresión de quimioquinas en colon de ratón inmunizado con FV-CMC

La inmunohistoquímica permite mediante marcaje específico con anticuerpos fluorescentes analizar la expresión de moléculas concretas en un tejido mediante el empleo de microscopía confocal. Las quimioquinas son producidas por diversas células del sistema inmunitario y otros tipos celulares y tienen la función de crear gradientes quimiotácticos que promueven el desplazamiento de otras poblaciones celulares (neutrófilos, linfocitos, macrófagos...) hacia los tejidos infectados y/o dañados. Se analizó la expresión de quimioquinas, sobre cortes histológicos de colon, en animales control (C), infectados experimentalmente con *A. tetraoptera* (INF), inmunizados con la fórmula (FV-CMC), e inmunizados y retados (FV-CMC-R).

Las quimioquinas analizadas por su participación en reacciones inmunitarias e inflamatorias fueron: CCL2 (MCP-1), CCL17 (TARC), GRO 1 (CXCL1), CXCL15 (Lungkine) e IL8 (CXCL8). Como aparece resumido en la tabla 9, la CCL2 está implicada en el reclutamiento de monocitos, linfocitos T, basófilos y mastocitos a los focos inflamatorios; la IL-8 de naturaleza proinflamatoria es un potente factor quimiotáctico de neutrófilos, regula la producción de proteínas de adhesión y la formación de lípidos bioactivos; CCL17 induce la quimiotaxis de células T; GRO 1 tiene actividad quimioatrayente de neutrófilos y CXCL15 es una citoquina que se ha descrito en el ratón y recluta neutrófilos, muy abundante en las células epiteliales del pulmón pero también en otras mucosas, como el tracto urogenital y gastrointestinal.

En la Tabla 16 se muestran los resultados del marcaje fluorescente observado sobre los cortes de colon tras la inmunohistoquímica con anticuerpos específicos. Se han empleado signos para tratar de cuantificar la intensidad de la señal detectada. El signo (-) indican ausencia de marcaje específico y los signos (+) indican presencia de marcaje, siendo (+) ligero, (++) medio y (+++) fuerte.

El perfil de expresión de quimioquinas muestra claras diferencias entre animales control y el resto de grupos experimentales. Los animales del grupo INF, sin inmunización previa, presentan un aumento de GRO 1 y CXCL15, ambas con efecto atrayente de neutrófilos.

Tabla 16.- Intensidad de marcaje según la quimioquina diana y la región de la mucosa analizada.

DIANA	REGIÓN	C	INF	FV-CMC	FV-CMC-R
CCL2	<i>Punta</i>	+	-	-	+++
	<i>Túnica</i>	-	-	++	+++
	<i>Lámina propia</i>	-	-	-	+
	<i>Criptas</i>	-	-	+++	+++
CCL17	<i>Punta</i>	-	-	+	+++
	<i>Túnica</i>	-	-	++	++
	<i>Lámina propia</i>	-	-	+	+
	<i>Criptas</i>	-	-	++	+++
GRO 1	<i>Punta</i>	-	-	-	+
	<i>Túnica</i>	-	+	-	-
	<i>Lámina propia</i>	-	+	+	-
	<i>Criptas</i>	-	+	-	+
CXCL15	<i>Punta</i>	+	++	+	++
	<i>Túnica</i>	-	-	++	++
	<i>Lámina propia</i>	+	++	+	+++
	<i>Criptas</i>	-	++	+	+++
IL-8	<i>Punta</i>	-	-	-	+
	<i>Túnica</i>	-	-	-	+
	<i>Lámina propia</i>	-	-	+	+
	<i>Criptas</i>	-	-	+	+

La inmunización con FV-CMC conteniendo PP2Ar, promueve diferencias en la expresión de las quimioquinas, estimulándose además de la CXCL15, la expresión de otras quimioquinas como son la CCL2 y la CCL17 con efecto atrayente de monocitos y linfocitos T, respectivamente. Además, también se detecta la presencia de la IL-8 proinflamatoria y atrayentes de varios grupos celulares como neutrófilos, basófilos y linfocitos. La infección con *A. tetraaptera* tras la inmunización (grupo FV-CMC-R) presenta un perfil de expresión similar al grupo de inmunizados, pero en este caso la expresión de quimioquinas es mucho más marcada, lo que demuestra una máxima actividad inmunitaria en el grupo vacunado e infectado, asociada a la respuesta local protectora descrita en el control de infección (INF).

Para una mejor comprensión de la distribución de la señal sobre los cortes, en la Figura 48 se muestran las imágenes de fluorescencia, obtenidas con el microscopio confocal frente a CCL2 (marcaje en rojo) en cortes histológicos de colon, como muestra de los marcajes que se consideraron positivos.

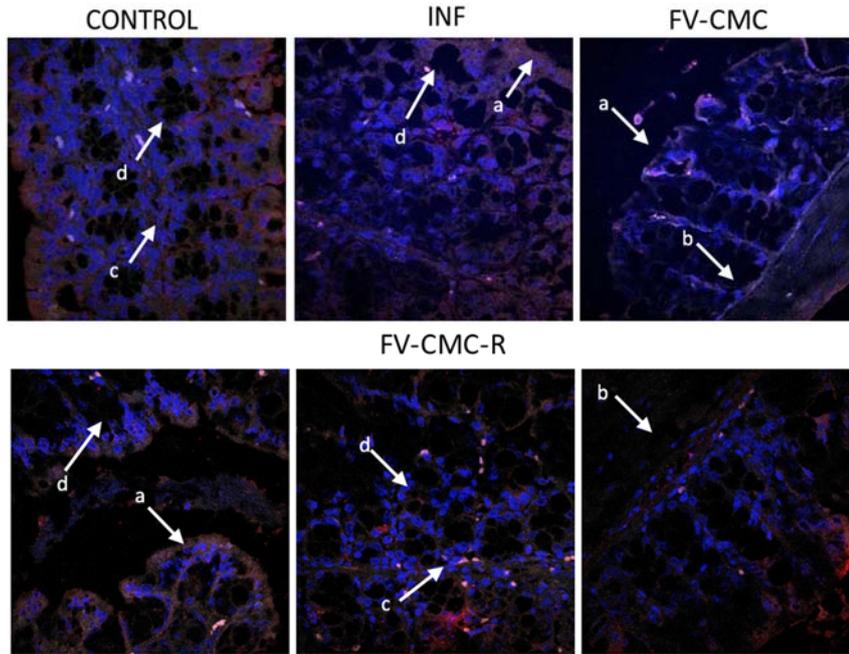


Figura 48.- Marcaje de CCL2 (rojo) en cortes histológicos de colon de ratones: control (C), infectado (INF), inmunizado (FV-CMC) e inmunizado y retado (FV-CMC-R). El color azul corresponde a los núcleos celulares teñidos con DAPI. (a) Punta del pliegue; (b) Túnica muscularis; (c) Lámina propia; (d) Criptas. Aumentos 63x.

La quimioquina CCL2 puede ser producida por múltiples tipos celulares incluyendo macrófagos, linfocitos, mastocitos incluso células endoteliales, fibroblastos... En la punta del pliegue predominan los enterocitos y células caliciformes, en la túnica muscularis podrían estar producidos por mastocitos y en lámina propia por leucocitos circulantes que acceden a la mucosa (linfocitos, monocitos...). El marcaje de esta quimioquina es más intenso en los animales FV-CMC-R, en concreto se aprecia un marcaje discreto en moco soluble secretado por las células caliciformes en el espacio entre puntas de pliegues y en los citoplasmas de los enterocitos de la parte apical del pliegue, así mismo se observa señal de fluorescencia en lámina propia (linfocitos, monocitos) alrededor de las criptas.

En cuanto a las imágenes obtenidas para la quimioquina CCL17, atrayente de linfocitos T, fue observada con mayor intensidad en criptas y en el moco soluble como queda reflejado en la Figura 49.

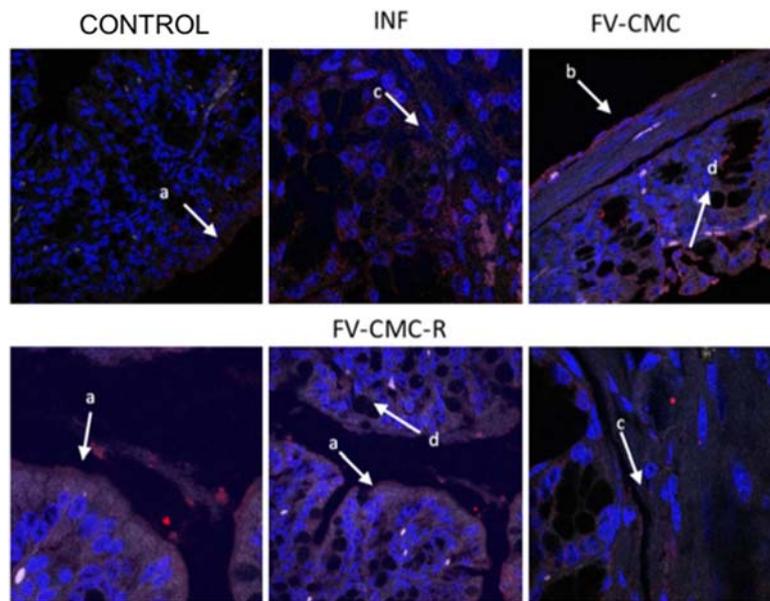


Figura 49.- Marcaje de CCL17 (rojo) en cortes histológicos de colon de ratones: control (C), infectado (INF), inmunizado (FV-CMC) e inmunizado y retado (FV-CMC-R). El color azul corresponde a los núcleos celulares teñidos con DAPI. (a) Punta del pliegue; (b) Túnica muscularis; (c) Lámina propia; (d) Criptas. Aumentos 63x y 100x.

La señal de CCL17 detectada en animales control (C) e infectados (INF) se considera ruido de fondo o marcaje inespecífico. En las imágenes correspondientes los grupos que fueron inmunizados, se puede observar un marcaje discreto focalizado a nivel de las criptas (FV-CMC) y en punta del pliegue y moco secretado (FV-CMC-R).

La CCL17, producida por macrófagos o células dendríticas, es considerada una quimioquina de tipo Th2 por su papel atrayente sobre estos linfocitos cooperadores, y por tanto asociada a respuestas humorales frente a infecciones.

4.3.6. Determinación del perfil de citoquinas en tejidos y órganos linfoides de ratón inmunizado con FV-CMC

Debido a la importancia de las citoquinas en la modulación de la respuesta inmunitaria, para analizar el tipo de respuesta llevada a cabo en el hospedador se cuantificó, mediante PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR) la expresión de citoquinas en los principales tejidos inmunoactivos: bazo, nódulo linfático mesentérico (NLM) y Placas de Peyer (PP), utilizando muestras procedentes de animales control (C), infectados experimentalmente (INF), inmunizados con la fórmula (FV-CMC), e inmunizados y retados (FV-CMC-R), obtenidas tras el sacrificio de los animales.

Se analizó un espectro amplio de citoquinas asociadas a varias posibles vías de activación de la respuesta inmunitaria en respuesta a infecciones intestinales, citoquinas tipo-

Th1 (IFN- γ , IL-12, TNF- α , IL-2); citoquinas tipo-Th2 (IL-4); citoquinas tipo Treg (IL-10, TGF- β) y; citoquinas tipo-Th17 (IL-17, IL-23).

4.3.6.1. Perfil de expresión de citoquinas en bazo

En bazo solo se muestran los niveles de aquellas citoquinas cuya expresión varía significativamente en el grupo inmunizado y retado con la fórmula FV-CMC-R (Figura 50). Para el resto de citoquinas ensayadas no se observaron diferencias entre grupos por lo que no se representan.

En general la inmunización (grupo FV-CMC) provocó unos niveles de citoquinas muy similares al grupo control, por lo que la inmunización en mucosa no se puede relacionar directamente con la producción de citoquinas en bazo y solo en los casos de animales retados (INF y FV-CMC-R) se observan perfiles que indican activación inmunitaria específica a este nivel.

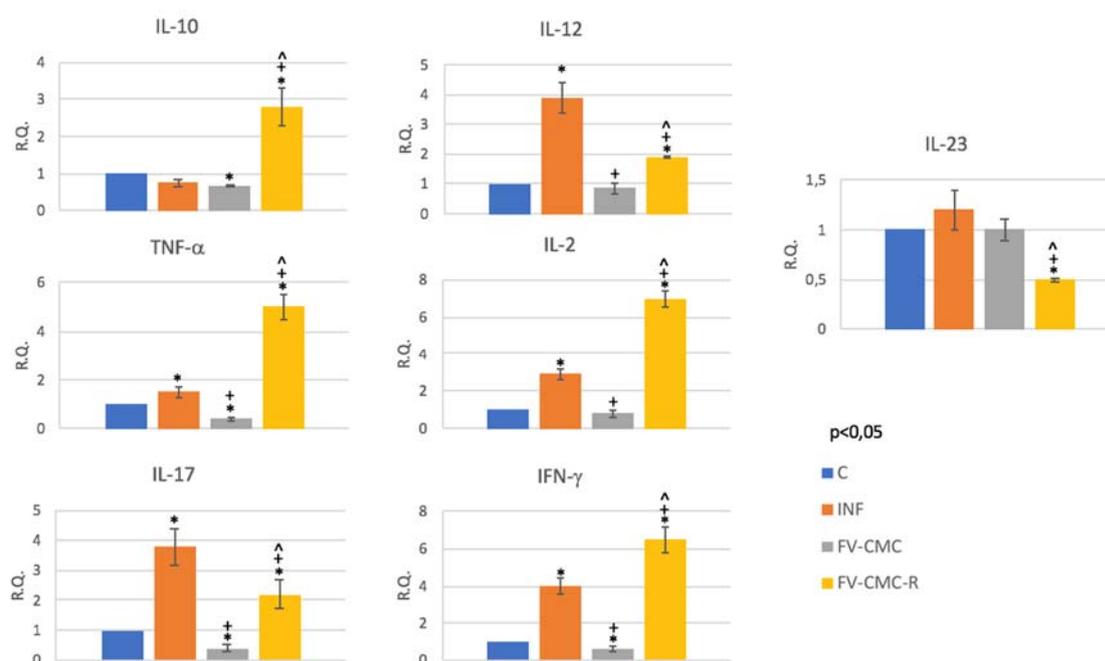


Figura 50.- Perfil de citoquinas en bazo de ratón tras la infección por *A. tetraoptera*. Cantidades relativas (RQ) de expresión (mRNA) respecto a los animales control y normalizado con β -actina. Las barras verticales muestran la desviación estándar. Control (C), infectado (INF), inmunizado (FV-CMC) e inmunizado y retado (FV-CMC-R). (*) Diferencia significativa con respecto C, (+) diferencia significativa respecto INF, (^) diferencia significativa respecto FV-CMC ($p < 0,05$).

Analizando la expresión de citoquinas en el grupo FV-CMC-R respecto al grupo FV-CMC, se ha detectado un aumento en la expresión de: IFN- γ , IL-2, IL-12 y TNF- α de marcado carácter Th1 proinflamatorio, acompañado por un aumento de IL-17 e IL-10, con diferencias significativas en todos los casos. Es más interesante, sin embargo, la comparación de este grupo vacunado con el no inmunizado (INF). En este caso, la inmunización promueve un aumento en la expresión de las citoquinas: IL-2, TNF- α , IFN- γ e IL-10, y niveles inferiores de IL-17 e IL-23.

4.3.6.2. Perfil de expresión de citoquinas en nódulo linfático mesentérico

En el NLM, asociado al intestino, se han representado los resultados para aquellas citoquinas en las se ha demostrado un cambio en los niveles de expresión en alguno de los grupos experimentales respecto a los animales control (Figura 51). Para el resto de citoquinas ensayadas no se observaron diferencias entre grupos por lo que no se representan.

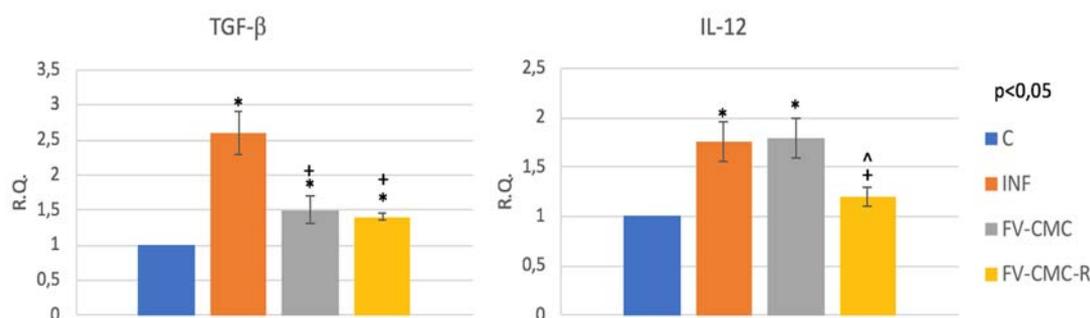


Figura 51.- Perfil de citoquinas en nódulo linfático mesentérico de ratón tras la infección por *A. tetraptera*. Cantidades relativas (RQ) de expresión (mRNA) respecto a los animales control y normalizado con β -actina. Las barras verticales muestran la desviación estándar. Control (C), infectado (INF), inmunizado (FV-CMC) e inmunizado y retado (FV-CMC-R). (*) Diferencia significativa con respecto C, (+) diferencia significativa respecto INF, (^) diferencia significativa respecto FV-CMC ($p < 0,05$).

El análisis de citoquinas en nódulo linfático mesentérico no ha aportado mucha información ya que solo se ha detectado una expresión diferencial entre grupos analizados, para las citoquinas TGF- β e IL-12. Ambas citoquinas están aumentadas en el caso de los animales INF (infectados pero no inmunizados) respecto al control. La inmunización con FV-CM también produce un aumento significativo respecto al grupo control y muy similar al producido por la infección en el caso de la IL-12. Al analizar el grupo inmunizado y retado (FV-CMC-R) observamos un ligero aumento de expresión de TGF- β respecto a los animales control, pero disminuido frente al grupo INF. En el caso de la IL-12, los niveles de expresión no cambian significativamente respecto al control, pero se encuentran disminuidos respecto a los ratones que han sido solo infectados o inmunizados. Estos resultados sugieren que la inmunización produce un aumento de la expresión de estas citoquinas que parece suprimir o anular el efecto de la infección tras la inmunización, suprimiendo la respuesta inmunitaria de este tejido a la infección.

4.3.6.3. Perfil de expresión de citoquinas en placas de Peyer

Como se ha comentado anteriormente, las placas de Peyer (PP) constituyen un tejido linfoide implicado en una respuesta más local y se encuentran en la submucosa intestinal. Al igual que en los casos anteriores se muestran los resultados de expresión para las citoquinas

TGF- β , IL-23 e IL-17, para las que se ha detectado una expresión diferencial entre los grupos analizados (Figura 52). Para el resto de citoquinas no se obtuvieron diferencias entre grupos por lo que no se representan.

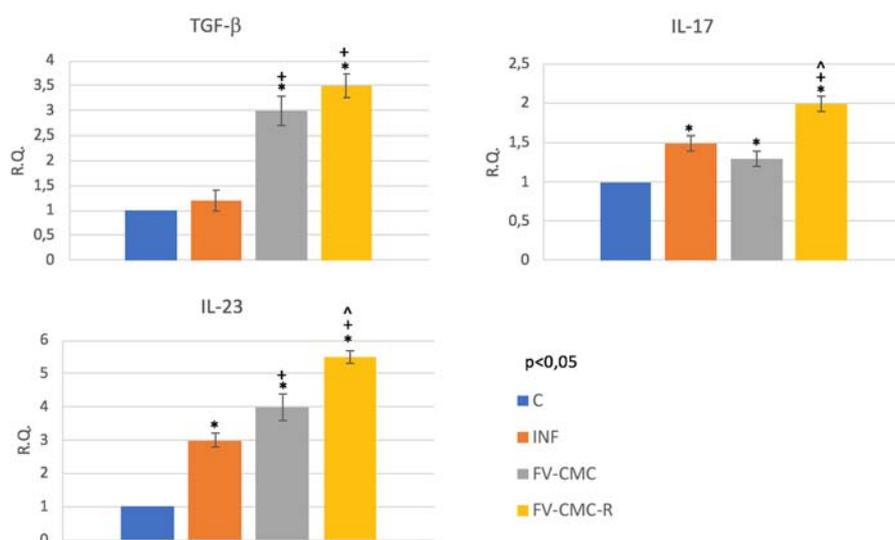


Figura 52.- Perfil de citoquinas en placas de Peyer de ratón tras la infección por *A. tetraptera*. Cantidades relativas (RQ) de expresión (mRNA) respecto a los animales control y normalizado con β -actina. Las barras verticales muestran la desviación estándar. Control (C), infectado (INF), inmunizado (FV-CMC) e inmunizado y retado (FV-CMC-R). (*) Diferencia significativa con respecto C, (+) diferencia significativa respecto INF, (^) diferencia significativa respecto FV-CMC ($p < 0,05$).

La infección produce un aumento significativo en el caso de las interleucinas IL-17 y IL-23. En PP, la inmunización intranasal con FV-CMC ha promovido la expresión de TGF- β , IL-23 e IL-17, siendo mucho menor el aumento en este último caso. TGF- β e IL-23 presentan diferencias significativas incluso respecto al grupo INF.

Los animales infectados y que habían sido previamente inmunizados (FV-CMC-R) mostraron un aumento en la expresión de las 3 citoquinas, TGF- β , IL-23 e IL-17. En todos los casos, el incremento producido por la infección con *A. tetraptera* se ve potenciado por la inmunización previa, y es de marcado carácter Th17.

En resumen, a nivel sistémico representado en las citoquinas detectadas en bazo se ha determinado una respuesta inmunitaria asociada a la vacunación de carácter Th1/Th17 y a nivel local para las placas de Peyer un predominio Th17, respuesta que se discutirá a continuación.

5. DISCUSIÓN

5.1. ESTUDIO DEL MODELO EXPERIMENTAL *A. tetraoptera*-RATÓN

El establecimiento de un modelo experimental de infección por nematodos en ratón tiene una alta aplicabilidad para el estudio de las interacciones parásito-hospedador, desarrollo de nuevos fármacos antihelmínticos, y todos aquellos estudios de laboratorio que puedan extrapolarse a otros hospedadores.

Las helmintiasis afectan a más de mil quinientos millones de personas en todo el mundo, causando una gran morbilidad y asociándose a importantes tasas de discapacidad (Shuford *et al.*, 2016). La morbilidad depende de la carga parasitaria o número de vermes albergados, las personas con infecciones de baja intensidad no suelen presentar síntomas. Las infecciones más intensas pueden causar diversos síntomas, entre ellos manifestaciones intestinales (diarrea y dolor abdominal), desnutrición, malestar general y debilidad, así como retraso del crecimiento y del desarrollo intelectual (OMS, 2018).

Las helmintiasis transmitidas por el suelo están ampliamente distribuidas en zonas tropicales y subtropicales, especialmente en África subsahariana, América, China y Asia oriental. Más de 267 millones de niños en edad preescolar, y más de 568 millones en edad escolar, viven en zonas con intensa transmisión de esos parásitos y necesitan tratamiento e intervenciones preventivas (OMS, 2018).

La prevalencia en ganadería de estas infecciones también alcanza niveles preocupantes en todo el mundo, sobre todo en aquellas especies dedicadas a la obtención de carne, leche o lana. Se ha observado que la distribución de las parasitosis entre el ganado no es homogénea y tan sólo un 10% de los animales son portadores de helmintos (Angulo-Cubillán, 2005). El cuadro clínico más común en ganadería cursa con problemas gastrointestinales que derivan en una pérdida de peso, un retraso en el crecimiento y una menor capacidad reproductora (Caracostangolo *et al.*, 2012). El hacinamiento de animales, el uso excesivo de tratamiento farmacológico sin control y la alimentación insuficiente son condiciones que permiten una mayor dispersión de las formas parásitas e incluso aumentan la resistencia a los fármacos ya comercializados, siendo por tanto un grave problema para el sector ganadero (Suárez, 2007). En términos económicos las pérdidas pueden superar los 1.200 millones de euros al año, a lo que hay que añadir lo que se invierte en tratamiento farmacológico, en torno a los 1.000 millones de euros (Zajaz, 2006).

El papel del sistema inmunitario en la expulsión o establecimiento de los parásitos no está establecido completamente y este hecho, junto con la variedad de ciclos biológicos y hábitats de parasitación de los helmintos, dificulta el desarrollo de terapias antiparasitarias eficaces, dejando abiertas muchas incógnitas aún por resolver en cuanto a la prevención y el tratamiento de las nematodosis. Por tanto, establecer las condiciones óptimas para experimentar con un modelo como el que proponemos, supone una oportunidad para estudios biológicos, inmunológicos y terapéuticos en general. Muchos de los helmintos más frecuentes son difíciles de estudiar en el laboratorio, ya que han evolucionado conjuntamente con sus hospedadores y se han adaptado estrechamente a ellos (Reynolds *et al.*, 2016). Por tanto, una alternativa es estudiar especies parásitas próximas en modelos de laboratorio en ratón para

después tratar de extrapolar los resultados a otros nematodos intestinales patógenos y otros hospedadores.

En nuestro estudio se ha propuesto el modelo *A. tetraptera* en ratón, parásito de los múridos con un ciclo biológico directo, por lo que la infección experimental puede ser, en principio, sencilla al tratarse de la especie hospedadora habitual o normal (Derothe *et al.*, 1997). Según nuestros resultados las condiciones de infección más eficaces fueron aquellas en las que utilizamos una dosis infectante de dos hembras. Aunque la infección con ambas dosis ensayadas, dos y cuatro hembras, se dio con éxito (73% y 100%), la media y tasa de vermes recuperados tras el sacrificio fue superior con la dosis de dos hembras. Por este hecho, y por simplificar la obtención de hembras suficientes para la infección experimental, se seleccionó la infección con dos hembras como la idónea.

En otros ensayos de infección con nematodos en ratón como en el caso de *Trichuris muris*, el tanto por ciento de infección varía según la cepa de ratón, la dosis infectante y las veces que se repite la infección (Bancroft *et al.*, 2001); por ello, establecer la especie y cepa hospedadora, la dosis infectante y la pauta de infección fue el primero de los objetivos del estudio. En el caso de *Heligmosomoides polygyrus* una sola dosis infectantes con larvas L3 obtuvo valores de infección similares a los nuestros con una tasa de éxito del 86% (Kristan *et al.*, 2004). Por otra parte, la infección con huevos lleva asociada la problemática de su alta volubilidad, por lo que es difícil trabajar con ellos ya que afecta al éxito de la infección experimental. Por ejemplo, una infección con 30.000 huevos por animal de *Ascaris suum* sólo infectó con 3,5 adultos por hospedador (Jungersen *et al.*, 1999)

En cuanto al tiempo que debía mantenerse la infección en los animales con *A. tetraptera*, tras analizar los resultados después de sacrificar a los 30 y 60 días, se seleccionó un tiempo de infección máximo de 30 días para evitar los problemas de autoinfección exógena como consecuencia de la maduración de los huevos en el lecho de la jaula de estabulación y reinfección tras cumplirse el periodo prepatente. En los animales que estuvieron dos meses infectados, aun estando estabulados en P2 y limpiándose la jaula exhaustivamente cada dos días, se observó la presencia de estadios larvarios acompañando a los adultos, fruto de nuevas infecciones secundarias tras la infección experimental primaria, con lo que se modificaba la dosis infectante de forma natural. El ciclo biológico de *A. tetraptera* se completa rápidamente en tan solo 23 días, y los huevos a pesar de que no están embrionados en el momento de la puesta, pueden hacerlo en cuestión de 6-7 días en condiciones óptimas de temperatura, luz y humedad, como ocurrió en los animales estabulados. Por todo ello, en nuestro caso utilizamos 20 días para asegurar que no se produjera en ningún caso autoinfección. De forma similar, en el caso del modelo experimental *T. muris* y ratón (Balb/c), el periodo prepatente del nematodo para que se complete su evolución hasta adultos y pueda detectarse la infección es de 30-32 días (Klementowicz *et al.*, 2012), por lo que ensayos que excedan los 30 días están sometidos a la posible variación de la carga parasitaria por autoinfección durante el estabulado de los animales.

El análisis de las variaciones en el recuento leucocitario en sangre periférica asociadas con la infección experimental, y en relación a los valores referencia en ratón, mostró un descenso del número de neutrófilos (neutropenia) junto con niveles anormalmente elevados de

linfocitos (linfocitosis). Asimismo, se observó una ligera eosinofilia, rasgo muy común de las respuestas inmunitarias frente a helmintos. Estas alteraciones en los niveles de leucocitos, linfocitosis y eosinófilos, también se observaron en perros parasitados por helmintos intestinales (*Ancylostoma caninum*, *Toxacara* spp. and *Dipylidium caninum*) en comparación con animales no parasitados (Qadir *et al.*, 2010). En ovejas infectadas con *Haemonchus contortus*, coincidiendo con nuestros resultados, se encontró neutropenia y linfocitosis, lo que se relacionó con la respuesta inmunitaria provocada por los productos de excreción/secreción del parásito (Mir *et al.*, 2007). Se ha descrito que glicoproteínas presentes en productos de excreción/secreción de *Trichuris suis* eran capaces de inhibir directamente la activación de los monocitos humanos, provocando una baja secreción de citoquinas inflamatorias como IL-12, y activando la respuesta del hospedador hacia una Th2 propia de infección por nematodos (Kuijk *et al.*, 2012). Como hemos comentado, el aumento en el recuento de eosinófilos se considera una característica distintiva de la infección por helmintos (Korenaga & Tada, 1994; O'connor *et al.*, 2007; Cadman *et al.*, 2014; Cooper & Eleftherianos, 2016). Su aumento en sangre periférica y en mucosa está promovido por el aumento sistémico de los niveles de la interleuquina 5 (IL-5), citoquina asociada a respuestas Th2 relacionadas con inmunoprotección (Onah *et al.*, 2000). Los eosinófilos contienen en sus gránulos la Proteasa Básica Principal (PBP), enzima que ataca la superficie de los helmintos de forma efectiva cuando los eosinófilos desgranulan sobre los parásitos dirigidos por las IgE específicas (Sawant *et al.*, 2015; Pitchord *et al.*, 2017). La liberación de dichas proteasas altera la homeostasis del intestino aumentando la motilidad intestinal del hospedador induciendo la expulsión de los nematodos (Gómez-Sambblas *et al.*, 2018). La eosinofilia se ha relacionado con un estado de protección frente a helmintiasis en corderos (Mosman *et al.*, 1986; Pond *et al.*, 1989; Else *et al.*, 1998; O'connor *et al.*, 2006), aunque es variable en función de la especie hospedadora y la carga parasitaria.

Con el fin de caracterizar la respuesta inmunitaria puesta en marcha en nuestro modelo de infección, se analizaron los niveles de anticuerpos específicos en suero y en mucosa intestinal a nivel de colon. La infección se asoció con un aumento significativo de las inmunoglobulinas IgM, IgG e IgE a nivel sistémico desde el inicio de la infección y con tendencia ascendente hasta el punto final de la intervención. El aumento en la concentración de las IgM es el mayor de las inmunoglobulinas analizadas, seguido de las IgG y, en menor grado, de las IgE. Como el sacrificio de los animales fue rápido tras la infección, es de esperar que el isotipo que predomine sea IgM. En los estudios realizados por Sotillo *et al.* (2007) en el modelo *Echinostoma caproni*-ratón se observó que inicialmente aumentaba la IgM siendo necesarias 6 semanas de infección para observar un aumento en los valores de IgG. El aumento de IgG específica a nivel sistémico también ocurre en el caso de infección de ratón con *H. polygyrus*, pero en este caso los valores de IgG llegan a triplicarse en tan solo 30 días post-infección (Prowse *et al.*, 1978; Pritchard *et al.*, 1983; McCoy *et al.*, 2008).

En la mucosa intestinal de los animales infectados se observó un aumento de los niveles de las inmunoglobulinas IgA, IgG e IgE respecto a los animales control. El aumento de las IgAs específicas secretadas al lumen intestinal es consecuencia de la respuesta inflamatoria, lo cual ejercerá un efecto neutralizante sobre el helminto, impidiendo la adhesión a la superficie intestinal y el establecimiento de la infección como parte de los mecanismos promotores de la expulsión de los mismos. Los niveles de IgE incrementados a nivel local podrían relacionarse con una sensibilización de los mastocitos locales y posterior desgranulación provocando con ello

inflamación local mediada por aminas vasoactivas (prostanglandinas y leucotrienos), quimioquinas, citoquinas y anafilotoxinas, siendo algunas de ellas, sustancias tóxicas para los nematodos (Murray *et al.*, 2009). El aumento de la IgG detectado en mucosa podría deberse a las IgG presentes en sangre periférica y, por tanto, en los capilares asociados a la mucosa.

Los anticuerpos IgG presentes en el suero de animales infectados reconocen varias bandas específicas del extracto total de *A. tetraptera* tras el *Western-blot* y la inmunodetección, cosa que no ocurre con los sueros de los animales control. Se detectó una banda con un peso molecular aproximado de 30kDa que corresponde a una proteína altamente inmunógena puesto que origina una señal, tras la inmunodetección, muy fuerte y la tinción Ponceau muestra que no es una proteína abundante en el extracto total del parásito, postulándose por tanto como marcador de infección. En un estudio previo utilizando sueros procedentes de pacientes diagnosticados de angiostrongiloidosis abdominal, se ha descrito que este suero inmune era capaz de reconocer una banda de proteínas de alrededor de 30kDa en los homogenados del nematodo *Angiostrongylus costaricensis* (Solano-Parada *et al.*, 2010) que correspondía a la subunidad catalítica de la serina/treonina proteína fosfatasa PP2Ac nativa (36kDa). El peso molecular de esta proteína coincide con el señalado para la banda inmunogénica de *Aspiculuris* y aunque todavía no hemos identificado la identidad de esta proteína, dado su alto grado de homología en diferentes especies, podría tratarse de esta fosfatasa. Además, aparece otra banda en animales infectados respecto al control, alrededor de los 70 KDa, menos intensa, que podría corresponder a la PP2Aa de 65 kDa, que junto con la PP2Ac constituyen las subunidades estructurales constantes de la enzima.

Cuando enfrentamos los anticuerpos de mucosa intestinal (IgAs) a las proteínas del extracto total del parásito, a pesar que los niveles detectados mediante ELISA son elevados, no se reconoce de forma específica ninguna banda tras la infección. Se observa el mismo patrón de reconocimiento de bandas que en animales control, pero las bandas aparecen ligeramente más intensas. Es posible que las proteínas que producen la estimulación inflamatoria para desencadenar la respuesta de IgA en mucosa no sean detectables a las concentraciones utilizadas para el ensayo de inmunodetección.

En otras infecciones por nematodos, se identificó como crucial el papel de los anticuerpos en la provisión de inmunidad adquirida frente al helminto entérico *H. polygyrus* (McCoy *et al.*, 2008). Así mismo, la respuesta humoral promovida por el nematodo *Syphacia muris* resultó protectora frente a infecciones secundarias por *Echinostoma caproni* (Trelis *et al.*, 2013). También se observó una producción de anticuerpos con capacidad protectora frente a la infección por *Strongyloides stercoralis* después de varias inmunizaciones con el antígeno recombinante Ss-IR (Abraham *et al.*, 2011). En el caso de la respuesta humoral frente *H. contortus*, el aumento de la IgA se relaciona con la expulsión de los nematodos adultos (Pérez *et al.*, 2001; Fakae *et al.*, 2004; Yanming *et al.*, 2007). En las infecciones experimentales con *T. muris* se correlacionó una rápida expulsión con una IgG sérica elevada (Dixon *et al.*, 2010). En otros nematodos como *H. polygyrus* se ha visto como el aumento de IgG tiene una gran importancia en la eliminación de los parásitos, en cambio no hubo resultados determinantes con IgE o IgA (Reynolds *et al.*, 2016). De lo que parece desprenderse el incierto papel de las inmunoglobulinas en la expulsión de dichos parásitos, pero si quizás como marcadoras de la eficiencia de la inmunización.

Al analizar las variaciones histológicas en cortes de colon proximal asociadas a la infección, no se observaron daños en la superficie del epitelio intestinal ni afectación de la arquitectura general de la mucosa. Sin embargo, a nivel celular, en los pliegues y criptas intestinales, sí se demostró una hipertrofia de las células caliciformes productoras de moco y linfocitosis, que son adaptaciones fisiológicas conocidas de la inmunidad adaptativa como mecanismo de defensa frente a nematodos intestinales. El aumento de la producción de moco soluble y la producción de IgA secretora impiden el establecimiento de la infección, neutralizando al parásito, evitando el contacto directo con la mucosa y facilitando su expulsión al ser arrastrado por el peristaltismo intestinal (Toledo *et al.*, 2004, 2006; Muñoz-Antolí *et al.*, 2007; Sotillo *et al.*, 2007, 2008, 2011; Onah *et al.*, 2001; Trelis *et al.*, 2011). La combinación de dichos fenómenos indicaría una activación de una respuesta Th2/Th9 que implica un aumento de la contractilidad intestinal, por aumento de acetilcolina y de la permeabilidad por disminución de la síntesis de Claudina-2, proteínas de la zona de oclusión o “unión estrecha” entre las células epiteliales (Gómez-Samblas *et al.*, 2018).

Las citoquinas desempeñan un papel crucial en la coordinación de la respuesta inmunitaria frente a los helmintos intestinales en términos de inmunidad protectora e inmunopatología. Por un lado, las quimioquinas son producidas por diversas células del sistema inmunitario y otros tipos celulares y tienen la función de crear gradientes de atracción para promover el desplazamiento de otras células hacia tejidos en situación de estrés infectados o dañados. En este sentido, en el caso de la infección por *A. tetraoptera*, mediante inmunohistoquímica, se ha podido constatar una sobreproducción a nivel de colon de la citoquina CXCL15, la cual se describió originalmente como una citoquina que se expresaba en mucosa de pulmón y capaz de atraer los neutrófilos en procesos inflamatorios (Schmidt *et al.*, 2007). En mucosa gastrointestinal, se la relaciona con la misma función estando presente en estómago, intestino delgado y en menor intensidad en ciego. Además, junto con la CXCL15 también se encontró GRO 1 atrayente de neutrófilos y macrófagos. Nuestros resultados sugieren que, aunque la presencia del nematodo no produce un daño macroscópico sobre la mucosa, sí que se asocia con la puesta en marcha de un proceso inflamatorio y liberación de quimioquinas creando gradientes quimiotácticos de atracción de neutrófilos y macrófagos a la zona de infección como mecanismo de defensa (Kolls *et al.*, 2004; Disteldorf *et al.*, 2015).

El paso inicial en la respuesta adaptativa a la infección lo dirigen las células presentadoras de antígenos (APC), que toman, procesan y presentan los antígenos a las células T cooperadoras (Th). La mayoría de estudios apuntan al nódulo linfático mesentérico como el sitio inicial de presentación antigénica a las células T tras la llegada de los antígenos lumbinales a través de la circulación (Bouvet *et al.*, 2002) o mediante la migración de células dendríticas captadoras de antígeno desde el epitelio (Kripke *et al.*, 1990; Enioutina *et al.*, 2000; Belyakov *et al.*, 2004). Las células dendríticas regulan positivamente la expresión de los ligandos de superficie y de los mediadores solubles que activan a las células T específicas a través de sus receptores co-estimuladores y de citoquinas. Esta interacción puede dirigir la naturaleza cualitativa de la respuesta hacia un modo activador en varios sentidos: Th1, Th2, Th9 o Th17 (Moser & Murphy, 2000; Bouchery *et al.*, 2014); o bien, en el camino inhibitorio, impidiendo o contrarrestando la activación inmunitaria mediante los T reguladores Foxp3+ (Tregs) (Yamazaki *et al.*, 2006).

Una vez el parásito ha sido detectado por células inmunitarias asociadas al epitelio y/o otras células no hematopoyéticas, las señales son transmitidas al sistema inmunitario y comienza una cascada inflamatoria y con ella la respuesta defensiva (Gerbe *et al.*, 2016; Howitt *et al.*, 2016; von Moltke *et al.*, 2016). La respuesta tipo Th2 es la que caracteriza a la inmunidad adaptativa en la infección por helmintos, siendo ésta la que se acompaña de respuesta de anticuerpos y cambios físicos en la barrera intestinal para promover la expulsión y favorecer la posterior reparación mediada por la activación de los Th9 que cooperará de forma positiva con la respuesta Th2. Recientemente, se ha descrito para los nematodos *T. muris* y *A. tetraptera*, que las células quimiosensoriales intestinales, denominadas células Tuft, se expanden y son primordiales para estimular la producción de IL-25 y con ello se activa la vía Th9 que modula la respuesta Th2 (Gómez-Samblas *et al.*, 2017, 2018). La respuesta Th9 protege al aumentar la hiperplasia de las células secretoras de moco y la contractilidad muscular en el intestino.

El perfil de expresión de citoquinas determinado en animales infectados experimentalmente con *A. tetraptera*, nos ha mostrado un tipo de respuesta que no se asocia claramente con la esperable Th2. Como reflejo de la respuesta sistémica que acompaña a la infección intestinal se analizaron las citoquinas en bazo tras 20 días de infección, encontrándose una sobreexpresión de IL-23 respecto a los controles, interleuquina considerada como un factor de proliferación de los linfocitos Th17, lo cual propiciaría el establecimiento de la parasitación con la puesta en marcha de inflamación local. Por otro lado, se detectaron niveles elevados de las citoquinas TGF- β e IL-10, las cuales se asocian con una respuesta de tipo Th9 (TGF- β factor de diferenciación e IL-10 producto de la activación) o Treg (TGF- β factor de diferenciación e IL-10 producto de la activación) que tratarían, en ambos casos, de compensar la respuesta inicial Th17 para controlar la infección y con ello la inflamación asociada para evitar mayores daños en el hospedador.

En los tejidos linfoides secundarios asociados a mucosa, placas de Peyer y nódulos linfáticos mesentéricos, se aprecia la misma respuesta primaria con activación de los linfocitos Th17 productores entre otras de IL-17 e IL-21. Por otro lado, se ha detectado un aumento en la expresión de IL-25, la cual es secretada en grandes cantidades por las células intestinales Tuft expuestas a los antígenos parasitarios. IL-25 se ha descrito como una de las primeras citoquinas epiteliales en dar señales de alarma junto a IL-33 (Fallon *et al.*, 2006). Estas citoquinas de la inmunidad innata son importantes para conducir a la posterior activación y diferenciación de los linfocitos cooperadores Th2 o Th9 en los ganglios linfáticos mesentéricos y en la lámina propia y, con ello, promover la producción de IL-5, IL-4, IL-13 e IL-9 (Price *et al.*, 2010; Saenz *et al.*, 2010; Harris *et al.*, 2011; Oeser *et al.*, 2015; Gómez-Samblas, 2017, 2018; Fonte *et al.*, 2018); esta última IL-9 se encontró sobreexpresada en placas de Peyer confirmando la activación local de la respuesta Th9.

La IL-13 producida por la Th2 y detectada en bazo, induce un gran número de fenómenos defensivos, entre ellos, aumentar el peristaltismo intestinal y la producción de moco al provocar la expansión de las células caliciformes y las células Tuft del epitelio intestinal afectado, creando una retroalimentación positiva respecto a la IL-25 y a la vía Th9 que actuarán para controlar o expulsar a los helmintos (Faulkner *et al.*, 1997, 1998; Gronke & Diefenbach, 2016). De hecho, se ha descrito que ratones con deficiencia en IL-25 tienen menor eficiencia en la expulsión de los helmintos intestinales como en el caso de *T. muris* (Owyang *et al.*, 2006), *T.*

spiralis (Angkasekwinai *et al.*, 2013), *N. brasiliensis* (Zhao *et al.*, 2010) y *H. polygyrus* (Pei *et al.*, 2016) y que la IL-13 puede aumentar la renovación epitelial en la infección con *T. muris* (Sorobetea *et al.*, 2017) así como activar a los macrófagos para iniciar la reparación de los tejidos dañados (Gronke & Diefenbach, 2016). La IL-13 es fundamental en la protección contra la mayoría de los nematodos como parte de la inmunidad adaptativa (Scales *et al.*, 2007; Halim *et al.*, 2014). Por el contrario, en *H. polygyrus* se ha descrito un aumento del peristaltismo mediado por la IL-9 (McSorley *et al.*, 2012) y no directamente por la IL-13. Como hemos mencionado anteriormente, la IL-9 aumenta la concentración de acetilcolina y bloquea de la síntesis de Claudina-2, permitiendo la salida de agua a la luz intestinal y el aumento de la permeabilidad epitelial. Es importante señalar que, aunque Th9 se considera un subconjunto distinto de linfocitos T cooperadores, su proximidad a las células Th2 se refuerza tanto por la demostración de que la IL-4 es necesaria para diferenciar las células Th0 en Th9, como por la observación de la interconversión de la respuesta Th2 en Th9 en presencia de TGF- β (Veldhoen *et al.*, 2008).

La presencia de citoquinas de la familia Th17 durante el establecimiento de la infección se acompaña de un importante componente inflamatorio que desemboca en una respuesta Th9. En estudio anteriores se demostró que los productos de excreción-secreción de *H. polygyrus* pueden inducir la producción de IL-17 desde las células Th0, las cuales en presencia de IL-6 y TGF- β se diferencian a Th17 (Grainger *et al.*, 2010). En respuesta a la infección por *H. polygyrus bakeri*, elevados niveles de IL-25 ha demostrado inhibir la producción de IL-17 en lámina propia y en NLM (Elliot *et al.*, 2008).

De forma general, el establecimiento y caracterización del modelo *A. tetraptera*-ratón, nos ha permitido definir el tipo de respuesta adaptativa frente a la infección, la cual se caracteriza por ser una respuesta inicial Th17 inflamatoria, y esto beneficiaría la colonización por el parásito, pero que tras las señales de alarma producidas por las células Tuft intestinales deriva en una respuesta Th9 mediada por la IL-25. Este perfil de expresión se observa más claramente en las placas de Peyer, tejido en contacto directo con los antígenos lumenales parasitarios. Por tanto, la producción de citoquinas a nivel de órganos y tejidos linfoides, favorecerá la mastocitosis, la expansión de los linfocitos B con producción de IgA secretora, aumento de la contractilidad y permeabilidad intestinal y sobreproducción de moco. Todo ello con el fin de controlar o eliminar la infección y evitar daños mayores por el propio proceso inflamatorio.

5.2. ENSAYOS DE VACUNACIÓN EN EL MODELO EXPERIMENTAL *A.tetraptera*-RATÓN

Existen pocas vacunas comercializadas que sean administradas a través de mucosas, ya que esta vía de inmunización presenta *a priori* numerosos obstáculos, que incluyen la diversidad estructural de la superficie de las mucosas, la complejidad en la interacción con las células inmunitarias y las limitaciones en la metodología experimental. Sin embargo, la vacunación a través de mucosa y concretamente a nivel intranasal, es un modo atractivo de inmunización por razones prácticas tales como: la facilidad de administración en el caso de inmunizaciones masivas, la alta vascularización de esta área, la ausencia de acidez y una superficie de mucosa relativamente pequeña que permite que se administren dosis bajas de antígeno por lo que no es necesario una gran cantidad de éste (Gebril *et al.*, 2012). Así mismo, en la cavidad nasal y su mucosa existe menos actividad proteolítica que en la luz intestinal, en la cual las proteínas antigénicas pueden degradarse y, por lo tanto, la inoculación intranasal de pequeñas cantidades de antígenos puede ser más efectiva, siendo capaz de desencadenar una respuesta inmunitaria generalizada en la mucosa (Solano-Parada *et al.*, 2010). Además, el hecho de que muchos agentes patógenos invaden el hospedador atravesando la barrera que supone la mucosa convierte la activación de la inmunidad en la mucosa en un interesante tema de estudio. Así, Fawzi *et al.* (2013) en ensayos de inmunización en corderos, demostraron que la administración intranasal de la molécula inmunógena PP2Ar potenciada con paredes bacterianas de *E. coli* fue muy efectiva como inmunoestimulante, generando niveles elevados de IgG específica en suero a los de 28 días tras la infección.

En nuestros ensayos se probaron dos pautas de vacunación, dos inmunizaciones consecutivas intranasales, y la combinación de una primera inmunización subcutánea con una intranasal. En el estudio de inmunización llevado a cabo por Fawzi *et al.* (2013) la inmunización vía subcutánea dio como resultado una respuesta de mucosa protectora en el abomaso frente a *Ostertagia ostertagi*, así como en el intestino delgado para el caso de *Cooperia oncophora*, lo que sugiere que un componente celular del sistema inmunitario está involucrado en la transferencia de la respuesta inmunitaria del sitio de inoculación al sitio excretor del tracto gastrointestinal una vez los animales son retados a nivel intestinal.

La eficacia de una vacuna está determinada no solo por vía de inoculación sino principalmente por el tipo de antígeno y por el adyuvante. Por ello en esta Tesis se ha probado la eficacia del péptido recombinante PP2A como antígeno, administrado en cuatro formulaciones vacunales (FV), dependiendo del adyuvante utilizado. Las fórmulas más eficaces en cuanto a protección, en función de la vía de administración y de la formulación, fueron aquellas que combinaron al antígeno con paredes bacterianas y mucoadhesivos (73% de protección para la fórmula FV-Carboximetilcelulosa o FV-CMC, y 80% para FV-Plurónico o FV-PLU). Probablemente el empleo de adhesivos le proporcionó consistencia a la vacuna permitiendo una presentación antigénica persistente al dificultar el aclaramiento mucociliar tras la inoculación, consiguiendo una absorción escalonada del antígeno.

Los adyuvantes por sí mismos (adhesivos y paredes bacterianas) sin péptido recombinante, empleados como control de las formulaciones, FV-CMC y FV-PLU, proporcionaron un efecto protector remarcable. En ambos casos, se consiguieron grados de

protección entre el 30% y el 40%, respectivamente. Las paredes bacterianas, en su papel inmunoestimulante, por sí mismas pueden estimular una respuesta Th2 especialmente a través de mucosas, poniendo en marcha mecanismos inespecíficos que pueden haber sido eficaces en el control de la infección (Barton *et al.*, 2002; Gómez-Samblas, 2017). Por tanto, el efecto adhesivo de los adyuvantes CMC y PLU, unido al efecto inmunoestimulante de las paredes bacterianas, contribuye al efecto protector de la vacuna cuando se incluye la proteína recombinante PP2A, llegando a niveles elevados.

Además de la eficacia de las formulaciones, se valoró en paralelo la seguridad de las mismas mediante el registro de daños y muertes en los animales de experimentación. La doble administración intranasal resultó segura en todos los casos, mientras que la administración de la vacuna vía subcutánea/intranasal para FV-CMC registró daños iniciales y alguna muerte en todos los grupos experimentales. Con ello, se seleccionó la vía intranasal/intranasal como la más segura y eficaz para los ensayos de inmunización con PP2Ar.

Con el objetivo de estudiar la respuesta inmunitaria en el ratón a la infección tras la inmunización, se analizaron los cambios a nivel de poblaciones leucocitarias en sangre periférica para los animales ensayados con FV-CMC y FV-PLU mediante citometría de flujo. Como consecuencia de la infección experimental con *A. tetraptera* se observa, en todos los grupos de animales expuestos al parásito, el patrón de neutropenia y linfocitosis descrito anteriormente. En los grupos inmunizados los niveles de neutrófilos son en algunas ocasiones inferiores al grupo infectado y la linfocitosis se ve acentuada, siguiendo el patrón clásico de infección: bajo porcentaje de neutrófilos y alto de linfocitos, por lo que la inmunización potenciaría a la respuesta generada en el ratón contra la infección.

Los datos de linfocitosis en sangre periférica podría ser el resultado de una linfoproliferación asociada a la infección que se ve acentuada con la inmunización previa. En el caso de la inmunización y posterior infección con *H. contortus*, aunque se observó un aumento general de los linfocitos periféricos, este no confirió inmunoprotección, ya que al final del estudio la tasa de infección resultó similar en todos los grupos, tanto el grupo control, como los controles internos con adyuvantes, como el grupo a estudio (García-Coiradas *et al.*, 2010).

En cuanto a los niveles de eosinófilos, ligeramente aumentados como resultado de la activación de la respuesta específica en sentido Th2, en los animales infectados, la inmunización previa provoca unos valores de eosinófilos inferiores y dentro de los valores normales de referencia. Es sabido que la mayoría de las infecciones por helmintos y sus productos de excreción-secreción estimulan la eosinofilia, pero también hay estudios que contradicen esta idea, ya que demuestran que ciertos productos de ES pueden suprimir directamente las respuestas de eosinófilos, por ejemplo, los productos de *Necator americanus* contienen una proteasa que escinde e inactiva la quimioquina Eotaxina o CCL11 producida por los Th2, evitando así el reclutamiento de eosinófilos (Culley *et al.*, 2000). En un modelo de ratón con deficiencia genética para la activación de eosinófilos los ratones mostraron alterada la resistencia a las infecciones por *N. brasiliensis*; en ausencia de eosinófilos un mayor número de larvas migraron al pulmón, pero la expulsión de los parásitos que posteriormente alcanzaron el intestino y maduraron, no se vio afectada por dicha deficiencia (Knott *et al.*, 2009).

La ausencia de signos clínicos y variaciones hematológicas notables podría estar relacionada con el empleo de una dosis infectante moderada (Fawzi *et al.*, 2013). Otra posible explicación, sería que la inmunización previa ha provocado una expulsión temprana de los vermes con respuesta adaptativa rápida y, con ello, se ha impedido la activación de la respuesta de eosinófilos detectada en los animales control de infección. En cualquier caso, nuestros resultados sugieren que la variación en los niveles de eosinófilos no está implicada en los efectos protectores de las vacunas.

El análisis de la respuesta de anticuerpos generados por la infección tras la inmunización previa con las fórmulas FV-CMC y FV-PLU es esencial para entender el efecto de la inmunización modulando la respuesta inmunitaria del hospedador. Aunque ambas inmunoglobulinas (IgM e IgG) aumentan como consecuencia de la infección con las dos fórmulas vacunales los niveles de estas inmunoglobulinas aumentan ya tras la primera dosis de inmunización, y una vez se retan a los animales inmunizados, los niveles de ambas inmunoglobulinas ascienden progresivamente, con diferencias significativas respecto a los grupos control (animales infectados, controles de adyuvantes y control no infectado). Por tanto, la inmunización previa conteniendo el péptido recombinante PP2Ar provocó un aumento en los niveles de anticuerpos frente a la infección, IgM e IgG, superiores a los generados por los animales control de infección.

También la administración de los adyuvantes produjo un ligero aumento de estas inmunoglobulinas, aunque inferior al experimentado cuando las fórmulas contienen la PP2Ar. En el caso específico del grupo inmunizado con los adyuvantes de la formulación FV-PLU se detectaron niveles de IgG elevados desde la primera inmunización intranasal, a pesar de no incluir al antígeno, sugiriendo que probablemente la combinación del Plurónic con las paredes bacterianas (PB) provoque la producción de anticuerpos y la activación de mecanismos inespecíficos que, como ya se ha comentado anteriormente conferirían protección parcial. El efecto protector de las paredes bacterianas frente a la infección por helmintos ya ha sido descrito por otros autores (Abel *et al.*, 2000; Petrovsky & Aguilar, 2004; González-Sánchez *et al.*, 2014) pudiendo atribuirse estos efectos a la activación inmunológica por parte de los lipopolisacáridos (LPS) presentes en las PB que actuarían como agonistas de los *Toll-like receptors* (TLRs) presentes en una amplia gama de células (Nhu *et al.*, 2006). Tras su activación, los TLRs modulan la respuesta inmunitaria induciendo la expresión, entre otras, de quimioquinas como la CCL2 (Varshney *et al.*, 2016). Esta quimioquina la expresan, entre otras, las células epiteliales intestinales cuando hay inflamación (Mawsley *et al.*, 2005; Williams, 2006) como es en nuestro caso.

Las dos fórmulas vacunales generaron, sin embargo, respuestas locales en mucosa muy diferentes con respecto a IgA secretora. En este caso sí hay diferencias claras entre los resultados obtenidos en función de la formulación empleada. Aunque en ningún caso la administración de los adyuvantes por sí mismos produjo ningún aumento, con la fórmula FV-CMC los niveles de IgA determinados fueron muy superiores a los del grupo control de adyuvantes e incluso superiores a los del control de infección. En cambio, cuando se inmunizó con la fórmula FV-PLU los niveles de IgA determinados en ratón fueron similares a los del grupo control de adyuvantes e incluso inferiores a los del control de infección. La respuesta local de IgAs, como mecanismo específico, es esencial para la expulsión temprana del parásito implicando mecanismos inmunitarios locales y evitando la cronicidad de la infección (Bungiro *et*

al., 2008). En estudios recientes se ha descrito que la estimulación directa *ex vivo* de los linfocitos B del bazo en ratones con LPS en los nódulos linfáticos, ofrece una respuesta elevada de IgG e IgAs nivel local (Mathews *et al.*, 2016), y que asociada a la inmunización nasal con bacterias se inducen respuestas de anticuerpos, locales y sistémicas, provocando fuertes respuestas de IgAs, pero también para IgG (Schmidt *et al.*, 1989; Kaplan *et al.*, 2015). En el estudio de Solano-Parada *et al.* (2010), se señala que los niveles de IgA aumentaron con la administración de PB. Se sabe que las PB inducen respuesta de la mucosa, incrementando la producción de IgA, lo que explicaría el aumento en los niveles de esta inmunoglobulina en este ensayo experimental. En nuestro caso, las PB aumentan ligeramente la producción de IgAs. Dado que se ha sugerido la necesidad de estimulación de la respuesta de la mucosa para inducir protección en infecciones por helmintos (Fawzi *et al.*, 2013), es posible que las paredes bacterianas provoquen una activación de la inmunidad de la mucosa, pero con la incorporación en la fórmula del péptido recombinante se consiguen niveles superiores de anticuerpos en el caso de la FV-CMC coincidentes con mayores niveles de protección.

En el estudio de Hodge *et al.* (2001) postulan que la eficacia de la inmunización intranasal para estimular la respuesta de IgA de mucosa se produce a través de inoculación del antígeno directamente en un sitio inductivo, y apoyan la idea de que las células productoras de IgA pueden migrar de los tejidos linfoides del tracto respiratorio a otras mucosas. Sin embargo, tras la inmunización intranasal, las respuestas de IgA específicas también pueden migrar a otras zonas de la mucosa del tracto gastrointestinal. Por lo tanto, nuestros datos apoyan el empleo de la inmunización intranasal para mejorar la inmunidad en mucosa intestinal.

A diferencia de la IgA secretora, los niveles de IgE no variaron en los grupos durante el ensayo de vacunación. Trabajos previos de inmunización con PP2Ar describen niveles de IgE invariables en todos los grupos durante la fase de inmunización hasta los 14 días después del reto, momento en que los valores IgE aumentaron significativamente (Solano-Parada *et al.*, 2010). En nuestro ensayo de vacunación, sin embargo, la IgE no aumentó al retar a los animales, lo que cabría esperar en caso de que la infección hubiera prosperado, indicando que la infección duró muy poco tiempo y la expulsión fue temprana.

En principio, tras una inmunización intranasal es esperable una respuesta humoral a nivel intestinal por la activación de la inmunidad de mucosas, pero no se sabe si es posible detectar una respuesta de anticuerpos. Es difícil correlacionar los niveles circulantes de anticuerpos con los que se pueden hallar a nivel local ya que las respuestas locales y sistémicas tienen cierta independencia (Onah *et al.*, 2000). Con los resultados expuestos se demuestra que los niveles en suero de IgM e IgG aumentan tras la inmunización con PP2Ar como se ha descrito en los estudios de Solano-Parada *et al.* (2010) que obtuvieron resultados que concuerdan con los nuestros, ya que se observaron altos niveles de inmunoglobulinas séricas tras la administración del antígeno recombinante, antes que el animal sea retado con el parásito, pudiendo estos afectar al establecimiento de la infección. La protección conferida por FV-CMC probablemente se halla relacionada con este aumento de ambos tipos de inmunoglobulinas, sistémicas y locales, por tanto, se consideró como la formulación con mayores posibilidades protectoras y como candidata para futuros ensayos de vacunación.

Cuando se investigó la inmunogenicidad de las proteínas de *A. tetraoptera* reconocidas por las IgG presentes en los sueros de animales, inmunizados con la fórmula FV-CMC y posterior infección, a lo largo del proceso, se detectó la misma banda específica, entre 25-37kDa, descrita anteriormente en el caso de los animales retados y cuya intensidad aumentaba con el paso de los días post-reto. Como hemos comentado anteriormente el tamaño de esta banda coincide con la región catalítica de la proteína PP2Ac nativa de *A. costaricensis* que se ha utilizado como antígeno en la vacuna, proteína que se ha descrito como altamente inmunogénica. Con la inmunización por sí misma, no se detecta ninguna banda específica, probablemente porque los anticuerpos generados como consecuencia de la administración de la vacuna no alcanzan todavía niveles suficientes para detectar ninguna proteína específica en las condiciones de nuestro ensayo.

La primera línea de defensa con la que se encuentran los nematodos en su hábitat intestinal la constituye la barrera de moco que acompaña al epitelio para conformar la mucosa intestinal. La superficie de las células intestinales está recubierta por un gel constituido mayoritariamente por mucinas, una serie de glicoproteínas que son secretadas por las células epiteliales caliciformes, componentes esenciales en la defensa y eliminación de los helmintos gastrointestinales (Hasnain *et al.*, 2010, 2011). El intestino grueso, lugar de parasitación de *A. tetraoptera*, posee dos capas de moco; la capa interna que aparece ligada a la mucosa y la más externa, menos densa, con la que están en contacto los parásitos. Las mucinas son el componente mayoritario del moco secretado por las células caliciformes, junto a otras moléculas como anticuerpos (IgAs) secretadas por células plasmáticas, defensinas secretadas por las células de Paneth, y lisozimas y péptidos con capacidad bactericida que recubren el epitelio intestinal (Linden *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2010). Por lo tanto, durante la infección aguda, junto con la diferenciación de las células caliciformes, se produce un incremento de los niveles de glicoproteínas dentro de dichas células y, por lo tanto, también observamos un aumento en la cantidad de glicoproteínas en la barrera de la mucosa liberadas como moco soluble.

Durante las infecciones intestinales se producen diferencias cuantitativas y cualitativas en la composición del moco (Linden *et al.*, 2008; Hasnain *et al.*, 2011). Es evidente la contribución de mucinas específicas a las propiedades físicas generales del moco y cómo la composición del moco puede cambiar con respecto a diferentes tipos de infecciones (Turner *et al.*, 2013). Las lectinas del tipo interlectinas, como otro componente del moco secretado por las células caliciformes, ejercen un papel en la resistencia a los helmintos incluyendo efectos indirectos sobre otras glicoproteínas secretadas por dichas células caliciformes intestinales. En concreto se les atribuye la función de entrecruzarse alrededor del parásito dando como resultado la formación de un "cemento glicoproteico" alrededor de los nematodos que facilita su expulsión (Artis, 2006). Asimismo, en relación al papel protector del moco, se ha demostrado que la mucina Muc2 está regulada positivamente en ratones resistentes a la infección por *T. muris*, sin embargo, existen otros mecanismos de expulsión implicados, pues los ratones con deficiencia de Muc2 también fueron capaces de expulsar al parásito y mostraron respuestas Th2 inalteradas (Hasnain *et al.*, 2010).

Inducidas por las citoquinas de Th2, IL-4 e IL-13, las células caliciformes también producen RELM- β (Resistin-Like Molecule beta), que participa en la defensa del hospedador uniéndose al aparato quimiosensorial de los parásitos, incrementando la secreción por parte de

las células caliciformes, fortaleciendo la capa de moco necesaria para mantener su función de barrera y la homeostasis inmunitaria (Artis *et al.*, 2006; Hogan *et al.*, 2006). En este sentido hemos demostrado un aumento en número y tamaño de las células caliciformes lo que conlleva un aumento de la liberación de moco soluble, el cual impide el establecimiento de los adultos en el intestino probablemente asociado al incremento en la secreción de las moléculas componentes de este moco. Este aumento ya es visible tras la inmunización de los animales y por tanto es posible que la vacuna este favoreciendo este proceso característico de las infecciones por helmintos. Un estudio reciente ha descrito el papel desempeñado por el "receptor Nod" intracelular en la activación de células caliciformes durante el proceso de inflamación y su efecto sobre la expulsión de *T. muris* (Wang *et al.*, 2016), demostrando que la activación de las células caliciformes productoras de moco está asociado a elevados niveles de IL-9 (Khan *et al.*, 2001; Hasnain *et al.*, 2010), interlequina cuyo aumento hemos descrito como consecuencia de la infección con *A. tetraoptera*.

La hiperplasia de las células caliciformes observada en los cortes de colon de animales inmunizados y retados (FV-CMC-R) es por tanto un sello distintivo de las infecciones por helmintos intestinales y es crucial para la expulsión de los nematodos. Todo esto, junto con el incremento de los anticuerpos locales (IgA) detectados en mucosa y unido a la acción específica mediada por los linfocitos cuyos niveles se encuentran incrementados tras la inmunización y reto (supuestamente células plasmáticas productoras de IgA y proteasas) podrían ser mecanismos implicados en una eliminación rápida del parásito. Como se ha dicho anteriormente, la hiperplasia de las criptas y sobreproducción de moco, se suelen asociar a la puesta en marcha de una respuesta Th2 con secreción de IL-13 primaria o secundaria a la activación de la Th9 con secreción de IL-9 y que a su vez aumenta el peristaltismo (Khan *et al.*, 2001; Datta *et al.*, 2005; Owyang *et al.*, 2006; Linden *et al.*, 2008, Hasnain *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2010; Gronke *et al.*, 2016).

Como se ha discutido anteriormente, como consecuencia de la infección por *A. tetraoptera*, las citoquinas CXCL15 y GRO 1 están incrementadas a nivel de colon, estando relacionadas con una función atrayente de neutrófilos y macrófagos como mecanismo de defensa. Sin embargo, la inmunización de los animales con la fórmula FV-CMC originó un perfil de expresión de quimioquinas más amplio, con un aumento de la producción de CCL2, CCL17 e IL-8 además de CXCL15 y GRO 1. Estos niveles de quimioquinas están aumentados en los animales inmunizados y retados, por tanto, la administración de la vacuna favorece una mayor producción y más amplia de citoquinas que únicamente la infección con *A. tetraoptera*.

La citoquina CCL2 la producen múltiples tipos celulares incluyendo macrófagos, linfocitos, mastocitos, incluso células endoteliales, fibroblastos.... Ejerce su efecto quimiotáctico atrayendo a monocitos, células dendríticas y células T de memoria. Las células dendríticas y los macrófagos son células presentadoras de antígenos (APC), estas células son atraídas por CCL2 a la mucosa intestinal, las cuales reconocerán al antígeno que lo presentará a linfocitos T inmaduros para su activación. En lo animales expuestos a la FV-CMC, y que demostraron alto nivel de protección frente a la infección, la CCL2 se observó con gran intensidad en los estudios de inmunohistoquímica, lo que nos induce a pensar en que esta vía de maduración de linfocitos T se activó tras la inmunización con PP2Ar, reclutando linfocitos a la zona de la mucosa en contacto con el parásito, hecho que corroboran los resultados de la histología de colon con

tinción con PAS en la que se observaba una linfocitosis intraepitelial aumentada en colon tras la inmunización, pudiendo ser responsable de dar una respuesta secundaria rápida y eficaz.

Los resultados descritos para CCL2 se ven reforzados con los obtenidos para la citoquina CCL17, otra de las quimioquinas sobreexpresadas por efecto de la inmunización, que también es atrayente de linfocitos T hacia la mucosa. La CCL17 es necesaria para la inducción de una respuesta inflamatoria a nivel de intestino en ratones asociado a la activación de la Th1/Th17 reduciendo la expansión de las células Treg (Heiseke *et al.*, 2012). La CCL17 es expresada por numerosas células entre las que se encuentran los linfocitos cooperadores (Th CD4+), linfocitos T (Tc citotóxicos CD8+), células NK (“natural killer”), macrófagos y células dendríticas (Ness *et al.*, 2006; Semmling *et al.*, 2010). Su receptor, el CCR4 se expresa en células Th17, Th2 y células Treg. Se conocen muchas funciones de la CCL17 y se ha identificado su receptor CCR4 a nivel pulmonar y cutáneo (Lee *et al.*, 2010), donde reduce la inflamación. Además, CCL17 actúa sobre la migración las células dendríticas a los NLM (Reiss *et al.*, 2001), aunque se conoce muy poco sobre su función a nivel intestinal (Yuan *et al.*, 2007). La CCL17 induce la producción de IL-12 e IL-23 por parte de las células dendríticas, promoviendo la diferenciación a Th1 y Th17 y reduciendo los niveles de inducción de las células Foxp3+ o Treg. Estos linfocitos Treg son productores de IL-10 y TGF- β , contribuyendo así a su actividad reguladora/supresora, suprimen la inflamación al limitar la activación de células Th1 y Th17, pero que también bloquean la activación de los linfocitos Th2 y suprimen la producción de IgE.

Nuestros resultados muestran que los animales que han sido previamente inmunizados con FV-CMC, han generado una respuesta sistémica con marcado carácter Th1, con un aumento de IFN- γ , TNF- α e IL-2 respecto a los controles de infección y por el contrario bajos niveles de IL-23 e IL-17 propias de la respuesta Th17. La activación de la respuesta en sentido Th1 con sobreproducción de INF- γ bloquearía las otras respuestas Th17 y Th2. En 2005, Cliffe y colaboradores propusieron una nueva explicación para la expulsión de *T. muris* en animales resistentes motivado por el hecho de que las infecciones crónicas de nematodos intestinales causan una alteración de la estructura intestinal, sugirieron que el aumento del recambio de células epiteliales en el intestino puede evitar que el parásito permanezca dentro del hospedador. Específicamente, la infección por *T. muris* se asocia con una mayor proliferación de células madre epiteliales dentro de las criptas de Lieberkühn en el intestino grueso, mediada por IFN- γ , lo cual resulta en una hiperplasia de criptas masiva (Potten *et al.*, 1997). El aumento de proliferación inducido por IFN- γ no puede continuar de una manera no regulada, por lo que la infección por *T. muris* también se asocia con una elevación en la apoptosis de células epiteliales en el intestino grueso. Aunque los mecanismos de expulsión que operan en cada modelo aún no se han dilucidado completamente, parece que si bien el recambio epitelial acelerado es esencial en la expulsión de una infección primaria. A pesar de ello, se considera que potencialmente, los mecanismos dependientes de anticuerpos desempeñan un papel más prominente en la expulsión de gusanos (Dixon *et al.*, 2010).

En cuanto a la respuesta local, la inmunización produjo un predominio de la respuesta tipo Th17, destacando en placas de Peyer los elevados niveles de expresión de IL-23 e IL-17 de forma más acentuada a lo que ocurre con la infección, provocando una menor carga de parásitos. La respuesta local Th17 activa a IL-9 la cual deriva en una respuesta Th9, directamente relacionada el aumento de IgA secretora. Recientemente, se ha encontrado que la síntesis de

IgA específica depende de la respuesta Th17 por placas de Peyer en el intestino (Fawzi *et al.*, 2013). El papel de la respuesta Th17 a nivel local explicando el efecto de la inmunización en la infección posterior, todavía está por confirmar. Estudios realizados con el trematodo intestinal *E. caproni*, sugieren que la activación de esta vía puede ser protectora. En modelos de infección por este parásito las citoquinas de la familia Th17, IL-17 e IL-23, están sobreexpresadas en ratas (modelo agudo de infección) en las que el parásito es expulsado tras 4 semanas de infección, y no en ratones (modelo de infección crónica) (Sotillo *et al.*, 2011). Nuestros resultados son coherentes con el trabajo de Gómez-Samblas *et al.* (2018) que ha demostrado que al reducir los niveles de la IL-23 circulante, mediante el tratamiento con anticuerpos monoclonales anti-IL-23, se redujo drásticamente el número de *A. tetraoptera* impidiendo el establecimiento y desarrollo de estos nematodos intestinales parásitos, sugiriendo que la disminución de los niveles inflamatorios de IL-17 altera el entorno Th9.

La valoración global del efecto de la formulación que combina al péptido PP2Ar con carboximetilcelulosa y paredes bacterianas (FV-CMC) nos hace proponer esta vacuna como la candidata para futuros ensayos de inmunización intranasal frente a nematodosis. A nivel de mucosa esta vacuna estimuló la secreción de IgAs específicas. La producción de anticuerpos probablemente fue provocada por la inflamación local detectada en placa de Peyer con carácter Th17 (IL-23 e IL-17), que aumentó la secreción de moco y promovió la atracción de células inmunoactivas por las quimioquinas (CCL2, CCL17, GRO 1, CXCL15 e IL-8), mostrando un efecto local protector a consecuencia de la inmunización intranasal de los animales.

6. CONCLUSIONES

1. El modelo de infección experimental *A. tetraoptera*-ratón (CD1), utilizando dos hembras grávidas y un tiempo de infección de 20 días, se considera de utilidad para su aplicación en estudios parasitológicos relacionados con nematodosis intestinales por su sencillez y reproducibilidad.
2. La infección experimental del ratón en condiciones estándar produce una respuesta inmunitaria sistémica caracterizada a nivel hematológico por neutropenia, linfocitosis y ligera eosinofilia, asociada con niveles elevados de inmunoglobulinas específicas, IgM, IgG e IgE desde los primeros días de la infección.
3. A nivel intestinal la infección provoca una respuesta defensiva local, que combina un aumento en la producción de IgA secretora, un incremento en la producción y secreción de moco soluble por parte de las células caliciformes, con secreción de quimioquinas (CXCL15 y GRO 1) atrayentes de neutrófilos y macrófagos, y con linfocitosis intraepitelial.
4. El perfil de citoquinas en las placas de Peyer asociado al modelo de infección muestra, a nivel local, una respuesta inflamatoria de carácter Th17 (IL-17, IL-21) que aparece tempranamente, para desembocar en una respuesta Th9 (IL-9), tras la activación de las células epiteliales Tuft y la liberación de IL-25, la cual se pone en marcha para el control de la infección y del proceso inflamatorio.
5. La doble inmunización vía intranasal con las fórmulas que combinan mucoadhesivos, paredes bacterianas junto al péptido PP2Ar (FV-CMC y FV-PLU) ofreció los mejores resultados de eficacia protectora y seguridad.
6. La respuesta inmunitaria detectada en los ratones sometidos a los ensayos de inmunización con las fórmulas FV-CMC y FV-PLU se caracteriza por una concentración elevada en suero de IgM e IgG desde la primera inmunización y por un aumento progresivo y más marcado tras el reto o infección.

7. Únicamente la inmunización con la fórmula FV-CMC produjo una respuesta a nivel de mucosa, con un aumento de IgAs, probablemente como consecuencia de la inflamación local detectada en placas de Peyer, en las que se detectó una respuesta con carácter Th17 (IL-23 e IL-17), que aumentó la secreción de moco y promovió la atracción de células inmunoactivas por las quimioquinas (CCL2, CCL17, GRO 1, CXCL15 e IL-8), mostrando un efecto local protector.

8. La valoración del conjunto de los resultados expuestos, permite considerar a la formulación que combina al péptido PP2Ar con carboximetilcelulosa y paredes bacterianas (FV-CMC) como la mejor candidata para futuros ensayos de inmunización intranasal frente a nematodosis.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Abel (L.C.J.), Chen (S.), Ricca (L.G.), Martins (M.F.), Garcia (M.), Ananias (R.Z.), Mussalem (J.S.), Squaiella (C.C.), Shaw (R.J.) & Longo-Maugéri (I.M.), 2009.- Adjuvant effect of LPS and killed *Propionibacterium acnes* on the development of experimental gastrointestinal nematode infestation in sheep. *Parasite Immunology*, 31: 604-612.
- Aboobaker (A. A.) & Blaxter (M. L.), 2003.- Use of RNA interference to investigate gene function in the human filarial nematode parasite *Brugia malayi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 129: 41-51.
- Abraham (D.), Hess (J.A.), Mejia (R.), Nolan (T.J.), Lok (J.B.), Lustigman (S.) & Nutman (T.B.), 2011.- Immunization with the recombinant antigen Ss-IR induces protective immunity to infection with *Strongyloides stercoralis* in mice. *Science*, 29(45): 8134-8140.
- Adamson (M.L.), 1984.- Haplodiploidy in *Aspiculuris tetraptera*(Nitzsch) (Heteroxyematidae) and *Syphacia obvelata* (Rudolphi) (Oxyuridae), nematode (Oxyurida) parasites of *Mus musculus*. *Canadian Journal of Zoology*, 62(5): 804-807.
- Allison (A. G.) & Gregoriadis (G.), 1974.- Liposomes as immunological adjuvants. *Nature*, 15: 252.
- Allison (A. C.) & Byars (N. E.), 1991.- Immunological adjuvants: desirable properties and side-effects. *Molecular Immunology*, 28: 279-284.
- Andersen (J.N.), Jansen (P.G.), Echwald (S.M.), Mortensen (O.H.), Fukada (T.), Del Vecchio (R.), Tonks (N.K.) & Møller (N. P. H.), 2004.- A genomic perspective on protein tyrosine phosphatases: gene structure, pseudogenes, and genetic disease linkage. *The FASEB Journal*, 18: 8-30.
- Andrade (M. A.) & Bork (P.), 1995.- HEAT repeats in the Huntington's disease protein. *Nature Genetics*, 11: 115-116.
- Angkasekwina (P.) Srimanote (P.), Wang (Y.H.), Pootong (A.), Sakolvaree (Y.), Pattanapanyasat (K.), Chaicumpa (W.), Chaiyaroj (S.) & Dong (C.), 2013.- Interleukin-25 (IL-25) promotes efficient protective immunity against *Trichinella spiralis* Infection by enhancing the antigen-specific IL-9 response. *Infection and immunity*, 81: 3731- 3740.
- Angulo- Cubillán (F.J.), 2005.- Nematodosis intestinales En: Manual de Ganadería Doble Propósito pp: 377-383.
- Anthony (R.M.), Rutitzky, (L.I.), Urban (J.F.), Staderker (M.J.) & Gause (W.C.), 2007.- Protective immune mechanisms in helminth infection. *Nature Reviews. Immunology*, 7(12): 975- 987.
- Anya, (A.O.), 1966.- Studies on the biology of some oxyurid nematodes: The hatching of eggs and development of *Aspiculuris tetraptera* (Schulz), within the host. *Journal Helminthology*, 40 (3): 261- 268.
- Arenal (A.), García (C.), de la Fé Mora (Y.), Pimentel (R.), Cabrera (E.) & Pimentel (E.), 2003.- Estudio preliminar de la polietilenimina como vector en la transferencia de genes en Tilapias (*Oreochromis sp.*). *CIVA*, 2003: 55-460.
- Artis (D), 2006.- New weapons in the war on worms: Identification of putative mechanisms of immune-mediated expulsion of gastrointestinal nematodes. *International Journal of Parasitology*, 36(6): 723- 733.
- Auer (H.) & Aspöck (H.), 2014.- Helminths and helminthoses in Central Europe: general overview and diseases caused by trematodes (flukes). *Wiener Medizinische Wochenschrift*, 164(19-20): 405-413.
- Baig (M.A.), Qadir (A.) & Rasheed (J.), 2010.- A review of eosinophilic gastroenteritis. *Journal of the national medical association*, 98(10): 1616-1619.

- Baker (D.G.), 2007.- Parasites of rats and mice. En: Flynn's parasites of laboratory animals (Blackwell Publishing) pp: 303-397.
- Bancroft (J.K.), Neil (J.E.), Humphreys (E.) & Grecis (R.K.), 2001.- The effect of challenge and trickle *Trichuris muris* infections on the polarization of the immune response. *International Journal for parasitology*, 31(14): 1627-1637.
- Banerjee (S.), Siddiqui (L.), Bhattacharya (S. S.), Kaity (S.), Ghosh (A.), Chattopadhyay (P.), Pandey (A.) & Singh (L.), 2012.- Interpenetrating polymer network (IPN) hydrogel microspheres for oral controlled release application. *International Journal of Biological Macromolecules*, 50: 198-206.
- Barford (D.), Das (A.K.) & Egloff (M.K.), 1998.- The structure and mechanism of protein phosphatases: insights into catalysis and regulation. *Annual review of biophysics and biomolecular structure*, 27:133-64.
- Barton (G. M.), Medzhitov (R.), 2002.- Control of adaptive immune responses by Toll- like receptors. *Current Opinion in Immunology*, 14: 380-383.
- Bassetto (C.C.) & Amarante (A.F.T.), 2015.- Vaccination of sheep and cattle against haemonchosis. *Journal of Helminthology*, 89: 517-525.
- Beacock-Sharp (H.), Donachie (A.M.), Robson (N.C.) & Mowat (A.M.), 2003.- A role for dendritic cells in the priming of antigen-specific CD4+ and CD8+ T lymphocytes by immune-stimulating complexes in vivo. *International Immunology*, 15: 711-720.
- Behnke (J.M.), Stewart (A.), Bajer (A.), Gryzbek (M.), Harris (P.D.), Lowe (A.), Ribas (A.), Smales (L.) & Vandegrift (K.J.), 2015.- Bank voles (*Myodes glareolus*) and house mice (*Mus musculus musculus*; *M. m. domesticus*) in Europe are each parasitized by their own distinct species of *Aspiculuris* (Nematoda, Oxyurida). *Parasitology*, 142(12): 1493-1505.
- Belyakov (I.M.), Ahlers (J.D.) & Berzofsky (J.A.), 2004.- Mucosal AIDS vaccines: current status and future directions. *Expert review of vaccines*, 3(4):65-73.
- Benmohamed (L.), Gras-Masse (H.), Tartar (A.), Daubersies (P.), Brahimi (K.), Bossus (M.), Thomas (A.) & Druilhe (P.), 1997.- Lipopeptide immunization without adjuvant induces potent and long-lasting B, T helper, and cytotoxic T lymphocyte responses against a malaria liver stage antigen in mice and chimpanzees. *European Journal of Immunology*, 27: 1242-1253.
- Benmohamed (L.), Thomas (A.), Bossus (M.), Brahimi (K.), Wubben (J.), Gras-Masse (H.) & Druilhe (P.), 2010.- High immunogenicity in chimpanzees of peptides and lipopeptides derived from four new *Plasmodium falciparum* pre-erythrocytic molecules. *Vaccine*, 18: 2843-2855.
- Bergquist (R.) & Lustigman (S.), 2010.- Control of important helminthic infections vaccine development as part of the solution. *Advances in Parasitology*, 73: 297- 326.
- Bethony (J.M.), Loukas (A.), Hotez (P.J.) & Knotx (D.P.), 2006.- Vaccines against blood-feeding nematodes of humans and livestock. *Parasitology*, 133: 63-79.
- Bigaeva (E.), Doorn (E. V.), Liu (H.) & Hak (E.), 2016.- Meta-Analysis on randomized controlled trials of vaccines with QS-21 or ISCOMATRIX Adjuvant: Safety and Tolerability. *PLoS ONE*, 11(5): e0154757.
- Boag (P. R.), Ren (P.), Newton (S. E.) & Gasser (R. B.), 2003.- Molecular characterisation of a male-specific serine/threonine phosphatase from *Oesophagostomum dentatum* (Nematoda: Strongylida), and functional analysis of homologues in *Caenorhabditis elegans*. *International Journal for Parasitology*, 33: 313-325.

- Bouchery (T.) Kyle (R.), Ronchese (F.), Le Gros (G.), 2014.- The differentiation of CD4⁺ T-helper cell subsets in the context of helminth parasite infection. *Frontiers in Immunology*, 5: 487- 504.
- Bouvet (J.P.), Decroix (N.) & Pamonsinlapham (P.), 2002.- Stimulation of local antibody production: parenteral or mucosal vaccination? *Trends in immunology*, 23(4): 209-213.
- Bozzuto (G.) & Molinari (A.), 2015.- Liposomes as nanomedical devices. *International Journal of Nanomedicine*, 10: 975-999.
- Bradford (M.M.), 1976.- A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- Broadhurst (M.J.), Leung (J.M.), Kashyap (V.), McCune (J.M.), Mahadevan (U.), McKerrow (J.H.) & Ping (J.), 2010.- IL-22⁺ CD4⁺ T Cells Are Associated with therapeutic *Trichuris trichiura* Infection in an ulcerative colitis patient. *Science Translational Medicine*, 60(2): 60-88.
- Bungiro (R.D.), Sun (T.), Harrison (L.M.), Shoemaker (C.B.) & Cappello (M.), 2008.- Mucosal antibody responses in experimental hookworm infection. *Parasite Immunology*, 30(5): 293-303.
- Burgess (C.G.S.), Bartkey (Y.), Redman (E.), Skuce (P.J.), Nath (M.), Whitelaw (F.), Tait (A.), Gilleard (J.S.), & Jackson (F.), 2012.- A survey of the trichostrongylid nematode species present on UK sheep farms and associated anthelmintic control practices. *Veterinary Parasitology*, 189: 299-307.
- Cadman (E.T.), Thyse (K.A.), Bearder (S.), Cheung (A.Y.N.), Johnston (A.C.), Lee (J.J.) & Lawrence (R.A.), 2014.- Eosinophils are important for protection, immunoregulation and pathology during infection with nematode microfilariae. *PLoS Pathogens*, 10(3): e1003988.
- Callahan (H.L.), Crouch (R.K.) & James (E.R.), 1988.- Helminth anti-oxidant enzymes: a protective mechanism against host oxidants? *Parasitology Today*, 4(8): 218- 225.
- Caracostantogolo (J.), Castaño (R.) , Cutullé (Ch.), Cetrá (B.) , Lamberti (R.), Olaechea (F.), Ruiz (M.) , Schapiro (J.), Martínez (M.), Balbiani (G.) & Castro (M.), 2005.- Evaluación de la resistencia a los antihelmínticos en rumiantes en Argentina. En: Resistencia a los Antiparasitarios Internos en Argentina Estudio de FAO Producción y Sanidad Animal Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, pp: 1014-1200.
- Caracostantogolo (J.), Schapiro (J.), Morici (G.), Castaño Zubieta (R.) & Martinez (M.), 2012.- Gastroenteritis verminosa. En: Parasitología y enfermedades parasitarias, (Hemisferio Sur, Buenos aires)
- Cliffe (L.J), Humphreys (N.E.), Lane (T.E.), Potten (C.S.), Booth (C.), Grecis (R.K.), 2005.- Accelerated intestinal epithelial cell turnover: a new mechanism of parasite expulsion. *Science*, 308: 1463-1465.
- Cohen (P.), 1990.- The structure and regulation of protein phosphatases. *Advances in second messenger and phosphoprotein research*, 24: 230-235.
- Conder (G.) & Campbell (W.), 1995.- Chemotherapy of nematode infections of veterinary importance, with special reference to drugs resistance. *Advances in Parasitology*, 35: 2-84.
- Cooper (N.R.), 1991.- Complement evasion strategies of microorganisms. *Immunology Today*, 12(9): 327-331.
- Cooper (D.) & Eleftherianos (I.), 2016.- Parasitic nematode immunomodulatory strategies: recent advances and perspectives. *Pathogens*, 5(3): 58- 70.

- Cortés (A.), Sotillo (J.), Muñoz-Antoli (C.), Molina- Durán (J.), Esteban (J.G.) & Toledo (R.), 2017.- Antibody trapping: A novel mechanism of parasite immune evasion by the trematode *Echinostoma caproni*. *PLoS Neglected Tropical diseases*,11(7): e0005773.
- Culley (F.J.), Brown (A.), Conroy (D.M.), Sabroe (I.), Pritchard (D.I.) & Williams (T.J.), 2000.- Eotaxin is specifically cleaved by hookworm metalloproteases preventing its action in vitro and in vivo. *Journal of Immunology*, 165: 6447–6453.
- Datta (S.K.), Sabet (M.), Nguyen (K.P.L.), Valdez (P. A.), Gonzalez-Navajas (J. M.), Islam (S.), Mihajlov (I.), Fierer (J.), Insel (P.A.), Webster (N.J.), 2010.- Mucosal adjuvant activity of cholera toxin requires Th17 cells and protects against inhalation anthrax. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107: 10638-10643.
- Derothe (J.M.), Loubes (C.), Orth (A.), Renaud (F.) & Moulia (C.), 1997.- Comparison between patterns of pinworm infection (*Aspicularis tetraptera*) in wild and laboratory strains of mice, *Mus musculus*. *International Journal of Parasitology*, 6(27): 645-651.
- Disteldorf (E. M.), Krebs (C. F.), Paust (H.J.), Turner (J.E.), Nouailles (G.), Tittel (A.), Meyer-Schwesinger (C.), Stege (G.), Brix (S.) & Velden (J.), 2015.- CXCL5 Drives Neutrophil Recruitment in T(H)17-Mediated GN. *Journal of the American Society of Nephrology*, 26: 55-66.
- Dixon (H.), Little (M.C.) & Else (K.J.), 2010.- Characterisation of the protective immune response following subcutaneous vaccination of susceptible mice against *Trichuris muris*. *International Journal of Parasitology*, 40: 683- 693.
- Elliot (D.E.), Metwali (A.), Leung (J.), Setiawan (T.), Blum (A.M.), Ince (M.N.), Bazzone (L.E.), Stadecker (M.J.), Urban (J.F.) & Weinstock (J.V.), 2008.- Colonization with *Heligmosomoides polygyrus* suppresses mucosal IL-17 production. *Journal of Immunology*, 181(4): 2414-2419.
- Else (K. J.) & Finkelman (F. D.), 1998.- Invited review Intestinal nematode parasites, cytokines and effector mechanisms. *International Journal for Parasitology*, 28: 1145- 1158.
- Else (K.J.) & Grencis (R.K.), 1991.- Cellular immune responses to the murine nematode parasite *Trichuris muris*. Differential cytokine production during acute or chronic infection. *Immunology*, 72(4): 508-513.
- Enioutina (E.Y.), Visic (V.D.) & Daynes (R.A.), 2000.- Enhancement of common mucosal immunity in aged mice following their supplementation with various antioxidants. *Vaccine*, 18(22): 2381-2391.
- Espino (A.M.), Osuna (A.), Gil (R.) & Hillyer (G.V.), 2005.- *Fasciola hepatica*: Humoral and cytokine responses to a member of the saposin-like protein family following delivery as a DNA vaccine in mice. *Experimental Parasitology*, 110: 374-383.
- Erickson (A.B.), 1938.- Parasites of some Minnesota Cricetidae and Zapodidae and an host catalogue of helminth parasites of native American mice. *American Midland Naturalist*, 20: 757-589.
- Fakae (B.B.), Musongong (G.A.), Chiejina (S.N.), Behnke (J.M.), Ngongeh (L.A.) & Wakelin (D.), 2004.- Variability in the resistance of the Nigerian West African Dwarf goat to abbreviated escalating trickle and challenge infections with *Haemonchus contortus*. *Veterinary parasitology*, 122(1): 51-65.
- Fallon (P.G.) Ballantyne (S.J.), Mangan (N.E.), Barlow (J.L.), Dasvarma (A.), Hewett (D.R.), McIlgorm (A.), Jolin (H.E.) & McKenzie (A.N.), 2006.- Identification of an interleukin (IL)-25-dependent cell population that provides IL-4, IL-5, and IL-13 at the onset of helminth expulsion. *Journal of experimental Medicine*, 203: 1105-1116.

- Faquim- Mauro (E.L.) & Macedo (M.S.), 1998.- The immunosuppressive activity of *Ascaris suum* is due to high molecular weight components. *Clinical Experimental Immunology*, 114: 245-251.
- Faulkner (H.), Humphreys (N.), Renaud (J.C.), Van Snick (J.) & Grecis (R.), 1997.- Interleukin-9 is involved in host protective immunity to intestinal nematode infection. *European Journal of Immunology*, 27:2536–2540.
- Faulkner (H.), Renaud (J.C.), Van Snick (J.) & Grecis (R.K.), 1998.- Interleukin-9 enhances resistance to the intestinal nematode *Trichuris muris*. *Infection and Immunology*, 66:3832–3840.
- Faulkner (H.) Turner (J.), Kamgno (J.), Pion (S.D.), Boussinesq (M.) & Bradley (J.E.), 2002.- Age and infection intensity-dependent cytokine and antibody production in human trichuriasis: the importance of IgE. *The Journal of infectious diseases*, 185(5): 665- 672.
- Faux (M. C.) & Scott (J. D.), 1996.- More on target with proteinphosphorylation: conferring specificity by location. *Trends in Biochemical Sciences*, 21: 312-315.
- Fawzi (E.M.), Curz (T.), Gómez-Samblas (M.), González- González (G.), Solano (J.), González- Sánchez (M.E.), De Pablos (L.M.), Corral- Caridad (M.J.), Cuquerella (M.), Osuna (A.) & Alunda (J.M.), 2013.- Intranasal immunization of lambs with Serine/Threonine Phosphatase 2A against gastrointestinal nematodes. *Clinical and Vaccine Immunology*, 20(9): 1352-1361.
- Fonte (L.), 2018.- Áscaris y ascariosis. En De la biología la control (Editorial Ciencias Médicas, La Habana)
- Freund (J.), Casals (J.) & Hosmer (E.), 1937.- Sensitization and antibody formation after injection of tubercle bacilli and parafin oil. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 37: 509-513.
- Fu (Y.), Wang (W.), Tong (J.), Pan (Q.), Long (Y.), Qian (W.) & Hou (X.), 2009.- Th17: a new participant in gut dysfunction in mice infected with *Trichinella spiralis*. *Mediators of Inflammation*, 2009: 52-59.
- Gállego (J.), 2007.- Parasitología. Conceptos generales. En: Manual de Parasitología. Morfología y biología de los parásitos de interés sanitario (Publicaciones i edicions de la Universitat de Barcelona), pp: 29-100.
- Garcia-Coiradas (L.), Angulo-Cubillan (F.), Valladares (B.), Martinez (E.), de la Fuente (C.), Alunda (J.M.) & Cuquerella (M.), 2010.- Immunization against Lamb Haemonchosis with a Recombinant Somatic Antigen of *Haemonchus contortus* (rHcp26/23). *Veterinary Medicine International*, 2010: 852146.
- Gaze (S.), McSorley (H.J.), Daveson (J.), Jones (D.), Bethony (J.M.), Oliveira (L.M.), Speare (R.), McCarthy (J.S.), Engwerda (C.R.), Croese (J.) & Loukas (A.), 2012.- Characterising the mucosal and systemic immune responses to experimental human hookworm infection. *PLoS Pathogens*, 8(2): 520-533.
- Gebril (A.), Alsaadi (M.), Acevedo (R.), Mullen (A.B.) & Ferro (V.A.), 2012.- Optimizing efficacy of mucosal vaccines. *Expert reviews vaccines*, 11(9): 1139- 1155.
- Geldhof (P.), Claerebout (E.), Knox (D.), Vercauteren (I.), Looszova (A.) & Vercruyse (J.), 2002.- Vaccination of calves against *Ostertagia ostertagi* with cysteine proteinase enriched protein fractions. *Parasite Immunology*, 24: 263-270.
- Gerbe (F.), Sidot (E.), Smyth (D.J.), Ohmoto (M.), Matsumoto (I), Dardalhon (V.), Cesses (P.), Garnier (L.), Pouzolles (M.), Brulin (B.), Bruschi (M.), Harcus (Y), Zimmermann (V.S.), Taylor (N.), Maizels (R.M.) & Jay (P.), 2016.- Intestinal epithelial tuft cells initiate type 2 mucosal immunity to helminth parasites. *Nature*, 529: 226-230.

- Gessner (A.), Blum (H.) & Röllinghoff (M.), 1993.- Differential regulation of IL-9-expression after infection with *Leishmania major* in susceptible and resistant mice. *Immunobiology*, 189:419–35.
- Ghedin (E.), Wang (S.), Spiro (D.), Caler (E.), Zhao (Q.), Crabtree (J.), Allen (J. E.), Delcher (A.L.), Guiliano (D. B.) & Miranda-Saavedra (D.), 2007.- Draft Genome of the filarial nematode parasite *Brugia malayi*. *Science*, 317: 1756-1760.
- Glenny (A. T.), Pope (C. G.), Waddington (H.) & Wallace (U.), 1926.-Immunological Notes: XVII–XXIV. *Journal of Pathology Bacteriology*, 23: 31-40.
- Gomez-Samblas (M.), Bernal (D.), Bolado-Ortiz (A.), Vilchez (S.), Bolás- Fernández (F.), Espino (A.M.), Trelis (M.) & Osuna (A.), 2018.- Intraperitoneal administration of the anti-IL-23 prevents the establishment of intestinal nematodes in mice. *Scientific reports*, 8(1): 7787- 7795.
- Gomez-Samblas (M.), Garcia-Rodriguez (J.J), Trelis (M.), Bernal (D.), López-Jaramillo (F.J.), Santoyo-Gonzalez (F.), Vilchez (S.), Espino (A.M.), Bolás- Fernández (F.), Osuna (A.), 2017.- Self-adjuvanting C18 lipid sulfone-PP2A vaccine: study of the induce imunomodulation against *Trichuris muris* infection. *Open Biology*, 7(4): 170031- 170073.
- González-Sánchez (E.), Corral (M.J.), Fawzi (M.E.), Rodríguez-Bertos (A.), Alunda (J.M.) & Cuquerella (M.), 2014.- LPS and inactivated Propionibacterium acnes elicit a partially protective response in primary infections of *Heligmosomoides polygyrus*. *Veterinary parasitology*, 203(1-2): 231-236.
- Goris (J.), Hermann (J.), Hendrix (P.), Ozon (R.), Merlevede (W.), 1989.- Okadaic acid, a specific protein phosphatase inhibitor, induces maturation and MPF formation in *Xenopus laevis* oocytes. *FEBS Letters*, 245: 91-94.
- Grainger (J.R.), Smith (K.A.), Hewitson (J.P.), McSorley (H.J.), Harcus (Y.), Filbey (K.J.), Finney (C.A.), Greenwood (E.J.), Knox (D.P.), Wilson (M.S.), Belkaid (Y.), Rudensky (A.Y) & Maizels (R.M.), 2010.- Helminth secretions induce de novo T cell Foxp3 expression and regulatory function through the TGF-beta pathway. *The Journal of Experimental Medicine*, 207: 2331–2341.
- Green (D. D.), Yang (S. I.) & Mumby (M. C.), 1987.- Molecular cloning and sequence analysis of the catalytic subunit of bovine type 2A protein phosphatase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84: 4880-4884.
- Greenberg (L.) & Fleming (D.S.), 1947.- Increased efficiency of diphtheria toxoid when combined with pertussis vaccine; a preliminary note. *Canadian Journal of Public Health*, 38(6): 279- 282.
- Grecis (R.K.), 2015.- Immunity to helminths: resistance, regulation, and susceptibility to gastrointestinal nematodes. *Annual review of Immunology*, 33: 201-25.
- Grisi (L.), Cerqueira (R.), de Souza (J.R.), Medeiros (A.T.), Andreotti (R.), Duarte (P.H.), Pérez (A.A.), Barros (J.) & Silva (H.), 2014.- Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 23(2): 150-156.
- Gronke (K.) & Diefenbach (A.), 2016.- Tuft cell-derived IL-25 activates and maintains ILC2. *Immuno Cellular Biology*, 94: 221-223.
- Grooves (M. R.), Hanlon (N.), Turowski (P.), Hemmings (B. A.) & Barford, (D.), 1999.- The structure of the protein Phosphatase 2A PR65/A subunit Reveals the conformation of its 15 tandemly repeated HEAT Motifs. *Cell*, 96: 99-110.

- Gupta (R.K.) & Siber (G.R.), 1995.- Adjuvants for human vaccines--current status, problems and future prospects. *Vaccine*, 14(14): 1263- 1276.
- Halim (T.Y.F.), Steer (C.A.), Gold (M.J.), Martinez-Gonzalez (I.), McNagny (K.M.), McKenzie (A.N.) & Takei (F.), 2014.- Group 2 innate lymphoid cells are critical for the initiation of adaptive T helper 2 cell-mediated allergic lung inflammation. *Immunity*, 40: 425-435.
- Harlow (E.) & Lane (D.), 1988.- Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, NY).
- Harrington (L.E.), Hatton (R.D.), Mangan (P.R.), Turner (H.), Murphy (T.L.), Murphy (K.M.) & Weaver (C.T.), 2005.- Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Natural Immunology*, 6(11): 1123-32.
- Harris (J.), Hartmann (M.), Roche (C.), Zeng (S.G.), O'Shea (A.), Sharp (F.A.), Lambe (E.M.), Creagh (E.M.), Golenbock (D.T.), Tschopp (J.), Kornfeld (H.), Fitzgerald (K.A.) & Lavelle (E.C.), 2011.- Autophagy controls IL-1beta secretion by targeting pro-IL-1beta for degradation. *The Journal of biological chemistry*, 286(11): 9587-9597.
- Hasnain (S.Z.), Evans (C.M.), Roy (M.), Gallagher (A.L.), Kindrachuk (K.N.), Barron (L.), Dickey (B.F.), Wilson (M.S.), Wynn (T.A.) & Grencis (R.K), 2011.- Muc5ac: a critical component mediating the rejection of enteric nematodes. *The Journal of Experimental Medicine*, 208: 893-900.
- Hasnain (S. Z.), Wang (H.), Ghia (J. E.), Haq (N.), Deng (Y.), Velcich (A.), Grencis (R. K.), Thornton (D. J.) & Khan (W. I.), 2010.- Mucin gene deficiency in mice impairs host resistance to an enteric parasitic infection. *Gastroenterology*, 138(5): 1763- 1771.
- Heath (T. D.), Edwards (D. C.) & Ryman (B. E.), 1976.- The Adjuvant Properties of Liposomes. *Biochemical Society Transactions*, 4: 129-133
- Heiseke (A.F.), Faul (A.C.), Lehr (H.A.), Förster (I.), Schmid (R.M.), Krug (A.B.) & Reindl (W.), 2012.- CCL17 promotes intestinal inflammation in mice and counteracts regulatory T cell-mediated protection from colitis. *Gastroenterology*, 142(2): 335-345.
- Hepworth (M.R.) & Grencis (R.K.), 2009.- Disruption of the Th2 immunity results in a gender-specific expansion of IL-23 producing accessory NK cells during helminth infection. *Journal of Immunology*, 183(6)- 3906- 3914.
- Hiyahara (K.), Ghoreschi (K.), Laurence (A.), Yang (X.P.), Kanno (Y.) & O'Shea (J.J.), 2010.- Signal transduction pathways and transcriptional regulation in Th17 cell differentiation. *Cytokine Growth Factor Review*. 21(6): 425-434.
- Hodge (L.M.), Marinaro (M.), Jones (H.P.), McGhee (J.R.), Kinoyo (H.) & Simecka (J.W.), 2001.- Immunoglobulin A (IgA) responses and IgE-associated Inflammation along the respiratory tract after mucosal but not systemic immunization. *Infection and immunity*, 69(4): 2328- 2338.
- Hogan (J.), 2006.- Why don't nurses monitor the respiratory rates of patients? *British Journal of Nursy*, 15(9): 489-92.
- Howitt (M.) Lavoie (S.), Michaud (M.), Blum (A.M.), Tran (S.V.), Weinstock (J.V.), Gallini (C.A.), Redding (K.), Margolskee (R.F.), Osborne (L.C.), Artis (D.) & Garrett (W.S.), 2016.- Tuft cells, taste-chemosensory cells, orchestrate parasite type 2 immunity in the gut. *Science*, 351: 1329-1333.

- Hu (M.), Abs El-Osta (Y.G.), Campbell (B.E.), Boag (P.R.), Nisbet (A. J.), Beveridge (I.) & Gasser (R. B.), 2007.- *Trichostrongylus vitrinus* (Nematoda: Strongylida): Molecular characterization and transcriptional analysis of Tv-stp-1, a serine/threonine phosphatase gene. *Experimental Parasitology*, 117: 22-34.
- Humphreys (N.E.), Xu (D.), Hepworth (M.R.), Liew (F.Y.) & Grecis (R.K.), 2008.- IL-33, a potent inducer of adaptive immunity to intestinal nematodes. *Journal of Immunology*, 180(4): 2443-2449.
- Hunter (T.), 1999.- The role of tyrosine phosphorylation in cell growth and disease. *Harvey lectures*, 94: 81-119.
- Isaksson (M.), Andersjo (B.), Ronnblom (L.), Kämper (O.), Lassmann (H.), Eloranta (M.J.) & Llobell (A.), 2009.- Plasmacytoid DC promote priming of autoimmune Th17. *European Journal of Immunology*, 39: 2925-2935.
- Jackson (J.A.), Friberg (I.M.), Little (S.) & Bradley (J.E.), 2008.- Review series on helminths, immune modulation and the hygiene hypothesis: Immunity against helminths and immunological phenomena in modern human populations: coevolutionary legacies? *Immunology*, 126: 18-27.
- Janssens (V.) & Goris (J.), 2001.- Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. *Biochemical Journal*, 353: 417-439.
- Jennings (R.), Simms (J.R.) & Heath (A.W.), 1995.- Adjuvants and delivery systems for viral vaccines- mechanisms and potential. *Developments in biological standardization*, 92: 19-28.
- Johnson (A. G.), Gaines (S.) & Landy (M.), 1956.- Studies on the O antigen of *Salmonella typhosa*. V. Enhancement of antibody response to protein antigens by the purified lipopolysaccharide. *The Journal of Experimental Medicine*, 103: 225-246.
- Jungersen (G.), Eriksen (L.), Roepstorff (A.), Lind (P.), Meeusen (E.N.T.), Rasmussen (T.) & Nansen (P.), 1999.- Experimental *Ascaris suum* infection in the pig: protective memory response after three immunizations and effect of intestinal adult worm population. *Parasite Immunology*, 21(12): 619-630.
- Kaplan (M. H.), Hufford (M. M.) & Olson (M. R.), 2015.- The development and in vivo function of T helper 9 cells. *Nature Reviews Immunology*, 15: 295-307.
- Kauffmann (C.), Machado (A.M.), Fleck (J.D.), Provensi (G.), Pires (V.S.), Guillaume (D.), Sonnet (P.), Reginatto (F.H.), Schenkel (E.P.) & Gosmann (G.), 2004.- Constituents from leaves of *Quillaja brasiliensis*. *Natural product research*, 18: 153-157.
- Khan (W. I.), Blennerhasset (P.), Ma (C.), Matthaei (K. I.) & Collins (S. M.), 2001.- Stat6 dependent goblet cell hyperplasia during intestinal nematode infection. *Parasite Immunology*, 23: 39-42.
- Khan (W.I.), Richard (M.), Akiho (H.), Blennerhasset (P.A.), Humphreys (N.E.), Grecis (R.K), Van Snick (J.) & Collins (S.M.), 2003.- Modulation of intestinal muscle contraction by interleukin-9 (IL-9) or IL-9 neutralization: correlation with worm expulsion in murine nematode infections. *Infection and Immunity*, 71(5): 2430- 2438.
- Kim (Y. J.), Liu (Y.), Li (S.), Rohrs (J.), Zhang (R.), Zhang (X.) & Wang (P.), 2015.- Co-eradication of breast cancer cells and cancer stem cells by cross-linked multilamellar liposomes enhances tumor treatment. *Molecular Pharmaceutics*, 12: 2811-2822.
- Klein (D.), 2002.- Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. *Trends in Molecular Medicine*, 8: 257-260.

- Klementowicz (J.E.), Travis (M.A.) & Grecis (R.K.), 2012.- *Trichuris muris*: a model of gastrointestinal parasite infection. *Seminars in immunopathology*, 34(6): 815-828.
- Knott (M.L.), Matthaei (K.I.), Giacomini (P.R.), Wang (H.), Foster (P.S.) & Dent (L.A.), 2007.- Impaired resistance in early secondary *Nippostrongylus brasiliensis* infections in mice with defective eosinophilopoiesis. *International Journal of Parasitology*, 37: 1367–1378.
- Kolanowski (S. T. H. M.), Lissenberg-Thunnissen (S. N.), Emal (D.), van Ham (S. M.) & ten Brinke (A.), 2016.- Monophosphoryl lipid A-induced pro-inflammatory cytokine expression does not require CD14 in primary human dendritic cells. *Inflammation Research*, 65: 449-458.
- Kolls (J. K.) & Lindén (A.), 2004.- Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity*, 21: 467-476.
- Kolodziejczyk (L.), Siemieniuk (E.) & Skrzydlewska (E.), 2005.- Antioxidant potential of rat liver in experimental infection with *Fasciola hepatica*. *Parasitology research*, 96(6): 367-372.
- Kopf (M.), 1993.- Disruption of the murine IL-4 gene blocks Th2 cytokine responses. *Nature*, 362: 45-248.
- Korenaga (M.) & Tada (I.), 1994.- The role of IL-5 in the immune responses to nematodes in rodents. *Parasitology Today*, 10: 234-236
- Korn (T.), Bettelli (E.), Oukka (M.) & Kuchroo (V.K.), 2009.- IL-17 and Th17 Cells. *Annual review of Immunology*, 27: 482-517.
- Krauss (H.), Weber (A.), Appel (M.), Enders (B.), von Graevenitz (A.), Isenberg (H.), Schiefer (H.G.), Slenczka (W.) & Zahner (H.), 2004.- Von Tier zu Mensch übertragbare Infektionskrankheiten. En: 3. vollstellen überarb und aktualiser (Deutscher Ärzte-Verlag, Berlin) pp: 1–605.
- Kripke (M.L.), Munn (C.G.), Jeevan (A.), Tang (J.M.), Bucana (C.), 1990.- Evidence that cutaneous antigen-presenting cells migrate to regional lymph nodes during contact sensitization. *Journal of Immunology*, 145(9): 2833-2838.
- Kristan (D.M.) & Hammond (K.A.), 2001.- Morphological plasticity varies with duration of infection: evidence from lactating and virgin wild-derived house mice (*Mus musculus*) infected with an intestinal parasite (*Heligmosomoides polygyrus*; Nematoda). *The Journal of Experimental Biology*, 207: 2351-2360.
- Kujic (L.M.), Klaver (E.J.), Kooji (G.), van der Pol (S.M.), Heijnen (P.), Brujins (S.C.), Kringel (H.), Brukins (S.C.), Kringel (H.), Pinelli (E.), Kraal (G.), de Vries (H.E.), Dijkstra (C.D.), Bouma (G.) & van Die (I.), 2012.- Soluble helminth products suppress clinical signs in murine experimental autoimmune encephalomyelitis and differentially modulate human dendritic cell activation. *Molecular immunology*, 51(2): 210-218.
- Kumar (R.), Adams (B.), Oldenburg (A.), Musiyenko (A.) & Barik (S.), 2002.- Characterisation and expression of a PP1 serine/threonine protein phosphatase (PfPP1) from the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*: demonstration of its essential role using RNA interference. *Malaria Journal*, 1: 5-32.
- Laemmli (U.K.), 1970.- Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680- 685.
- Lammers (T.) & Lavi (S.), 2007.- Role of type 2C protein phosphatases in growth regulation and in cellular stress signaling. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 42(6): 437-461.
- Lee (H.), Kwon (Y.), Lee (J.H.), Kim (J.), Shin (M.K.), Kim (S.H.) & Bae (H.), 2010.- Methyl gallate exhibits potent antitumor activities by inhibiting tumor infiltration of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells. *Journal Immunology*, 185(11): 6698-66705.

- Licona-Limón (P.), Henao-Mejia (J.), Temann (A.U.), Gagliani (N.), Licona-Limón (I.), Ishigame (H.), Hao (L.), Herbert (D.R.) & Flavell (R.A.), 2013.- Th9 cells drive host Immunity against gastrointestinal worm infection. *Immunity*, 39(4): 744-757.
- Lillywhite (J.E.), Cooper (E.S.), Needham (C.S.), Venugopal (S.), Bundy (D.A.) & Bianco (A.E.), 1995.- Identification and characterization of excreted/secreted products of *Trichuris trichiura*. *Parasitology Immunology*, 17(1): 47-54.
- Linden (S. K.), Sutton (P.), Karlsson (N. G.), Korolik (V.) & McGuckin (M. A.), 2008.- Mucins in the mucosal barrier to infection. *Mucosal Immunology*, 1: 183-197.
- Liu (P.), Wang (Z. Q.), Liu (R. D.), Jiang (P.), Long (S. R.), Liu (L. N.), Zhang (X. Z.), Cheng (X. C.), Yu (C.) & Ren (H. J.), 2015.- Oral vaccination of mice with *Trichinella spiralis* nudix hydrolase DNA vaccine delivered by attenuated *Salmonella* elicited protective immunity. *Experimental Parasitology*, 153: 29-38
- Livak (K.J.) & Schmittgen (T.D.), 2001.- Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25(4): 402-408.
- Lustigman (S.), Zhang (J.), Liu (J.), Oksov (Y.) & Hashmi (S.), 2004.- RNA interference targeting cathepsin L and Z-like cysteine proteases of *Onchocerca volvulus* confirmed their essential function during L3 molting. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 138: 165-170.
- Ma (G. X.), Zhou (R. Q.), Hu (S. J.), Huang (H. C.), Zhu (T.) & Xia (Q. Y.), 2014.- Molecular characterization and functional analysis of serine/threonine protein phosphatase of *Toxocara canis*. *Experimental Parasitology*, 141: 55-61.
- Maeda (H.) & Shiraishi (A.), 1996.- TGF-beta contributes to the shift toward Th2-type responses through direct and IL-10-mediated pathways in tumor-bearing mice. *Journal of Immunology*, 156(1):73-78.
- Magalhães (R.), Correa (D.) & Noronha (D.), 2003.- Evaluation of coinfection with pinworms (*Aspiculuris tetraptera*, *Dentostomella translucida* y *Shypachia obvelata*) in gerbils and mice. *Contemporary topics in laboratory animal science*, 42(4): 46-48.
- Marcilla (A.), Trelis (M.), Cortés (A.), Sotillo (J.), Cantalapiedra (F.), Minguez (M. T.), Valero (M. L.), Sánchez del Pino (M. M.), Muñoz-Antoli (C.) & Toledo (R.), 2012.- Extracellular vesicles from parasitic helminths contain specific excretory/secretory proteins and are internalized in intestinal host cells. *PLoS ONE*, 7: e45974.
- Márquez (D.), 2003.- Resistencia a los antihelmínticos: origen, desarrollo y control. *Revista Corpoica*, 4(1): 55-71.
- Martín (P.J.), 1985.- Nematode control schemes and anthelmintic resistance. En: Resistance in nematodes to anthelmintic drugs (Division Animal Health), pp: 29-40
- Martínez-Fernández (A. R.), Nogal-Ruiz (J. J.), López-Abán (J.), Ramajo (V.), Oleaga (A.), Manga-González (Y.), Hillyer (G. V.) & Muro (A.), 2004.- Vaccination of mice and sheep with Fh12 FABP from *Fasciola hepatica* using the new adjuvant/immunomodulator system ADAD. *Veterinary Parasitology*, 126: 287-298.
- Marty-Roix (R.), Vladimer (G. I.), Pouliot (K.), Weng (D.), Buglione-Corbett (R.), West (K.), MacMicking (J. D.), Chee (J. D.), Wang (S.) & Lu (S.), 2016.-Identification of QS-21 as an inflammasome-activating molecular component of saponin adjuvants. *Journal of Biological Chemistry*, 291: 1123-1136.

- Mathew (R.C.) & Boros (D.L.), 1986.- Anti-L3T4 antibody treatment suppresses hepatic granuloma formation and abrogates antigen-induced interleukin-2 production in *Schistosoma mansoni* infection. *Infection and Immunology*, 54(3): 820-826.
- Matthews (A.J.), Zheng (S.), DiMenna (L.J.) & Chaudhuri (J.), 2014.- Regulation of immunoglobulin class-switch recombination: choreography of noncoding transcription, targeted DNA deamination, and long-range DNA repair. *Advances in immunology*, 122: 1-57.
- Mawdsley (J.E.) & Rampton (D.S.), 2005.- Psychological stress in IBD: new insights into pathogenic and therapeutic implications. *Gut*, 54: 1481-1491.
- McCoy (K.D.), Stoel (M.), Stettler (R.), Merky (P.), Fink (K.), Senn (B.M.), Schaer (C.), Massacand (J.), Odermatt (B.), Oettgen (H.C.), Zinkernagel (R.M.), Bos (N.A.), Hengartner (H.), Macpherson (A.J.), Harris (N.L.), 2008.- Polyclonal and specific antibodies mediate protective immunity against enteric helminth infection. *Cell Host Microbe*, 4: 362–373.
- McSorley (H.J.), O’Gorman (M.T.), Blair (N.), Sutherland (T.E.), Filbey (K.J.) & Maizels (R.M.), 2012.- Suppression of type 2 immunity and allergic airway inflammation by secreted products of the helminth *Heligmosomoides polygyrus*. *European Journal of Immunology*, 42: 2667–2682.
- Mendoza (P.), Torres (G.), Ortega (E.), González (R.), Hernández (O.) & Becerril- Pérez (C.M.), 2005.- Estudio in vitro de la capacidad depredadora de *Duddingtonia flagrans* contra larvas de nematodos gastrointestinales de ovinos de pelo. *Técnica Pecuaria en México*, 43(3): 405-414.
- Mir (R.A.), Chishtih (M.A.), Zargar (A.), Tak (H.) & Ganie (S.A.), 2007.- Clinopathological changes in sheep experimentally infected with *Haemonchus contortus*. *World Journal of Agricultural Sciences*, 3(5): 562-566.
- Mohan (T.), Verma (P.) & Nageswara (R.), 2013.- Novel adjuvants & delivery vehicles for vaccines development: A road ahead. *The Indian Journal of Medical Research*, 138(5): 779-795.
- Molento (M.B.), Fortes (F.S.), Buzatti (A.), Kloster (F.S.), Sprenger (L.K.), Coimbra (E.) & Soares (L.D.), 2013.- Partial selective treatment of *Rhipicephalus microplus* and breed resistance variation in beef cows in Rio Grande do Sul, Brazil. *Veterinary Parasitology*, 192(1-3): 234-239.
- Morein (B.), Sundquist (B.), Höglund (S.), Dalsgaard (K.) & Osterhaus (A.), 1984.- Iscom, a novel structure for antigenic presentation of membrane proteins from enveloped viruses. *Nature*, 308: 457-460.
- Moser (M.) & Murphy (K.M.), 2000.- Dendritic cell regulation of Th1-Th2 development. *Nature Immunology*, 1(3): 199-205.
- Mosmann (T. R.), Cherwinski (H.), Bond (M. W.), Giedlin (M. A.) & Coffman (R. L.), 1986.- Two types of murine helper T cell clone. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *The Journal of Immunology*, 136: 2348- 2357.
- Müller (M.), Becher (J.), Schnabelrauch (M.) & Zenobi-Wong (M.), 2015.- Nanostructured Pluronic hydrogels as bioinks for 3D bioprinting. *Biofabrication*, 7(3): 035006.
- Muñoz-Antoli (C.), Monteagudo (C.), Fried (B.), Marcilla (A.) & Toledo (R.), 2007.- Development and pathology of *Echinostoma caproni* in experimentally infected mice. *Journal of Parasitology*. 93: 854-859.
- Murray (P.R.), Rosenthal (K.S.) & Pfaller (M.A.), 2009.-En Medical Microbiology (Elsevier, 6th edition).

- Narayanan (U.), Nalavadi (V.), Nakamoto (M.), Pallas (D.C.), Ceman (S.), Bassell (G. J.) & Warren (S.T.), 2007.- FMRP phosphorylation reveals an immediate-early signaling pathway triggered by group mGluR and mediated by PP2A. *The Journal of Neuroscience*, 27: 14349-14357.
- Nari-Henrioud (A.), 1987.- En: Enfoque epidemiológico sobre el diagnóstico y control de resistencia a antihelmínticos en ovinos.(Hemisferio Sur R.O.U.), pp: 1-60.
- Ness (T.L.), Ewing (J.L.), Hogaboam (C.M.) & Kunkel (S.L.), 2006.- CCR4 is a key modulator of innate immune responses. *Journal Immunology*, 177(11): 7531-7539.
- Neuser (V.), 1974.- Rhythmus der Eiproduktion bei *Aspiculuris tetraptera* (Schulz). *Zeitschrift für Parasitenkunde*, 43 (3): 169–180.
- Neutra (M.R.), Pringault (E.) & Kraehenbuhl (J.P.), 1996.- Antigen sampling across epithelial barriers and induction of mucosal immune responses. *Annual Review of Immunology*, 14: 275-300.
- Newton (S.E.) & Munn (E.A.), 1999.- The development of vaccines against gastrointestinal nematode parasites, particularly *Haemonchus contortus*. *Parasitology Today*, 15: 116-122.
- Nhu (Q.M.), Cuesta (N.) & Vogel (S.N.), 2006.- Transcriptional regulation of lipopolysaccharide (LPS)-induced Toll-like receptor (TLR) expression in murine macrophages: role of interferon regulatory factors 1 (IRF-1) and 2 (IRF-2). *Journal of Endotoxin Researching*, 12: 285-295.
- Ninan (N.), Muthiah (M.), Park (I.K.), Elain (A.), Thomas (S.) & Grohens (Y.), 2013.- Pectin/carboxymethyl cellulose/microfibrillated cellulose composite scaffolds for tissue engineering. *Carbohydrate Polymers*, 98: 877-885.
- Nisbet (A.J.), McNeilly (T.N.), Wildblood (L.A.), Morrison (A.A.), Bartley (D.J.), Bartley (Y.), Longhi (C.), McKendrick (I.J.), Palarea-Albaladejo (J.) & Nisbet (J.B.), 2013.- Successful immunization against a parasitic nematode by vaccination with recombinant proteins. *Vaccine*, 31: 4017-4023.
- Nitzsch, 1821.- First record of *Aspiculuris tetraptera*. *Annales de parasitologie humaine et comparée*, 59(5): 477-482.
- O'Connor (L.J.), Kahn (L.P.) & Walkden-Brown (S.W.), 2007.- The effects of amount, timing and distribution of simulated rainfall on the development of *Haemonchus contortus* to the infective larval stage. *Veterinary Parasitology*, 146: 90-101.
- O'Connor (L.J.), Walkden-Brown (S.W.) & Kahn (L.P.), 2006.- Ecology of the free-living stages of major trichostrongylid parasites of sheep. *Veterinary Parasitology*, 142: 1-15
- Oeser (K.), Schwartz (C.) & Voehringer (D.), 2015.- Conditional IL-4/IL-13-deficient mice reveal a critical role of innate immune cells for protective immunity against gastrointestinal helminths. *Mucosal Immunology*, 8: 672–682.
- Oliphant (C.J.), Hwang (Y.Y.), Walker (J.A.), Salimi (M.), Wong (S.H.), Brewer (J.M.), Englezakis (A.), Barlow (J.L.), Hams (E.), Scanlon (S.T.), Ogg (G.S.), Fallon (P.G.) & McKenzie (A.N.), 2014.- MHCII-mediated dialog between group 2 innate lymphoid cells and CD4(+) T cells potentiates type 2 immunity and promotes parasitic helminth expulsion. *Immunity*, 41(2): 283-295.
- Oliveira (V.C.), Carrara (R.C.), Simoes (D.L.), Saggiaro (F.P.), Carlotti (C.G.), Covas (D.T.) & Neder (L.), 2010.- Sudan Black B treatment reduces autofluorescence and improves resolution of in situ hybridization specific fluorescent signals of brain sections. *Histology Histopathology*, 25(8): 1017-1024.

- OMS, 2011.- Helminth control in school-age children. A guide for managers of control programmes (2nd edition).
- OMS, 2018.- Helmintiasis transmitidas por el suelo.
- Onah (D.N.) & Nawa (Y.), 2000.- Mucosal immunity against parasitic gastrointestinal nematodes. *The Korean Journal of Parasitology*, 38(4): 209-236.
- Orgad (S.), Brewis (N. D.), Alphey (L.), Axton (J. M.), Dudai (Y.) & Cohen (P. T. W.), 1990.- The structure of protein phosphatase 2A is as highly conserved as that of protein phosphatase I. *FEBS Letters*, 275: 44-48.
- Ottensen (E.A.), 1984.- Immunological aspects of lymphatic filariasis and onchocerciasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 73: 9-18.
- Owyang (A.M.), Zaph (C.), Wilson (E.H.), Guild (K.J.), McClanahan (T.), Miller (H.R.), Cua (D.J.), Goldschmidt (M.), Hunter (C.A.), Kastelein (R.A.) & Artis (D.), 2006.- Interleukin 25 regulates type 2 cytokine-dependent immunity and limits chronic inflammation in the gastrointestinal tract. *Journal of Experimental Medicine*, 203: 843-849.
- Papadakis (K. A.), 2004.- Chemokines in inflammatory bowel disease. *Current Allergy Asthma Reports*, 4: 83-89.
- Papadakis (K.A.), Prehn (J.L.), Landers (C.), Han (Q.), Luo (X.), Cha (S.C.), Wei (P.) & Targan (S.R.), 2004.- TL1A synergizes with IL-12 and IL-18 to enhance IFN-gamma production in human T cells and NK cells. *Journal of Immunology*, 172(11): 7002-7007.
- Pei (C.), Zhao (C.), Wang (A.J.), Fan (A.X.), Grinchuk (V.), Smith (A.), Sun (R.), Xie (Y.), Lu (N.), Urban (J.F.), Shea-Donohue (T.), Zhao (A.) & Yang (Z.), 2016.- Critical role for interleukin-25 in host protective Th2 memory response against *Heligmosomoides polygyrus bakeri*. *Infection and Immunity*, 84(12): 3328-3337.
- Pérez (J.), García (P.M.), Hernández (S.), Martínez-Moreno (A.), Martín de las Mulas (J.) & Camara (S.), 2001.- Pathological and immunohistochemical study of the abomasum and abomasal lymph nodes in goats experimentally infected with *Haemonchus contortus*. *Veterinary research*, 32(5): 463-473.
- Petrovsky (N.) & Aguilar (J.C.), 2004.- Vaccine adjuvants: Current state and future trends. *Immunology Cellular Biology*, 82: 488-496.
- Phillips (S.M.) & Colley (D.G.), 1978.- Immunologic aspects of host responses to schistosomiasis: resistance, immunopathology, and eosinophil involvement. *Progress in Allergy*, 24: 49-182.
- Philpot (F.), 1924.- Notes on the eggs and early development of some species of Oxyuridae. *Journal of Helminthology*, 2: 239-252.
- Pitchford (S.), Pan (D.) & Welch (H.C.E.), 2017.- Platelets in neutrophil recruitment to sites of inflammation. *Current opinion in hematology*, 24(1): 23-31.
- Plaisier (A.P.), van Oortmarssen (G.J.), Remme (J.) & Habbema (J.D.), 1991.- The reproductive lifespan of *Onchocerca volvulus* in West African savanna. *Acta Tropica*, 48(4): 271-284.
- Pond (L.), Wassom (D. L.) & Hayes (C. E.), 1989.- Evidence for differential induction of helper T cell subsets during *Trichinella spiralis* infection. *The Journal of Immunology*, 143: 4232-4237.
- Potten (C.S.), Booth (C.); Pritchard (D.M.), 1997.- The intestinal epithelial stem cell: the mucosal governor. *International journal of experimental pathology*, 78(4): 219-243.

- Price (A.E.), Liang (H.E.), Sullivan (B.M.), Reinhardt (R.L.), Eislely (C.J.), Erle (D.J.) & Locksley (R.M.), 2010.- Systemically dispersed innate IL-13-expressing cells in type 2 immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(25): 11489- 11494.
- Pritchard (D.I.), Williams (D.J.L.), Behnke (J.M.) & Lee (T.D.G.), 1983.- The role of IgG1 hypergammaglobulinaemia in immunity to the gastrointestinal nematode *Nematospiroides dubius*. The immunochemical purification, antigen-specificity and in vivo antiparasite effect of IgG1 from immune serum. *Immunology*, 49: 353–365.
- Prowse (S.J.), Ey (P.L.) & Jenkin (C.R.), 1978.- Immunity to *Nematospiroides dubius*: cell and immunoglobulin changes associated with the onset of immunity in mice. *The Australian Journal of Experimental Biology and medical science*, 56:237– 246.
- Qadir (S.), Dixit (A.K.), Dixit (P.) & Sharma (R.L.), 2010.- Intestinal helminths induce haematological changes in dogs from Jabalpur, India. *Journal of Heminthology*, 85(4): 401-403.
- Quentin (J.C.), 1975.- Essai de classification des Oxyures Heteroxynematidae memoires du museum Natioanl d’Histoie Natuelle. *Zoologie*, 94: 51-96.
- Quintaja (F.J.), 7(A.S.), Iglesias (A.H.), Korn (T.), Farez (M.F.), Bettelli (E.), Caccamo (M.), Oukka (M.) & Weiner (H.L.), 2008.- Control of Treg and TH17 cell differentiation by the aryl hydrocarbon receptor. *Nature*, 453: 65-71.
- Ramon (G.), 1924.- Sur la toxine et sur l’anatoxine diphtheriques. *Annual Institue Pasteur*. 38: 1-18.
- Reiss (Y.), Proudfoot (A.E.), Power (C.A.), Campbell (J.J.), Butcher (E.C.), 2001.- CC chemokine receptor (CCR)4 and the CCR10 ligand cutaneous T cell-attracting chemokine (CTACK) in lymphocyte trafficking to inflamed skin. *The Journal of experimental medicine*, 194(10): 1541-1547.
- Relyveld (E.H.), 1986.- Preparation and use of calcium phosphate adsorbed vaccines. *Developments in biological standardization*, 65: 131-136.
- Reynolds (A.), Lindström (J.), Johnson (P.C.D.) & Mable (B.K.), 2016.- Evolution of drug-tolerant nematode populations in response to density reduction. *Evolutionary Applications*, 9: 726-738.
- Rhoads (M.L.), 1983.- *Trichinella spiralis*: identification and purification of superoxide dismutase. *Experimental Parasitology*, 56: 41-54.
- Richard (M.), Grecis (R.K.), Humphreys (N.E.), Renauld (J.C.) & Van Snich (J.), 2000.- Anti-IL-9 vaccination prevents worm expulsion and blood eosinophilia in *Trichuris muris*-infected mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(2): 767-772.
- Roberts (J.M.), Neumann (E.), Gcokel (C.W.) & Highton (R.B.), 1967.- Onchocherciasis in Kenya 9,11 and 18 years after elimination of the vector. *WHO*, 37: 195- 212.
- Ruediger (R.), Roeckel (D.), Fait (J.), Bergqvist (A.), Magnusson (G.) & Walter (G.), 1992.- Identification of binding sites on the regulatory A subunit of protein phosphatase 2A for the catalytic C subunit and for tumor antigens of simian virus 40 and polyomavirus. *Molecular and Cellular Biology*, 12: 4872-4882.
- Russ (B.), Rao (S.), Prier (J.) & Turner (S.T.), 2013.- T cell immunity as a tool for studying epigenetic regulation of cellular differentiation. *Genetics*, 4: 218-223.
- Saenz (S.A.), Siracusa (M.C.), Perrigoue (J.G.), Spencer (S.P.), Urban (J.F.), Tocker (J.E.), Budelsky (A.L.), Kleinschek (M.A.), Kastelein (R.A.), Kambayashi (T.), Bhandoola (A.) & Artis (D.) 2010.- IL-25 elicits a multipotent progenitor cell population that promotes Th2 cytokine responses. *Nature*, 464: 1362-1366.

- Sánchez- Moreno (M.), Entrala (E.), Janssen (D.) & Osuna (A.), 1994.- Copper-zinc superoxide dismutase for *Ascaris suum* (Nematoda): purification and characterization. *Bioscience Report*, 14(2): 83-90.
- Sanchez-Moreno (M.), Entrala (E.), Janssen (D.), Fernandez-Becerra (C.), Salas-Peregrin (J.M.) & Osuna (A.), 1996- Inhibitor of superoxide dismutase from *Ascaris suum* by benzimidazoles and synthesized and glycine derivatives. *Pharmacology*, 52(1): 61-68.
- Sangster (N.), 1999.- Anthelmintic resistance: past, present and future. *International Journal Parasitology*, 29: 115-124.
- Santoro (M.F.), Annand (R.R.), Robertson (M.M.), Peng (Y.W.), Brady (M.J.), Mankovich (J.A.), Hackett (M.C.), Ghavurl (T.), Walter (G), Wong (W.W.) & Giegel (D.A.), 1998.- Regulation of protein phosphatase 2A activity by caspase-3 during apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 273: 13119-13128.
- Sawant (D.V.), Gravano (D.M.), Vogel (P.), Giacomini (P), Artis (D.) & Vignali (D.A.A.), 2014.- Regulatory T cells limit induction of protective immunity and promote immune pathology following intestinal helminth infection. *Journal of Immunology*, 192(6): 2094-2912.
- Scales (H.E.), Ierna (M.X.) & Lawrence (C.E.), 2007.- The role of IL-4, IL-13 and IL-4Ra in the development of protective and pathological responses to *Trichinella spiralis*. *Parasite Immunology*, 29: 81-91.
- Schallig (H.D.F.H.), van Leeuwen (M.A.W.) & Hendriks (W.M.L.), 1994.- Immune responses of Texel sheep to excretory/secretory products of adult *Haemonchus contortus*. *Parasitology*, 108: 351-357.
- Schild (H.), Deres (K.), Wiesmüller (K.H.), Jung (G.) & Rammensee (H.G.), 1991.- Efficiency of peptides and lipopeptides for in vivo priming of virus-specific cytotoxic T cells. *European Journal of Immunology*, 21: 2649-2654.
- Schirmbeck (R.), Melber (K.), Mertens (T.) & Reimann (J.), 1994.- Antibody and cytotoxic T-cell responses to soluble hepatitis B virus (HBV) S antigen in mice: implication for the pathogenesis of HBV-induced hepatitis. *Journal of Virology*, 68: 1418-1425.
- Schmidt (J. M.), McCracken (V. J.), Dimmitt (R. A.) & Lorenz (R. G.), 2007.- Expression of CXCL15 (Lungkine) in murine gastrointestinal, urogenital and endocrine organs. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 55: 515-524.
- Schmitt (E.), Brandwijk (R.V.), Snick (J.V.), Siebold (B.) & Rude (E.), 1989.- Tcγfiii/p40 is produced by naive murine CD4⁺ T cells but is not a general T cell growth factor. *European Journal of Immunology*, 19: 2167-2170.
- Schultz (R.E.), 1927.- On the genus *Aspicularis* and two new species on it- *A. dinniki* and *A. asiatica*, from rodents. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 21(2): 267-275.
- Semmling (V.); Lukacs-Kornk (V.), Thaiss (C.A.), Quast (T.), Hochheiser (K.), Panzer (U.), Rossjohn (J.), Perlmutter (P.), Cao (J.), Godfrey (D.I.), Savage (P.B.), Knolle (P.A.), Kolanus (W.), Förster (I.) & Kurts (C.), 2010.- Alternative cross-priming through CCL17-CCR4-mediated attraction of CTLs toward NKT cell-licensed DCs. *Nature immunology*, 11(4): 313-320.
- Seshacharyulu (P.), Pandey (P.), Datta (K.) & Batra (S. K.), 2013.- Phosphatase: PP2A structural importance, regulation and its aberrant expression in cancer. *Cancer Letters*, 335: 9-18.
- Shears (R.K.), Bancroft (A.J.), Sharpe (C.), Grencis (R.K.) & Thornton (D.J.), 2018.- Vaccination against whipworm: identification of potential immunogenic proteins in *Trichuris muris* excretory/secretory material. *Scientific Reports*, 8: 4508- 4518.

- Shek (P.N.), Yung (B.Y.) & Stanacev (N.Z.), 1983.- Comparison between multilamellar and unilamellar liposomes in enhancing antibody formation. *Immunology*, 49: 37-44.
- Shuford (K.V.), Turner (H.C.) & Anderson (R.M.), 2016.- Compliance with anthelmintic treatment in the neglected tropical diseases control programmes: a systematic review. *Parasites & vectors*, 27(9): 29- 34.
- Silverstein (A.M.), Barrow (C.A.), Davis (A.J.) & Mumby (M.C.), 2002.- Actions of PP2A on the MAP kinase pathway and apoptosis are mediated by distinct regulatory subunits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99: 4221-4226.
- Smith (G.D.), Wolf (D.P.), Trautman (K.C.), da Cruz e Silva (E.F.), Greengard (P.) & Vijayaraghavan (S.), 1996.- Primate sperm contain protein phosphatase 1, a biochemical mediator of motility. *Biology of Reproduction*, 54: 719-727.
- Smith (L.A.), 1998.- Development of recombinant vaccines for botulinum neurotoxin. *Toxicon*, 36(11): 1539- 1548.
- Smith (V.P.), Selkirk (M.E.) & Gounaris (K.), 2000.- A reversible protein phosphorylation system is present at the surface of infective larvae of the parasitic nematode *Trichinella spiralis*. *FEBS Letters*, 483: 104-108.
- Solano-Parada (J.), Gonzalez-Gonzalez (G.), de Pablos Torró (L.M.), Brazil dos Santos (M.F.), Espino (A.M.), Burgos (M.) & Osuna (A.), 2010.- Effectiveness of intranasal vaccination against *Angiostrongylus costaricensis* using a serine/threonine phosphatase 2 A synthetic peptide and recombinant antigens. *Vaccine*, 28: 5185-5196.
- Sorobetea (D.), Holm (J.B.), Henningsson (H.), Kristiansen (K.) & Svensson-Frej (M.), 2017.- Acute infection with the intestinal parasite *Trichuris muris* has long-term consequences on mucosal mast cell homeostasis and epithelial integrity. *European Journal of Immunology*, 47: 257-268.
- Sotillo (J.), Muñoz-Antoli (C.), Marcilla (A.), Fried (B.), Esteban (J.G.) & Toledo (R.), 2007.- *Echinostoma caproni*: Kinetics of IgM, IgA and IgG subclasses in the serum and intestine of experimentally infected rats and mice. *Experimental Parasitology*, 116(4): 390-398.
- Sotillo (J.), Valero (M.), Sánchez del Pino (M.), Fried (B.) Estéban (J.G.), Marcilla (A.) & Toledo (R.), 2008.- Identification of antigenic proteins from *Echinostoma caproni* (Trematoda) recognized by mouse immunoglobulins M, A and G using an immunoproteomic approach. *Parasitology Immunology*, 30: 271-279.
- Sotillo (J.), Trelis (M.), Cortes (A.), Fried (B.), Marcilla (A.), Esteban (J.G.) & Toledo (R.), 2011.- Th17 responses in *Echinostoma caproni* infections in hosts of high and low compatibility. *Experimental parasitology*, 129(3): 307-311.
- Stark (M.J.R.), 1996.- Yeast protein serine/threonine phosphatases: Multiple Roles and Diverse Regulation. *Yeast*, 12: 1647-1675.
- Staudt (V.), Bothur (E.), Klein (M.), Lingnau (K.), Reuter (S.) & Grebe (N.), 2010.- Interferon-regulatory factor 4 is essential for the developmental program of T helper 9 cells. *Immunity*, 33:192–202.
- Steenhard (N.R.), Jungersen (G.); Kokotovic (B.), Urban (J.F.), Roepstorff (A.) & Thamsborg (S.M.), 2009.- Immunomodulatory effect of *Ascaris suum* on *Mycoplasma hyopneumonia* vaccination and challenge infection in pigs. *Vaccine*, 27(37): 5161- 5169.
- Strube (C.), Haake (C.), Sager (H.), Schorderet Weber (S.), Kaminsky (R.), Buschbaum (S.), Joekel (D.), Schicht (S.), Kremmer (E.) & Korrell (J.), 2015. -Vaccination with recombinant paramyosin against the

bovine lungworm *Dictyocaulus viviparus* considerably reduces worm burden and larvae shedding. *Parasites & Vectors*, 8: 1-12.

- Stuart-Harris (C.H.), 1969.- Adjuvant influenza vaccines World Health Organ. *Bull World Health Organ*, 41(3): 617-621.
- Suárez (V.H.), 2007.- Producción ovina e importancia de los nematodos gastrointestinales en la Argentina. En: Enfermedades parasitarias de los ovinos y otros rumiantes menores en el cono sur de América (EEA INTA Anguil “Ing. Agr. G. Covas”) pp: 9-14.
- Sutton (C.E.), Lalor (S.J.), Sweeney (C.M.), Brereton (C.F.), Lavelle (E.C.) & Mills (K.H.), 2009.- Interleukin-1 and IL-23 induce innate IL-17 production from gammadelta T cells, amplifying Th17 responses and autoimmunity. *Immunity*, 31(2): 331-341.
- Taffs (L.F.), 1976.- Pinworm infections in laboratory rodents: a review. *Laboratory Animal of Science*, 10 (1): 1–13.
- Thienpont (D.), Rochette (F.) & Vanparijs (O.F.J.), 1990.- Diagnosen von Helminthosen durch koproskopische Untersuchung (2te Aufl. Belgien: Jansen research foundation Beerse).
- Timothy (L.M.), Coulson (P.S.), Behnke (J.M.) & Wilson (R.A.), 1992.- Cross-reactivity between *Necator americanus* and *Schistosoma mansoni* in mice. *International Journal of Parasitology*, 22: 1143–1149
- Toledo (R.), Espert (A.), Muñoz-Antoli (C.), Fried (B.) & Esteban (J.G.), 2004.- The comparative development of *Echinostoma caproni* (Trematoda: Echinostomatidae) adults in experimentally infected hamsters and rats. *Parasitology Research*, 93: 439-444.
- Toledo (R.), Esteban (J.G.) & Fried (B.), 2006.- Immunology and pathology of intestinal trematodes in their definitive hosts. *Advances in Parasitology*, 63: 289-370.
- Turowski (P.), Favre (B.), Campbell (K.S.), Lamb (N.J.) & Hemmings (B.A.), 1997.- Modulation of the enzymatic properties of protein phosphatase 2A catalytic subunit by the recombinant 65-kDa regulatory subunit PR65alpha. *European journal of biochemistry*, 248(1): 200-208.
- Trelis (M.), Sotillo (J.), Monteagudo (C.), Fried (B.), Marcilla (A.), Esteban (J.G.) & Toledo (R.), 2011.- *Echinostoma caproni* (Trematoda): differential in vivo cytokine responses in high and low compatible hosts. *Experimental Parasitology*, 127: 387-397.
- Trelis (M.), Cortés (A.), Fried (B.), Marcilla (A.), Esteban (J.G.) & Toledo (R.), 2013.- Protective immunity against *Echinostoma caproni* in rats is induced by *Syphacia muris* infection. *International Journal for parasitology*, 43(6): 453-463.
- Trelis (M.), Galiano (A.), Bolado (A.), Toledo (R.), Marcilla (A.) & Bernal (D.), 2016.- Subcutaneous injection of exosomes reduces symptom severity and mortality induced by *Echinostoma caproni* infection in BALB/c mice. *International Journal of Parasitology*, 46(12): 799-808.
- Tsuji (N.), Suzuki (K.), Kasuga-Aoki (H.), Isoe (T.), Arakawa (T.) & Matsumoto, (Y.), 2003.- Mice intranasally immunized with a recombinant 16-kilodalton antigen from roundworm *Ascaris suum* are protected against larval migration of *Ascaris suum*. *Infection and Immunity*, 71: 5314-5323.
- Turner (H.C.), Truscott (J.E.), Bettis (A.A.), Hollingsworth (T.D.), Brooker (S.J.) & Anderson (R.M.), 2016.- Analysis of the population-level impact of co-administering ivermectin with albendazole or mebendazole for the control and elimination of *Trichuris trichiura*. *Parasite Epidemiology Control*, 1(2):177-187.

- Turner (J.E.), Stockinger (B.) & Helmbly (H.), 2013.- IL-22 mediates goblet cell hyperplasia and worm expulsion in intestinal helminth infection. *PLOS pathogens*, 9(10): e1003698
- Vallance (B.A.), Galeazzi (F.), Collins (S.M.) & Snider (D.P.), 1999.- CD4⁺T cells and major histocompatibility complex class II expression influence worm expulsion and increased intestinal muscle contraction during *Trichinella spiralis* infection. *Infection & Immunology*, 67(11): 6090-6097.
- van Riet (E.), Hartgers (F.C.) & Yazdanbakhsh (M.), 2007.- Chronic helminth infections induce immunomodulation: Consequences and mechanisms. *Immunobiology*, 212: 475-490.
- Varshney (P.), Yadav (V.) & Saini (N.), 2016.- Lipid rafts in immune signaling: Current progress and future perspective. *Immunology*, 149: 13-24.
- Vázquez- López (S.), Cenual- Álvarez (G.) & Merino- Fernández (F.J.), 2013. Epidemiología de las helmintiasis en una zona del sur de Madrid. *Revista Clínica española*, 213(2): 122-124.
- Veldhoen (M.), Uyttenhove (C.), van Snick (J.), Helmbly (H.), Westendorf (A.) & Buer (J.), 2008.- Transforming growth factor-beta “reprograms” the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. *Nature Immunology* 9:1341–1346
- Ventëla (S.), Mäkelä (J.A.), Kulmala (J.), Westermarck (J.), Toppari (J.), 2012.- Identification and regulation of a stage-specific stem cell niche enriched by Nanog-positive spermatogonial stem cells in the mouse testis. *Stem Cells*, 30(5): 1008-1020.
- Vervelde (L.), Kooyman (F. N. J.), Van Leeuwen (M. A. W.), Schallig (H. D. F. H.), Mackellar (A.), Huntley (J. F.) & Cornelissen (A. W. C. A.), 2001.- Age-related protective immunity after vaccination with *Haemonchus contortus* excretory/secretory proteins. *Parasite Immunology*, 23: 419-426.
- Von Moltke (J.), Ji (M.), Liang (H.E.) & Locksley (R.M.), 2016.- Tuft-cell-derived IL-25 regulates an intestinal ILC2-epithelial response circuit. *Nature*, 221-225.
- Wang (X.), Li (D.), Ghali (L.), Xia (R.), Munoz (L. P.), Garelick (H.), Bell (C.) & Wen (X.), 2016.- Therapeutic potential of delivering arsenic trioxide into HPV-infected cervical cancer cells using liposomal nanotechnology. *Nanoscale Research Letters*, 11: 1-8.
- Williams (I. R.), 2006.- CCR6 and CCL20. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1072: 52-61.
- Wilson (M.S.), Feng (C.G.), Barber (D.L.) Yarovinsky (F.), Cheever (A.W.), Sher (A.), Grigg (M.), Collins (M.), Fouser (L.) & Wynn (T.A.), 2010.- Redundant and pathogenic roles for IL-22 in Mycobacterial, protozoan and helminth infections. *Journal of Immunology*, 184(8): 4378- 4390.
- Wüthrich (M.), Deepe (G.S.) & Klein (B.), 2012.- Adaptive immunity to fungi. *Annual Review of Immunology*, 30: 115-148.
- Yamazaki (S.), Inaba (K.), Tarbell (K.V.) & Steinman (R.M.), 2006.- Dendritic cells expand antigen-specific Foxp3⁺ CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells including suppressors of alloreactivity. *Immunological reviews*, 212: 314- 329.
- Yanming (S.), Ruofeng (Y.), Muleke (C.I.), Guangwei (Z.), Lixin (X.) & Xiangrui (L.), 2007.- Vaccination of goats with recombinant galectin antigen induces partial protection against *Haemonchus contortus* infection. *Parasite Immunology*, 29(6): 319- 326.
- Yokoyama (D.), Saito-Ito (A.), Asao (N.), Tanabe (K.), Yamamoto (M.) & Matsumura (T.), 1998.- Modulation of the growth of *Plasmodium falciparum* in Vitro by protein serine/threonine phosphatase inhibitors. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 247: 18-23.

- Yuan (Q.), Bromley (S.K.), Means (T.K.), Jones (K.J.), Hayashi (F.), Bhan (A.K.) & Luster (A.D.), 2007.- CCR4-dependent regulatory T cell function in inflammatory bowel disease. *The Journal of experimental medicine*, 204(6): 1327-1334.
- Zajac (A.M.), 2006.- Gastrointestinal nematodes of small ruminants: life cycle, anthelmintics, and diagnosis. *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice*, 22(3): 529- 541.
- Zhang (G.), Li (J.), Purkayastha (S.), Tang (Y.), Zhang (H.), Yin (Y.), Li (B.), Liu (G.) & Cai (D.), 2013.- Hypothalamic programming of systemic ageing involving IKK- β , NF- κ B and GnRH. *Nature*, 497 (7448): 211-216.
- Zhang (W.), Zheng (X.), Cheng (N.), Gai (W.), Xue (X.), Wang (Y.), Gao (Y.), Shan (J.), Yang (S.) & Xia (X.), 2016.- Isatis indigotica root polysaccharides as adjuvants for an inactivated rabies virus vaccine. *International Journal of Biological Macromolecules*, 87: 7-15.
- Zhao (A.), Urban (J.F.), Sun (R.), Stiltz (J.), Morimoto (M.), Notari (L.), Madden (K.B.), Yang (Z.), Grinchuk (V.), Ramalingam (T..R.), Wynn (T.A.) & Shea-Donohue (T.), 2010.- Critical role of IL-25 in nematode infection-induced alterations in intestinal function. *Journal of Immunology*, 185: 6921-6929.
- Zhao (A.), Urban (J.F.), Sun (R.), Stiltz (J.), Morimoto (M.), Notari (L.), Madden (K.B.), Yang (Z.), Grinchuk (V.), Ramalingam (T.R.); Wynn (T.A.) & Shea- Donohue (T.), 2010.- Critical role of IL-25 in nematode infection-induced alterations in intestinal function. *Journal of Immunology*, 185(11): 6921- 6929.
- Zhu (Y.H.), Han (Q.X.), Ren (W.), Niu (A.O.) & Li (Z.L.), 2006.- Studies on the protective effect of the mutant of Sj23 DNA vaccine against schistosomiasis. *Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi*, 24: 437-440.
- Zimmermann (M.), Arachchige-Don (A. S.), Donaldson (M. S.), Dallapiazza (R. F.), Cowan (C. E.) & Horne (M. C.), 2012.- Elevated cyclin G2 expression intersects with DNA damage checkpoint signaling and is required for a potent G2/M checkpoint arrest response to Doxorubicin. *Journal of Biological Chemistry*, 287: 22838-22853.