



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE MEDICINA

**“CONSTRUCCIÓN Y EVALUACIÓN DE UNA CEPA
VACUNAL DE *Salmonella enterica* serovar
Typhimurium QUE EXPRESA EN SU SUPERFICIE UN
ANTIGENO DE *T. spiralis*”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

ERICKA NELLY POMPA MERA

DIRECTOR DE TESIS: DR. CÉSAR RAÚL GONZÁLEZ BONILLA

MÉXICO, D.F.

NOVIEMBRE 2006



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

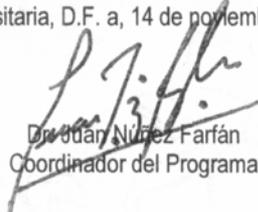
Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 28 de agosto del 2006, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Experimental) de la alumna **Pompa Mera Ericka Nelly** con número de cuenta **91273394** con la tesis titulada: "**Construcción y evaluación de una cepa vacunal de *Salmonella enterica serovar Typhimurium* que expresa en su superficie un antígeno de *T. spiralis*** " bajo la dirección del **Dr. César Raúl González Bonilla** .

Presidente:	Dra. Yolanda López Vidal
Vocal:	Dra. Lilián Yépez Mulia
Secretario:	Dr. César Raúl González Bonilla
Suplente:	Dr. Rafael S. Saavedra Durán
Suplente:	Dra. María Guadalupe Ortega Pierres

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F. a, 14 de noviembre del 2006


Dr. Juan Núñez Farfán
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

La autora agradece las becas de apoyo para la realización de este trabajo otorgadas por el Consejo Nacional para la Ciencia y Tecnología (182951) y por el Instituto Mexicano del Seguro Social.

El proyecto fue apoyado por el Instituto Mexicano del Seguro Social, clave de financiamiento 2005/1/I/038 y por el Consejo Nacional para la Ciencia y Tecnología, clave de proyecto G38532-M.

El Comité Tutorial que evaluó de manera periódica los avances del presente trabajo estuvo conformado por el Dr. César Raúl González Bonilla, la Dra. Maria Guadalupe Ortega Pierres y la Dra. Lilián Yépez Mulia.

El presente trabajo se realizó en la Unidad de Investigación Biomédica en Inmunología e Infectología del Hospital de Infectología del CMN "La Raza" del IMSS, en el Laboratorio 2 del Departamento de Genética y Biología Molecular del CINVESTAV y en el laboratorio de Parasitología de la Unidad de Investigación en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias del Hospital de Pediatría del CMN s. XXI del IMSS, bajo la dirección del Dr. César Raúl González Bonilla, con la colaboración de la Dra. Maria Guadalupe Ortega Pierres y la Dra. Lilián Yépez Mulia.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. César Raúl González Bonilla, por permitirme trabajar, aprender y crecer en su laboratorio. Me llevo su mejor enseñanza: permitir que el alumno aprenda en la medida que éste quiera, con libertad pero con la constante demanda de resultados que el proyecto requiere y sin perder de vista el objetivo principal. Lo aprecio y admiro su visión como jefe de un grupo de investigación, pues son para mí un gran ejemplo.

A la Dra. María Guadalupe Ortega Pierres por sus valiosas aportaciones al presente trabajo y por permitirme aprender y trabajar en su laboratorio. Gracias Doctora, no solo su enorme compromiso como investigadora en el área es ejemplar, sino también su sentido crítico y su preocupación por las cosas que acontecen en nuestro país.

A la Dra. Lilián Yépez Mulia por todas las enseñanzas, aportaciones y observaciones a mi trabajo. Gracias Doctora por creer en mí, por apoyarme y permitirme trabajar en armonía en su laboratorio. Sus contribuciones para la realización de mi proyecto me fueron indispensables. La aprecio y admiro mucho como persona y como excelente investigadora que es usted.

A la Dra. Yolanda López Vidal y Dr. Rafael Saavedra Durán por la revisión, las importantes observaciones y sugerencias a la presente tesis.

A todo el personal de la Unidad de la Investigación Biomédica en Inmunología e Infectología del CMN "La Raza", muy especialmente a la M. en C. Alicia Ocaña, al Dr. Rosendo Luria, al M. en C. Javier Hernández, a la QBP Margarita y a Saúl por toda la ayuda brindada en la realización del presente trabajo. También agradezco de manera muy particular a Virginia Córdova, a Rafael Fuentes a la Sra. Elena y al Sr. Fernando por la preparación de material y reactivos. Sin ustedes este trabajo no hubiese sido posible.

A todo el personal del laboratorio de Parasitología de la UIEiP del Hospital de Pediatría del CMN s. XXI. De manera muy afectuosa agradezco la valiosa ayuda de la QFB. Leticia Damasio, de la Dra. Nancy Arizmendi, del MVZ Gabriel Uribe y de los que alguna vez fueron alumnos de esta unidad, Claudia y Alejandro que me ayudaron y enseñaron mucho acerca del manejo de los animales y el modelo de infección. La ayuda de todos ustedes fue crucial para la parte final de este trabajo.

A Rocío Fonseca y a Blanca por su amabilidad, la enseñanza y la ayuda proporcionada en la obtención de los sueros contra las proteínas de fusión.

Al Dr. Yonathan Garfias por la amable donación de reactivos para la realización de ELISAs y la valiosa ayuda proporcionada en la interpretación de las citometrías.

A la M. en C. Mónica Salas. Gracias por auxiliarme con la parte de la estadística y las ELISAs (y por ser una gran amiga).

Y a mis compañeros de la maestría: Wendy, Jorge, Alondra, Pedro, América Mandujano, Octavio, Julio, Paco, Melby, con quienes compartí muchas alegrías en esta maravillosa parte de mi vida académica.

Dedicatoria

A mi esposo y a mi hijo, porque son lo más importante en mi vida.

A mi madre, en honor a tu trayectoria académica y ejemplo de fortaleza.

A mis hermanos Oscar y Valerie.

A mis amistades: Alicia Ocaña, Wendy, Gaby, Paty, por apoyarme en un momento muy difícil de mi vida.

Lo primero que debería ser siempre es desarrollar la capacidad general para el pensamiento y el juicio independiente, y no la adquisición de conocimientos especializados.

No basta con enseñar a un hombre una especialidad, aunque esto puede convertirlo en una máquina útil, no tendrá una personalidad armoniosa y desarrollada.

Es esencial que el estudiante adquiriera una comprensión de los valores y una profunda afinidad hacia ellos. De otro modo, con la especialización de sus conocimientos, más parecería un perro bien adiestrado que una persona de armonioso desarrollo,

Debe aprender las motivaciones de los seres humanos, sus ilusiones y sus sufrimientos para lograr una relación adecuada con su prójimo y con la comunidad.

Estas cosas preciosas se transmiten a las generaciones más jóvenes mediante el contacto personal con los que enseñan, no a través de los libros de texto (al menos al principio). La enseñanza debería ser de tal naturaleza que lo que se ofreciese se recibiera como un don valioso y no como un penoso deber

ALBERT EINSTEIN

DEDICADO A MI TUTOR Y A MI COMITÉ TUTORAL
POR HABERME ENSEÑADO ESTO Y MAS...
CON ADMIRACION.

INDICE

Resumen	10
Abstract	12
Abreviaturas	14
INTRODUCCIÓN	15
Triquinelosis	15
Ciclo de vida de <i>T. spiralis</i>	17
Antígenos de <i>Trichinella</i>	21
Antígenos de superficie	21
Antígenos de excreción/secreción	22
Antígenos somáticos	22
Antígenos TSL-1	23
Características de la glicoproteína de 43 kDa (p43)	24
Función de la p43	26
Respuesta inmune a <i>T. spiralis</i>	27
Tratamiento y profilaxis de la triquinelosis	29
Vacunas contra parásitos	29
Desarrollo de vacunas contra nemátodos intestinales	31
Importancia de la inmunidad a nivel de mucosas en el desarrollo de vacunas	32
Acarreadores bacterianos como vehículos de inmunización	36
<i>Salmonella</i> como acarreador de antígenos heterólogos	38
Localización del antígeno heterólogo en el acarreador	42
Sistema de secreción tipo V (autotransportador)	43
El autotransportador ShdA	48
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	53
OBJETIVOS	55
MATERIAL Y MÉTODOS	56
I. Ingeniería genética	56
Cepas bacterianas	56
Oligonucleótidos	56
Características de los plásmidos	57
Técnicas de DNA recombinante	60
Estrategia general para la construcción de cada uno de los plásmidos	60
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la obtención de <i>pENP-01</i>	61
Generación de la secuencia codificante del péptido p43 ⁽²¹⁰⁻²³⁹⁾	62
Secuenciación automatizada de los plásmidos <i>pENP-01</i> y <i>pAg30</i>	63
Electroporación de <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium SL3261	63
Curvas de crecimiento	64
II. Evaluación de la expresión de la proteína de fusión	64
Inducción en condiciones microaerófilas <i>in vitro</i> .	64
Extracción de proteínas totales	65
Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida en condiciones reductoras (SDS-PAGE)	65
Western-blot o Inmuno-electrotransferencia (IET)	66
Citometría de flujo	66
Inmunofluorescencia Indirecta (IIF) de <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium SL3261	67
Preservación del ciclo de vida del parásito	67
Obtención de la larva muscular (LM)	67
Evaluación de la inmunogenicidad de la proteína de fusión	68
Obtención del suero anti-proteínas de fusión	68

Reconocimiento del epítopo p43 ⁽²¹⁰⁻²³⁹⁾ en la superficie de la LM de <i>T. spiralis</i> , por los sueros anti-proteínas de fusión	69
Reconocimiento del epítopo p43 ⁽²¹⁰⁻²³⁹⁾ nativo a nivel de estructuras internas del parásito, por los sueros de ratones inmunizados con proteínas de fusión	69
III. Ensayos de protección	70
Inmunización con acarreador bacteriano y reto con el parásito	70
IV. Evaluación de la respuesta inmune	70
Determinación de anticuerpos contra <i>Salmonella spp</i> mediante ensayo inmunoenzimático (ELISA)	72
Determinación de anticuerpos contra antígenos de <i>T. spiralis</i> mediante ensayo inmunoenzimático (ELISA)	73
RESULTADOS	75
Construcción del plásmido <i>pnirBLTBNANPFLAG</i>	75
Construcción del plásmido <i>pnirBLTBNANPFLAG ShdA</i>	76
Construcción del plásmido <i>pENP-01</i>	77
Generación de la secuencia codificante ag30	78
Construcción del plásmido <i>pAg30</i>	80
Evaluación de la expresión de las proteínas de fusión en <i>E. coli</i> y <i>Salmonella</i> mediante diferentes ensayos: Western-blot	82
Evaluación de la expresión de las proteínas de fusión en <i>E. coli</i> y <i>Salmonella</i> mediante inmunofluorescencia indirecta (IIF) y citometría de flujo	84
Inmunogenicidad de la forma recombinante de p43 ⁽²¹⁰⁻²³⁹⁾	87
Reconocimiento del epítopo p43 ⁽²¹⁰⁻²³⁹⁾ en su forma nativa por los sueros anti-p43 ⁽²¹⁰⁻²³⁹⁾	88
Curvas de crecimiento	90
Cinética de la expresión de las proteínas de fusión	91
Ensayos de protección	92
Respuesta inmune contra el acarreador y contra el epítopo heterólogo	93
DISCUSIÓN DE RESULTADOS	99
CONCLUSIONES	108
PERSPECTIVAS	109
BIBLIOGRAFÍA	110

RESUMEN

La triquinelosis es una zoonosis de amplia distribución mundial cuyos agentes causales pertenecen al género *Trichinella spp.* El hombre se infecta al ingerir carne contaminada con larvas viables del parásito de un animal previamente infectado; entre las especies domésticas transmisoras del parásito al humano, se encuentra el cerdo. Aunque existe un tratamiento farmacológico a base de bencimidazoles, tanto en nuestro país como en otras partes del mundo, aún se siguen reportando brotes de esta enfermedad. Un aspecto de suma importancia es el hecho de que a nivel de campo veterinario existe una alarmante y creciente resistencia a muchos fármacos con actividad antiparasitaria, lo que obliga a desarrollar otras alternativas para el control de esta enfermedad (especialmente en el cerdo), entre las cuales, las vacunas juegan un papel central. En este contexto, se han empleado de manera exitosa cepas vacunales atenuadas de *Salmonella entérica*, como acarreadores de antígenos heterólogos de virus, bacterias y parásitos. El fundamento de estas vacunas es que la inmunización con acarreadores vivos "quiméricos" genera una respuesta inmune local (mucosas) y sistémica tanto en contra de *Salmonella*, como en contra del antígeno heterólogo. Para tales fines, ha sido necesario expresar estos antígenos en la superficie bacteriana mediante proteínas de membrana externa pertenecientes a la familia de los auto transportadores; considerando su sencillez y versatilidad para expresar y translocar péptidos hacia la superficie bacteriana. Por otra parte, existe evidencia acerca de la importancia de la respuesta humoral a nivel de mucosa intestinal en contra de los antígenos de superficie y de expresión/secreción de *T. spiralis*, particularmente contra aquellos que muestran motivos de tipo TSL-1 (como los TSL-1). La inmunidad generada a este nivel, puede afectar la sobrevivencia y número de parásitos adultos así como su capacidad para reproducirse. Este tipo de inmunidad intestinal, puede ser activada mediante infección natural ó por vacunación. En este contexto, se ha demostrado que la vacunación intranasal con un péptido de 30 aminoácidos derivado de la glicoproteína de 43 kDa (p43⁽²¹⁰⁻²³⁹⁾) con CTB, induce una respuesta protectora en ratones NIH y que fueron infectados con *T. spiralis*.

En el presente trabajo se analizó el uso de una cepa vacunal de *Salmonella entérica* serovar Typhimurium SL3261 que expresa el antígeno p43⁽²¹⁰⁻²³⁹⁾ de *T. spiralis* en la superficie bacteriana mediante el autotransportador ShdA, en la inducción de una respuesta inmune humoral local (mucosas) y sistémica. Los resultados demostraron que el autotransportador ShdA puede ser usado para translocar eficientemente antígenos heterólogos hacia la superficie bacteriana. Así mismo, se observó que los anticuerpos inducidos por la proteína de fusión que contiene una forma recombinante del antígeno, reconocieron a la proteína nativa presente en el parásito (en estadio L₁ ó LM). De manera interesante, la vacunación intranasal con el acarreador bacteriano generó una reducción de un 62% en la carga parasitaria de organismos adultos en ratones BALB/c al día 8 post-infección.

Estos hallazgos sugieren que *Salmonella entérica* serovar Typhimurium SL3261 puede ser empleado como vector vacunal con la finalidad de generar una respuesta inmune a nivel de mucosas que permitan reducir la carga parasitaria en ratones infectados con *T. spiralis*. Esto último ofrece ciertas ventajas sobre el empleo de la vacunación con antígeno solo ó con adyuvante.

ABSTRACT

Trichinellosis is a worldwide zoonosis caused by parasites of the genus *Trichinella* spp. Human are infected by consumption of meat containing live muscle larvae of the parasite. Pigs are the main source of transmission to human. Although there is a treatment based on use of benzimidazole drugs, in our country and some parts of the world outbreaks of this disease still occur. An important aspect in the veterinary field is the fact that parasites become resistant to the antihelminthic drugs. This has prompted the design of novel alternatives for the control of trichinellosis particularly in pigs. Among these alternative control measures vaccines play a central role. In this context, *Salmonella* attenuated live vaccines have been successfully used as carrier of heterologous antigens from virus, bacteria and parasites. This approach is based on the fact that the immunization with live "chimeric" carriers results in the induction of local (mucosal) and systemic immune responses to both *Salmonella* and the heterologous antigen. Moreover attenuated *Salmonella* strains are particularly attractive as potential live vector because they can be administered at the mucosal level and stimulate a local humoral response. An optimal way to induce immunity is to express heterologous antigens on the bacterial surface. This can be achieved by using outer membrane proteins of the auto transporter family, based on their simplicity and versatility. Several studies have showed the importance of the induction of humoral response at the intestinal level to surface and secretory/excretory antigens from *T. spiralis*, particularly against those which bear tivelose (TSL-1 antigens). The immunity induced at this level affects the survival and number of adult parasites and their reproduction ability. The intestinal immune response can be elicited by infection or vaccination. In this context, it has been shown that the intranasal vaccination with a 30-mer peptide from glycoprotein-43 kDa (p43²¹⁰⁻²³⁹) with CTB induces a protective response in mouse NIH after infection with *T. spiralis*.

In the present work *Salmonella enterica* serovar Typhimurium SL3261 expressing the antigen (p43²¹⁰⁻²³⁹) on the bacterial surface through the ShdA

auto transporter was used as a live vector to induce local (mucosal) and systemic humoral immune responses against *Trichinella spiralis*.

The results obtained in this work showed that the ShdA auto transporter can be used to translocate efficiently the heterologous *T. spiralis* peptide to the bacterial surface. Antibodies elicited in the mice by immunization with the fusion protein recognized the native protein on the surface of the muscle larvae. Interestingly, the intranasal vaccination with bacterial carrier resulted in the reduction about 62% in the adult parasite load in BALB/c mice at day 8 post-infection.

All together the results obtained in this work suggest that *Salmonella enterica* serovar Typhimurium SL3261 may be used as a live vector to elicit mucosal and systemic responses. This results in the reduction of adult parasite load in *T. spiralis*-infected BALB/c mice. This strategy offers advantages over the vaccination with parasite antigens alone or with adjuvant.

ABREVIATURAS

p43 ⁽²¹⁰⁻²³⁹⁾	Péptido de 30 residuos derivado la glicoproteína de 43 kDa de <i>T. spiralis</i> , y cuya secuencia de aminoácidos es: RLEMYGSFLAKVMVNMRIWAVTDNTLQTT
ag30	Secuencia de nucleótidos (DNA) que codifica para el p43 ⁽²¹⁰⁻²³⁹⁾ .
AT	Autotransportador
CN	Célula nodriza
DHB	Ácido dihidroxibenzoico
ET	Extracto total de la LM de <i>T. spiralis</i> .
FLAG	Péptido bandera para detectar la expresión de la proteína de fusión.
p43 kDa	Glicoproteína de 43 kDa de <i>T. spiralis</i> .
IFA	Inmunofluorescencia indirecta
kDa	kiloDaltons
LA	Larva ó parásito adulto
LM	Larva muscular
LRN	Larva recién nacida
LTB	Secuencia señal de tráfico LTB (subunidad B de la toxina termolábil de <i>E. coli</i>). Es una señal de tráfico sec-dependiente.
mA	miliamperes
nirB	Promotor nir B inducible en anaerobiosis ó en condiciones microaerofílicas <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> .
p.i	postinfección
rpm	revoluciones por minuto
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS.
ShdA	Autotransportador ShdA, su nombre proviene de <i>Shedding</i> , que significa eliminar.
V	volts

INTRODUCCIÓN

Los nemátodos gastrointestinales (GI) son los agentes causales de la gran mayoría de las infecciones adquiridas comúnmente en todo el mundo, afectando aproximadamente a un cuarto de la población humana (Chan et al., 1994). Aunque causan una mortalidad relativamente baja, estas infecciones resultan en altos niveles de morbilidad, además de ser más severas en niños, cuyo desarrollo físico y mental se afecta. Por otra parte, pueden causar pérdidas económicas significativas en animales infectados (Cooper et al., 1992; Lanusse y Prichard, 1993; Wakelin, 2000). Los nemátodos GI pueden ocupar una variedad de nichos dentro del intestino, tales como el lumen (i.e. *Ascaris spp.*, *Nippostrongylus brasiliensis*); superficie de las mucosas (*Ancylostoma spp.* y *Necator spp.*); tejido intraepitelial (*Trichinella spiralis*, *Trichuris spp.*) ó penetrar tejido (*Heligmosomoides polygyrus*, *Strongyloides spp.*). La patología (enteropatía) asociada a estos parásitos puede variar de acuerdo a la particular combinación huésped-parásito, pero puede tener algunas causas que incluyen daño directo inducido por la adhesión, migración/penetración del parásito, ó daño secundario resultante de infecciones bacterianas oportunistas ó de la respuesta inmune del huésped hacia el parásito o bacteria (Garside et al., 2000).

Triquinelosis

Entre las helmintiasis que pueden afectar el tracto gastrointestinal se encuentra la triquinelosis, una zoonosis producida por nemátodos del género *Trichinella spp.*, los cuales tienen una amplia distribución mundial (Dupoy-Camet, 2000). Esta infección puede afectar al humano y a especies animales tanto domésticas (cerdo, caballo) como de vida silvestre (osos, zorros, aves, reptiles) (Capó y Despommier, 1996).

Actualmente se han descrito 7 especies de *Trichinella* y solo 3 genotipos sin asignación de especie (T₆, T₈ y T₉), con distintas capacidades de generar la enfermedad (Tabla 1).

Tabla 1. Características generales de las especies y genotipos de *Trichinella*. (Tomado de Bolas-Fernández, 2003).

Especie	Genotipo	Encapsulado	Distribución geográfica	Infectividad/ características biológicas.
<i>T. spiralis</i>	T1	Si	Cosmopolita	Alta para roedores y cerdo
<i>T. nativa</i>	T2	Si	Regiones del Ártico y subártico	Muy Baja para roedores y cerdo
<i>T. britovi</i>	T3	Si	Zonas templadas	Baja para roedores y cerdo
<i>T. pseudospiralis</i>	T4	No	Cosmopolita	Infectiva para aves
<i>T. murrelli</i>	T5	Si	Región del Neoártico	No resiste el congelamiento
	T6	Si	Región del Neoártico	Relacionada a <i>T. nativa</i>
<i>T. Nelson</i>	T7	Si	África ecuatorial	Muy baja infectividad para roedores y cerdo
	T8	Si	África subtropical	Relacionada con <i>T. britovi</i>
	T9	Si	Japón	Relacionada con <i>T. britovi</i>
<i>T. papuae</i>	T10	No	Papua Nueva Guinea	Infectiva para roedores y cerdo, no infectiva para aves.

Este género ha evolucionado de manera politípica, dando lugar a los genotipos conocidos, de los cuales 7 tienen una especie asignada, como consecuencia de la adaptación del parásito a los distintos huéspedes de diferentes regiones geográficas y bajo condiciones ambientales muy variables. A este respecto, la presión selectiva durante la coevolución huésped-parásito, favorece la propagación de los parásitos que están genéticamente preadaptados a sobrevivir en un "nuevo" huésped y estos en virtud de su capacidad de sobrevivir y reproducirse, desarrollan distintos genotipos y eventualmente evolucionan en nuevas especies. Por su parte, las nuevas especies parecen diferir en algunas de sus características biológicas de la forma ancestral y consecuentemente, su capacidad para sobrevivir y propagarse en el huésped original y en otros, parece estar limitada (Bolas-Fernández, 2003).

El hombre es un huésped accidental, a partir del cual no hay transmisión del parásito a otro huésped. La infección en este, se produce por consumo de carne cruda o insuficientemente cocida de un animal previamente infectado. (Capó y Despommier, 1996). La enfermedad se manifiesta como un síndrome

con signos y síntomas clínicos de intensidad variable, dependiendo del grado de invasión, la especie de *Trichinella* implicada y la respuesta inmune del huésped (Kociecka, 2000).

Cabe destacar que *T. spiralis* es una de las especies más infectivas para el humano, además de ser una de las especies mejor adaptadas a los huéspedes domésticos como el cerdo. Por su parte, el consumo de carne de cerdo, ya sea cruda ó cocida inadecuadamente, representa la principal fuente de infección para el humano, tanto en nuestro país como en otras partes del mundo (Ortega-Pierres et al., 2001; Pozio, 2001), por lo que resulta especie de particular interés para el presente trabajo.

Ciclo de vida de *T. spiralis*.

T. spiralis es un nemátodo intracelular que lleva a cabo todo su ciclo de vida en un solo huésped. Mamíferos y aves pueden infectarse cuando consumen carne cruda o cocida inadecuadamente, de un animal previamente infectado

El ciclo de vida se caracteriza por tener 2 fases (fig. 1):

1. **Entérica**, representada por el parásito adulto.
2. **Sistémica**, conocida también como parenteral, la cual está representada por la larva muscular (LM) y la larva recién nacida (LRN).

La primera fase comienza cuando un huésped potencial ingiere carne de un animal previamente infectado (que contiene LM viables de *T. spiralis*). Estas LM al ser liberadas por acción de los jugos gástricos, migran hacia el epitelio columnar y la lámina propia del intestino delgado, preferentemente hacia el duodeno. Tres ó cuatro días después de la infección, la LM se desarrolla al estadio adulto en el intestino delgado. Este sitio es donde se inicia el proceso de diferenciación sexual (aprox. 8 h después de la infección). El parásito sufre 4 mudas en menos de 30-40 h, hasta llegar al estadio adulto. En este momento la mayoría de los parásitos están completamente diferenciados

en hembras y machos. La copulación comienza a tener lugar aproximadamente a las 48 h. Por razones aún desconocidas, el macho es expulsado después de ocurrir la fecundación, en tanto que las hembras aumentan de tamaño y se fijan a la mucosa, ya que la penetran a través de las microvellosidades de la misma. Cada hembra puede liberar de 500 a 1500 LRN (Wakelin D, 1983), pero este número varía dependiendo del estado inmunológico del huésped y la especie infectante de parásito (Despommier, 1983; Wakelin y Denham, 1983).

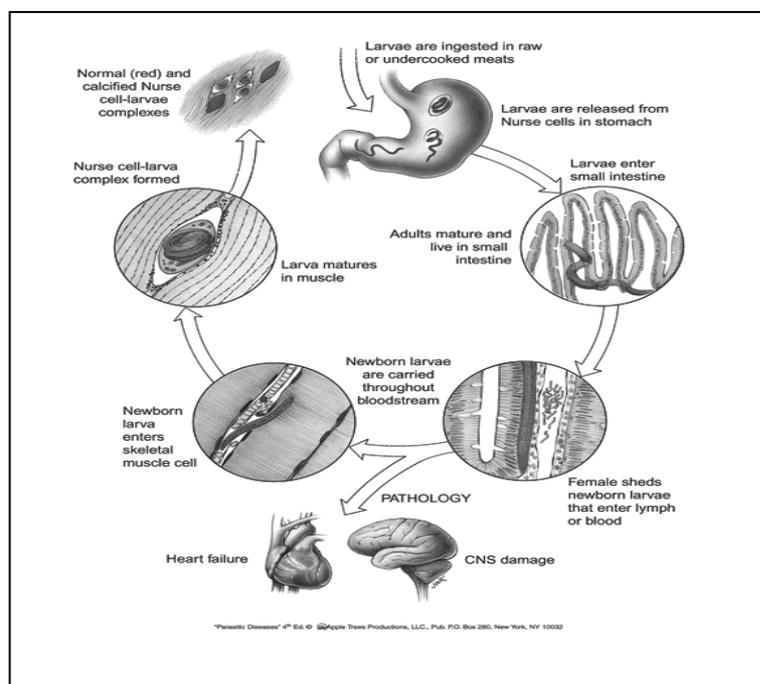


Figura 1. Ciclo de vida de *T. spiralis*. Tomado de Capo y Despommier, 1996.

La embriogénesis dura alrededor de 90 h, ya que en el caso de *T. spiralis*, las LRN son liberadas al quinto día postinfección (p.i.). Posteriormente, las LRN atraviesan la mucosa intestinal y entran a la circulación arterial y linfática, vía conducto torácico, pasando por corazón y pulmones y de aquí a su tejido blanco: el músculo esquelético. Entre músculos que son pobres en glucógeno, pero con gran actividad como: diafragma, intercostales, cuádriceps, lengua maceteros etc., se pueden localizar las larvas a partir del séptimo día. Inmediatamente después de la penetración a la célula muscular, la larva

comienza un período prolongado de crecimiento y desarrollo post-embionario sin cambio de muda. A partir del día 13 los parásitos pueden ser infectivos para un nuevo huésped (Despommier, 1990).

El desarrollo de la LM induce en el huésped una serie de cambios a fin de asegurar la supervivencia del parásito y que culminan en la formación de un complejo parásito-célula muscular huésped, llamado **célula nodriza** (CN), en un periodo de 20 días p.i. Sin embargo, la mayoría de los cambios se completan entre el día 12 y 15 p.i. (Despommier, 1993; Boireau et al., 1997). Estos cambios se resumen en la tabla 2.

A diferencia de la mayoría de los parásitos intracelulares, *Trichinella* invade a la célula huésped sin producir su muerte y de esta manera asegura su supervivencia a largo plazo. A este respecto, se sugiere que el parásito reprograma la expresión genómica de la célula huésped, transformándola hasta completar la formación de la CN. Esta es una de las razones por las cuales *Trichinella spp* es considerado uno de los parásitos mejor adaptados, debido a que su estrategia que le permite extenderse en una gran variedad de huéspedes (Despommier, 1998).

Como resultado de la infección con el parásito, en el huésped se genera una reacción inflamatoria, además de que hay alteración del sarcolema muscular, afluencia de macrófagos y eosinófilos, hipertrofia de fibras musculares, hiperplasia histocitaria y del tejido conjuntivo intersticial. Se forma una cápsula de forma elipsoidal con el eje mayor en sentido de las fibras musculares, que mide 400 μm de largo por 250 μm de ancho, en cuyo interior se encuentra la LM viva, la cual crece hasta 900 μm de longitud.

Tabla 2. Cambios inducidos durante la formación de la célula nodriza en una infección por *T. spiralis*.

Cambio	Características observadas	Día
Pérdida de proteínas musculares	Actina, miosina y creatina cinasa indetectables.	8 p.I.
Alargamiento del núcleo del miocito.	Existe una división nuclear y la replicación del DNA que resulta en la generación de un DNA 4n en cada núcleo y en aproximadamente en 40-60 núcleos por célula nodriza.	4-5 p.I.
Daño mitocondrial.	Vacuolización de la matriz mitocondrial interna.	5 p.I.
Síntesis de colágeno tipo IV y tipo VI.	Célula nodriza rodeada por una cápsula de colágeno tipo IV y VI, ambos sintetizados por ésta. Durante el periodo de síntesis de colágeno todo el núcleo alargado queda transcripcionalmente activo lo cual da lugar a la sobreexpresión de estos dos tipos de proteínas colágeno. Posteriormente al día 26 p.i., la síntesis de colágeno tipo IV se detiene, mientras que la de tipo VI continua en bajo grado durante la infección, así se deduce que estos dos genes están regulados por dos mecanismos diferentes.	7 y 8 p.I.
Angiogénesis.	Durante el desarrollo de la LM se inicia un programa de angiogénesis, precedido por un evento hipóxico dentro de la célula nodriza, que resulta en la sobreexpresión del factor de crecimiento endotelio-vascular (<i>VEGF</i> , por sus siglas en inglés) el cual dirige la construcción de redes de capilares vascularizadas, sobre la superficie de la capa de colágeno externa, con el fin de asegurar una fuente constante de metabolitos de bajo peso molecular	9 p.I.
Secreción de proteínas tivelosiladas	La LM de <i>T. spiralis</i> , secreta más de 40 proteínas diferentes, la mayoría de ellas glicosiladas con un azúcar poco usual altamente antigénico, llamado tivelosa (3,6 dideoxi-arabinohexosa).	12-15 p.I.

p.i.= post-infección., p.I.= post-invasión a la célula muscular. Elaborada a partir de los datos descritos por Despommier, 1998.

En la CN hay tejido conectivo, tejido fibroso y en los polos glóbulos de grasa que aparecen tardíamente e indican la degeneración del mismo, presentándose poco tiempo después la calcificación. La pared de la célula

nodriza resulta de la reacción tisular del huésped sin intervención activa de la larva. (Bolas Fernández, 2003).

Antígenos de *Trichinella*

Debido a que el ciclo de vida de *Trichinella* incluye estadios tanto intra como extracelulares, este parásito promueve activamente interacciones huésped-parásito que facilitan el reconocimiento de antígenos por el sistema inmune del huésped. La mayoría de los antígenos representan potenciales inmunógenos además de ser estadio-específicos. De manera interesante, los antígenos del parásito juegan un importante papel en la protección contra el ambiente proporcionado por el huésped a lo largo de todo el ciclo de vida, además de tener efectos inmunoestimulatorios en el huésped (Dea-Ayuela y Bolas-Fernández, 1999).

Al igual que en otras especies de helmintos, los antígenos de *Trichinella* pueden dividirse en tres componentes, dependiendo de su localización: de superficie (S), de excreción/secreción (ES) y componentes somáticos residuales. (Dea-Ayuela y Bolas-Fernández, 1999). No obstante, existen otras clasificaciones en las cuales los antígenos se han caracterizado mediante el uso de anticuerpos monoclonales, principalmente mediante la técnica de Western-blot (Appleton, et al, 1991; Ortega-Pierres et al., 1996). En los primeros estudios, tres estadios antigénicos pudieron establecerse para identificar epítomos inmunodominantes de los estadios de larva infectiva o LM, adultos y LRN. La mayoría de estos estudios se enfocaron en el estadio de LM con la finalidad de identificar antígenos inmunodominantes (Parkhouse y Ortega-Pierres, 1984; Kehayov et al., 1991).

1. Antígenos de superficie

Se asume que este tipo de antígenos representan el blanco principal del sistema inmune, debido a que proporcionan la interfase huésped-parásito, sin embargo también ha sido demostrado que antígenos internos pueden

ser expresados en la cutícula interna y de esta manera mimetizar aquellos cuyo origen es de superficie. La LRN presenta 4 antígenos principales de 20-, 30-, 58-, y 64-kDa, en tanto que la LM tiene 4 principales antígenos de 47-, 55-, 90- y 105 kDa, de los cuales el de 55 y 105 kDa, tienen la capacidad de unirse a lentil-lectina. Asimismo, se identificó otro grupo de antígenos en la cutícula de los estadios L2-L4, cuyos pesos moleculares son de 20-, 33-,40- y 56 kDa. Entre estos antígenos, el de 56 kDa se diferenció del de 55 kDa de la LM. Por su parte, de los antígenos presentes en L4, sólo aquellos con peso molecular bajo se encuentran también en el estadio adulto (Phillipp M., 1980). Los α -esticocitos o α -gránulos son la principal fuente de los antígenos de superficie, los cuales posteriormente son secretados vía esófago.

2. Antígenos de Excreción/Secreción (ESP)

Estos antígenos están localizados exclusivamente dentro de la célula nodriza (i.e. en el citoplasma, núcleo hipertrófico, esticocitos y cutícula del parásito). Pueden favorecer la sobrevivencia del parásito, bloqueando el sistema inmune del hospedero. Dentro de ésta categoría se agrupan muchas glicoproteínas. Alrededor del día 15 p.i., estos epitopos se encuentran localizados a lo largo de todas las fibras musculares, en músculos adyacentes, núcleos hipertróficos, esticocitos y cutícula del parásito. Más tarde, al día 30 p.i. existe un aumento marcado en la intensidad y distribución de los ESP a nivel de músculo (Li et al., 1999). Entre algunas de las proteínas funcionales que se agrupan dentro de los ESP de *T. spiralis* se encuentran proteínas de choque térmico, endonucleasas, serin proteasas, endonucleasas, proteínas de unión a DNA, inhibidores de serin proteinasas, aunque los ESP de *T. pseudospiralis* están más bien implicados en eventos de inmunosupresión y de unión a DNA (Nagano et al., 2004).

3. Componentes somáticos residuales

Los antígenos somáticos constitutivos tienden a ser moléculas ampliamente distribuídas y conservadas. Juegan un importante papel

después de la muerte y destrucción del parásito, particularmente en algunas reacciones patológicas (Parkhouse y Harrison, 1989). De hecho muchos de ellos resultan de gran importancia para diagnóstico de la enfermedad. Algunos de los antígenos somáticos son comunes a los ESP, tales como 49-, 52-, 54-, 60- y 62 kDa, parecen ser similares a aquellos cuyos pesos fueron 45-, 49- y 53 kDa y a 48- y 50-55 kDa de los ESP (Boireau et al., 1997; Dea-Ayuela y Bolas-Fernandez, 1999). Mediante diversos estudios inmunocitoquímicos se ha demostrado la presencia de sustancias antigénicas en estructuras reproductivas del parásito adulto, lo que sugiere que la respuesta contra este estadio, pudiese estar implicada en la protección por interferencia con la capacidad reproductiva del parásito (Takahashi et al., 1994).

Tabla 3. Antígenos de *T. spiralis*. Elaborada a partir de los datos descritos por Dea-Ayuela y Bolas-Fernández, 1999.

Localización en el parásito	Tamaño molecular (kDa)
Superficie	43-, 47-, 55-, 90- y 105-kDa (LM)
	20-, 58- y 64 kDa (LRN)
	20-, 33-, 40-, 56-kDa (adulto)
Excreción/secreción (ESP)	43-, 49-, 53-, 48-, 52-, 50-55-, 97-, 105 kDa (LM).
Componentes somáticos residuales	49-, 52-, 54-, 60- y 62-kDa (LM)

Antígenos TSL-1

Durante las décadas recientes se han dedicado muchos de los esfuerzos a la caracterización de los antígenos de *Trichinella* producidos durante las fases entérica y muscular. Los patrones de reconocimiento obtenidos a partir del análisis por inmunoelectrotransferencia o Western-blot con anticuerpos monoclonales y policlonales permitió el establecimiento de 9 familias de antígenos conocidas como TSL-1 a TSL-8 y TSA-1. (Appleton et al., 1991; Ortega-Pierres et al., 1996). Un análisis mucho más minucioso, basado en la localización, tamaño, inmunoreactividad con ESP y productos solubles estadio-específicos, condujo a una clasificación más extensa de 11 grupos antigénicos (Boireau et al., 1997). Anticuerpos monoclonales dirigidos contra los TSL-1,

reaccionan con los surcos de la cutícula de la LM. A este respecto, el patrón de inmunotinción obtenido con diferentes anticuerpos monoclonales que reconocen estructuras cuticulares, reveló la antigenicidad y la complejidad de la parte externa del parásito, estableciéndose al menos 7 estructuras antigénicas en la cutícula (Boireau et al., 1997).

Otros estudios han mostrado que la respuesta a los antígenos de *Trichinella* está dominada por los antígenos que muestran a la fosforilcolina (PC) (antígenos TSL-4) durante la fase entérica y los antígenos tivelosilados (TSL-1) durante la fase muscular (Ubeira F, 1987; Romaris F, 2002). La glicoproteína de 43 kDa (p43) es una de las moléculas más estudiadas y que pertenecen al grupo de los TSL-1.

Características de la glicoproteína de 43-kDa (p43)

Entre las 40 diferentes proteínas sintetizadas por los α -esticocitos de la LM de *T. spiralis* y que son secretadas hacia la célula huésped, se encuentra la glicoproteína de 43 kDa (p43). Esta molécula tiene un peso de 32 kDa cuando es deglicosilada. Se trata de un producto de excreción/secreción y de localización a nivel de superficie de parásito, constituida por 344 aminoácidos con una secuencia señal típica y 2 sitios de N-glicosilación (Vassilatis et al., 1992) (fig. 2). Asimismo, posee 2 residuos de tivelosa (3,6-dideoxi arabinohexosa) cuya configuración es conferida por los α -esticocitos de la LM, ya que ninguna de las proteínas secretadas por el estadio adulto es tivelosilada (Ortega-Pierres et al., 1996). El estadio adulto no expresa esta glicoproteína (Wu et al., 2002), ya que la producción del transcrito del gen de la p43 está restringida al estadio muscular del parásito (13-33 días p.i.) (Nagano et al., 2004).

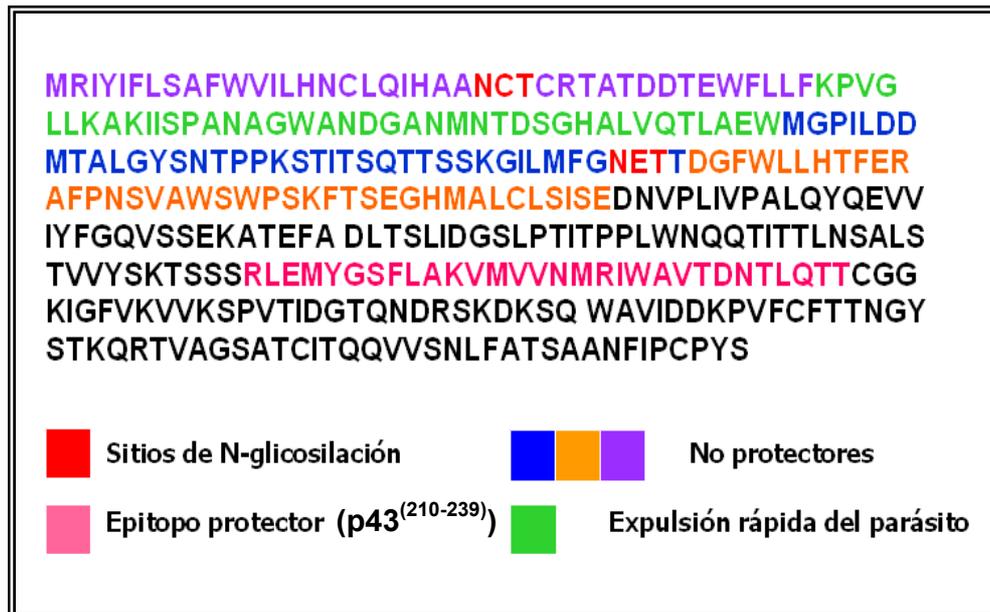


Figura 2. Secuencia de aminoácidos de la glicoproteína de 43 kDa (p43) de *T. spiralis*. Se muestra cada una de las regiones estudiadas en cuanto a niveles de protección a nivel intestinal, generados por la inmunización con péptidos sintéticos. (Elaborada a partir de los datos generados por Robinson et al., 1995, McGuire et al., 2002).

Una de las características de su estructura, es que posee un motivo de dimerización de hélice-asa-hélice (HLH), una característica común de las proteínas reguladoras a nivel transcripcional de músculo (Vassilatis et al., 1992; Murre et al., 1989), sin embargo el hecho de que carece de una región precedente de aminoácidos básica como ocurre con IκBε (un inhibidor del NFκB), descartan la posibilidad de que esta glicoproteína pueda tener tal función. No obstante, tiene un elevado grado de homología con el regulador negativo de diferenciación miogénica *Id* y la proteína *emc* de *Drosophila* (Vassilatis et al., 1992). Estos aspectos llevaron a plantear la posibilidad de que la p43 estuviese implicada en la formación de la célula nodriza. A este respecto, estudios realizados con líneas celulares de mioblastos de ratón transformados de manera estable con el cDNA de la gp-43, no revelaron efecto alguno sobre la diferenciación del mioblasto. Por otra parte, anticuerpos específicos contra la p43 no permitieron la detección de la glicoproteína en extractos nucleares de la CN, lo que hace suponer que la p43, no está implicada en la formación de la CN, sino más bien es almacenada en los α-esticocitos de la LM y secretada en el intestino del siguiente huésped (Vassilatis et al., 1996). Otra evidencia experimental consistente con lo anterior, es que LRN

irradiadas con ^{60}Co detuvieron su desarrollo de los esticocitos, incluyendo aquellos que producen a la p43, de hecho, este tipo de células (en la LM resultante) no produjeron cantidades detectables de la glicoproteína. De forma interesante, células musculares infectadas con las LM resultantes mostraron todas las características típicas de una célula infectada con *T. spiralis*. En este mismo estudio, se aislaron extractos nucleares de células infectadas y se enfrentaron con anticuerpos dirigidos únicamente a la p43, encontrándose reactividad con cuatro proteínas cuyos pesos fueron de 71, 79, 86 y 97 kDa (Jasmer DP, 1994). Por otra parte, existen otras proteínas inmunológicamente relacionadas a la p43 a nivel de citoplasma y núcleo de célula nodriza (Vassilatis et al., 1992, Jasmer et al., 1994) y pueden estar implicadas en la desdiferenciación de la célula muscular/formación de la célula nodriza (Vassilatis et al., 1996), pero es necesario realizar más estudios a este respecto.

Función de la p43

En tanto su molécula blanco no sea identificada y funcionalmente definida, el papel de la p43 continuará siendo objeto de intenso estudio. Sin embargo existe la posibilidad de que la LM use la tivelosa de esta glicoproteína (al igual que la de otros de sus productos tivelosilados) para ganar entrada ó para mediar la invasión a su nicho intramulticelular a nivel de intestino delgado (McVay et al., 2000). A este respecto, estudios *in vivo* han demostrado que anticuerpos anti-tivelosa de la clase IgG, protegen al epitelio de la invasión y causan que la larva establecida de *T. spiralis* abandone el nicho. (McVay et al., 1998). Por otra parte, cuando se cocultivaron LM con anticuerpos anti-tivelosa, se observaron diferentes actividades inhibitorias, tales como exclusión de la larva de las células epiteliales, obstaculización de la larva tan pronto como migra dentro de la monocapa epitelial e interferencia con la mudas (McVay et al., 2000). La reacción entre los anticuerpos y la tivelosa a nivel de cavidad cefálica de la larva, conducen a la formación de una capa formada por el depósito de complejos inmunes en esa porción, que probablemente pudiera

estar bloqueando la recepción sensorial o actuando como una barrera física que impide penetrar a la célula epitelial (McVay et al., 1998). Por otra parte, en ratas que fueron inmunizadas pasivamente con anticuerpos monoclonales y policlonales anti-TSL-1, se observó una expulsión rápida de los parásitos adultos, en la cual, los anticuerpos cubrieron la superficie de la LM y promovieron la captación de la larva a través del moco intestinal, aunque de manera reversible sin que esto implique protección (Appleton et al., 1993), de hecho la tivelosa no parece ser esencial para la protección (Jarvis et al., 1992), sino la parte peptídica. De hecho, estudios con ratones NIH inmunizados con BSA-tivelosa desarrollaron anticuerpos en contra de este carbohidrato, sin embargo estos anticuerpos no protegieron durante la etapa intestinal de la infección, sugiriendo la posibilidad de que la tivelosa protege epítopos peptídicos importantes desde el punto de vista funcional para el parásito (Goyal et al., 2002). Por otra parte, estudios en los cuales se inmunizaron ratones NIH por vía oral con un péptido derivado de la p43 (de 40 aminoácidos, p43⁽⁴¹⁻⁸⁰⁾) con la subunidad B de la toxina colérica (CTB, por su siglas en inglés) mostró un aumento en la respuesta humoral mediada por IgA en mucosa intestinal, pero no de IgG; mientras que la inmunización intranasal resultó en una elevada respuesta mediada por IgA e IgG₁ a nivel de mucosas, sugiriendo una respuesta tipo Th2 (Robinson et al., 1995a 1995b, 1995c). Por otra parte, la inmunización intranasal con un péptido sintético de 30 aminoácidos derivado de la p43 (p43⁽²¹⁰⁻²³⁹⁾) con la subunidad B de la toxina colérica (CTB), redujo de manera significativa la carga parasitaria en ratón NIH a los 8 días p.i. La respuesta inmune parece haber sido mediada por IgG₁ y por IgG_{2a}. En este modelo, se generó una respuesta de tipo Th2, necesaria para promover la protección contra el parásito intestinal (McGuire et al, 2002).

Respuesta inmune a *T. spiralis*

La respuesta inmune limita y en algunos casos elimina las infecciones producidas por nemátodos (Viney, 2002). La respuesta inmune contra *Trichinella* ha sido ampliamente estudiada tanto en infección natural como en experimental, siendo que el principal interés se ha enfocado a aquellos epítopos

relevantes capaces de despertar una respuesta inmune que sea protectora contra la reinfección y que sean de interés como propuestas de diagnóstico (Bolas–Fernández, 2003).

El epitelio intestinal es el primer sitio de contacto con el huésped para que la LM de *T. spiralis* comience la infección. Eventos como la invasión y la penetración a las células intestinales son cruciales, sin embargo los mecanismos usados por este parásito en el establecimiento de su nicho intra y multicelular son desconocidos. La invasión requiere de un factor mecánico y otro de comunicación huésped-parásito, pero se desconocen que proteínas participan en estos eventos, aunque existe la posibilidad de que los productos de excreción/secreción (ESP) liberados por la LM y el adulto, tengan un papel a este nivel (Despommier, 1983). Estudios *in vitro* demostraron que anticuerpos capaces de unirse a la tigelosa protegen al epitelio de la invasión y causan que la LM abandone el nicho (McVay et al., Appleton y Romaris, 2001). En el ratón, *T. spiralis* induce una fuerte respuesta inflamatoria (Larsh, 1975), cuya cinética es variable entre distintas cepas de ratón. Sin embargo, existe un pico en la respuesta inflamatoria, la cual coincide con la expulsión de los parásitos adultos del intestino (Kamal et al., 2001). El mecanismo de expulsión de los parásitos adultos de *T. spiralis* del intestino delgado es un proceso inmunológico complejo donde participan células Th2 activadas y células cebadas de la mucosa (MMC) (Helmy et al., 2002). Está demostrado que las MMC y las citocinas tipo Th2 (IL-4, IL-9, IL-13) tienen un papel en la expulsión del parásito adulto (Khan et al., 2001; 2003; Finkelman et al., 1997). En ratones inmunocompetentes, la inflamación es caracterizada por atrofia de las vellosidades intestinales, hipertrofia de las criptas, mastocitosis en mucosas, incremento en la permeabilidad de las mucosas, hiperplasia y respuesta aumentada de las células caliciformes (Garside et al., 1992), esta última debida probablemente a los efectos aditivos de las citocinas Th2 (IL-4, IL-13) y de la IL-9, lo cual estimula a su vez, la contracción muscular intestinal y por lo tanto acelera la eliminación de los parásitos (Khan et al., 2003). Por otra parte, la respuesta tipo Th2 inducida por la IL-4 regula la producción de anticuerpos y el

cambio de isotipo a IgG₁ e IgE y la activación de las células cebadas. La IgE se concentra en los enterocitos del lumen intestinal con la finalidad de unirse a *T. spiralis* para prevenir la invasión (Negrao-Correa, 2001; Watanabe et al., 2005). Así, Gurish et al., (2004) observaron depósitos de este isotipo en la periferia de la LM, sugiriendo un mecanismo protector contra la larva así como un aumento en la eliminación del parásito adulto.

Tratamiento y profilaxis de la triquinelosis

El tratamiento de la triquinelosis se basa principalmente en el uso de bencimidazoles (albendazol, mebendazol) y en algunos casos con prednisolona para atenuar los efectos de la inflamación como resultado de la invasión/penetración de la LM a los tejidos (Capo y Despommier, 1996). La mayoría de los fármacos con actividad antiparasitaria son seguros, económicos y altamente efectivos contra un amplio espectro de parásitos. Sin embargo, el alarmante incremento en el número de especies de parásitos resistentes a estos fármacos, los aspectos relacionados con los residuos de éstos en la cadena alimenticia y la carencia de nuevos fármacos, estimulan el desarrollo de métodos alternativos de control, dentro de los cuales, las vacunas tienen un papel central (Vercruyse et al., 2004).

Vacunas propuestas contra parásitos protozoarios y nemátodos

Los parásitos helmintos son más complejos que los parásitos de vida libre, debido a que han evolucionado mecanismos de acuerdo con los diferentes microambientes proporcionados por sus huéspedes y a las condiciones en las que viven. Los helmintos presentan al huésped una variedad más amplia de los antígenos en los diferentes estadios de desarrollo, lo cual induce distintos mecanismos inmunes. Por otra parte, la expresión diferencial de genes en los diferentes estadios de desarrollo, puede representar también un obstáculo en el desarrollo de vacunas al igual que los cambios en los patrones de migración y capacidad para evadir la respuesta inmune del huésped, mecanismos inmunes aún no definidos, variación en el tipo de respuesta inmune, bajo número de antígenos potenciales, así como la falta de entendimiento preciso acerca de las

interacciones huésped-parásito comparado con virus y bacterias (Colley et al., 2001; Geary y Thompson, 2003; Vercruysse et al., 2004).

Además existen también algunas consideraciones prácticas que dificultan el desarrollo de una vacuna antihelmíntica, como la dificultad de cultivar parásitos helmintos ya sea *in vitro* ó en modelo animal. Generalmente el tiempo que se requiere para cultivar estos parásitos es largo, además de que los cultivos requieren de múltiples transferencias en diferentes huéspedes. Desafortunadamente, las manipulaciones genéticas tales como transfección de genes y el uso de RNA de interferencia aún no han sido desarrolladas para la gran mayoría de helmintos (Colley et al., 2001).

Por otra parte, aunque las vacunas contra los parásitos en la actualidad siguen siendo raras, existen algunas disponibles comercialmente y constituyen un futuro prometedor para el control de muchas enfermedades parasitarias (Dalton y Mulcahy, 2001). La gran mayoría de las vacunas disponibles comercialmente están dirigidas a parásitos protozoarios, basadas en microorganismos vivos atenuados, salvo ciertas excepciones y cuyo objetivo principal es iniciar una infección de bajo nivel en el huésped que estimule una respuesta inmune protectora (Cornelissen y Schetters, 1996; Vercruysse et al., 2004). Son muy pocas las vacunas contra protozoarios basadas en parásitos muertos ó fracciones de antígeno purificado. Ejemplos de ello son una vacuna basada en taquizoítos muertos de *N. caninum*, la cual reduce el aborto inducido por el mismo parásito (Schetters et al., *en prensa*); las vacunas basadas en antígenos de parásito solubles de uno ó más especies de *Babesia*, que reducen la enfermedad clínica en perros debida a *B. canis* (Schetters et al., 2005) y una vacuna para la prevención de signos clínicos de giardiasis y reducción de la eliminación de los quistes en perros y gatos que está comercialmente disponible en EUA. Esta última vacuna se obtuvo alterando axénicamente trofozoítos completos de *Giardia duodenalis* en cultivo (Olson et al., 2000).

Por otra parte, los parásitos helmintos al ser más complejos que los protozoarios, se encuentran ante distintos mecanismos inmunes que operan en

los diferentes estadios de desarrollo. De aquí que, el acierto del inmunólogo debe ser identificar los blancos apropiados a los cuales van dirigidas las vacunas para que la respuesta inmune sea capaz de inhibir su función. No obstante, la vacunación contra parásitos helmintos se ha vuelto una realidad con el desarrollo y registro de vacunas basadas en proteínas recombinantes (Knox, 2000).

Desarrollo de vacunas contra nemátodos intestinales

El conocimiento de los genes de los parásitos podría conducir a la identificación de antígenos útiles (Vercruysse et al., 2004). En los años recientes se concluyó con la secuenciación de los genomas del humano, *Drosophila melanogaster* y *Caenorhabditis elegans* y un número creciente de microorganismos patógenos y de importancia económica (McClelland et al., 2001; Tettelin et al., 2001; *International Human Genome Sequencing consortium*, 2004). Muchos métodos en la actualidad, están siendo desarrollados para entender cómo esta información puede ser traducida en un conocimiento significativo en la estructura y función de las proteínas y cómo puede ser aplicado a la comprensión de enfermedades y consecuentemente al desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas (Dalton JP, 2004). En relación a los genomas nucleares, más de 50,000 secuencias de genes para cada uno de los helmintos tipo filaria y *Schistosoma spp*, actualmente están disponibles en el GenBank. Más aún, los proyectos de secuenciación de genomas de algunos otros parásitos helmintos, tales como *Strongyloides stercoralis*, *Echinococcus spp*, *Echinostoma paranese*, *Fasciola hepatica* y *T. spiralis* han comenzado. (Peregrín-Alvarez et al., 2005). A partir de secuencias de interés, se podrían generar proteínas recombinantes como parte de una estrategia para evaluar su inmunogenicidad, pero para llevarlo a cabo es necesario elegir apropiadamente el sistema de expresión para producir la proteína recombinante en cantidad suficiente. De hecho, la respuesta inmune hacia un antígeno (en su forma recombinante) puede estar influenciada por la estabilidad del vector de expresión, la estabilidad del antígeno *in vivo* y la localización de la proteína recombinante dentro del vector bacteriano (acarreador bacteriano) (Galen y

Levine, 2001). Por ejemplo, la proteína recombinante puede resultar tóxica para la célula huésped ó el nivel de expresión puede estar restringido, debido a que el uso preferencial de codón, difiere del correspondiente en el parásito ú organismo de origen. El análisis de la proteína nativa y el gen que la codifica puede proporcionar información importante para orientar acerca del tipo de sistema o estrategia de expresión que deberá emplearse en la generación de una proteína recombinante. Por ejemplo, si la proteína es secretada o glicosilada, si los epítomos protectores dependen sólo de la estructura secundaria o si es necesario obtener una conformación terciaria, si tiene una actividad enzimática, etc. Todos estos aspectos deben ser cuidadosamente considerados antes de seleccionar el sistema de expresión (Andersen y Krummen, 2002).

En la actualidad, la expresión de antígenos heterólogos en bacterias representa la forma más sencilla y económica de obtener una proteína recombinante en suficiente cantidad. *E. coli* sigue siendo la bacteria de elección para una producción eficiente de proteínas recombinante debido a que es una bacteria bien caracterizada y cuenta con una gran variedad de promotores que la habilitan para ello, pero tiene el inconveniente de que muchas de las proteínas que expresa son insolubles y acumuladas en forma inactiva como cuerpos de inclusión. No obstante, algunas otras proteínas a nivel de citoplasma se encuentran en su forma soluble y pueden ser secretadas hacia el periplasma (véase más adelante) y expresadas en la membrana externa ó ser exportadas hacia el ambiente extracelular (Baneyx, 1999).

Importancia de la inmunidad a nivel de mucosas en el desarrollo de vacunas

La mayoría de los agentes patógenos penetran al huésped a través de las superficies de las mucosas. Las superficies de las mucosas son consideradas el sitio primario de interacción entre un organismo y su medio ambiente (Dietrich, et al. 2003). Éstas se encuentran recubriendo el tracto gastrointestinal, el tracto respiratorio y el aparato genitourinario y representan la más importante entrada para algunos patógenos como bacterias, virus y

parásitos, los cuales pueden replicarse y promover la enfermedad tanto a nivel de mucosas (sitio primario ó inductor) como a nivel sistémico, invadiendo tejidos, después de diseminarse vía torrente sanguíneo (Moldoveanu et al., 1995). A nivel de las superficies de las mucosas existen mecanismos de protección no específicos contra una gran variedad de agentes patógenos, estos incluyen la producción de moco, lisozima, lactoferrina y lactoperoxidasa. Adicionalmente el tejido linfoide asociado a mucosas (MALT, por sus siglas en inglés) protege a las mucosas de la agresión exógena, discriminando entre la incorporación esencial de nutrientes ó antígenos dañinos, microorganismos comensales y microorganismos patógenos. Por otra parte, la respuesta inmune de las mucosas se inicia generalmente en los sitios inductores, tales como placas de Peyer (PP) en el tejido linfoide asociado al tracto gastrointestinal (GALT, por sus siglas en inglés) y en sus sitios equivalentes en la nasofaringe (NALT, por sus siglas en inglés). Todos estos tipos de MALT, tienen como características en común la presencia de células M (ó microfold), macrófagos ($M\Phi$), células dendríticas (DC's), células T CD4+, CD8+ y células B productoras de IgA de secreción (IgA-s). Todas estas células, tienen una función importante en el inicio de la respuesta inmune de las mucosas mediante la incorporación, transporte, procesamiento y presentación de antígenos microbianos (Neutra et al., 1996; Kiyono et al., 2004). Es importante señalar que el principal isotipo de anticuerpo implicado en la respuesta inmune a nivel de mucosas es la IgA-s, que es cuantitativamente la más abundante, ya que la producen aproximadamente el 75% de las células B presentes. La IgA-s es secretada hacia el fluido gastrointestinal, saliva, lágrimas, orina y otras secreciones (Kiyono et al., 2004). Cabe destacar que una de las características adicionales de la IgA-s es su participación en la eliminación de antígenos mediante mecanismos principalmente relacionados con las consecuencias de la inflamación. Además la IgA-s puede facilitar la expulsión de patógenos y toxinas del cuerpo mediante su transporte hacia las secreciones exócrinas y biliares (Mazanec et al., 1993).

La inducción de un mecanismo inmune local y específico del MALT se puede lograr mediante la aplicación directa de un antígeno o propiamente la

vacuna en la superficie de las mucosas, resultando en un óptimo inicio de una respuesta inmune mediada por células (CMI) ó de tipo humoral. La aplicación a nivel de mucosas puede también inducir de manera muy efectiva una respuesta inmune sistémica (Berzofsky et al., 2001). La estimulación o aplicación local del antígeno o de la vacuna es la mejor manera de inducir una respuesta inmune en sitios efectores específicos (Moldoveanu et al., 1995). La tabla 4 muestra ciertas ventajas de utilizar la inmunización vía mucosas sobre la inmunización sistémica.

Tabla 4. Rutas de inmunización. Tomado de Medina y Guzmán, 2001.

Parámetros	Administración en mucosas	Administración parenteral
Reactividad	Baja	Alta
Aceptación	Alta	Baja, dolorosa
Estimulación de los sitios inductores	Directa	No directa
Tipo de respuesta inmune estimulada	Local (mucosas) y sistémica	Sistémica
Protección	Contra la enfermedad y la infección	Sólo contra la enfermedad
Seguridad	Alta sin riesgo de contaminación	Riesgo potencial de contaminación
Aplicación	Sencilla	Requiere de personal entrenado
Costo	Bajo	Alto

Por otra parte, otro aspecto relacionado con la inmunización a nivel de mucosas, es la capacidad para generar protección a largo plazo. Para ello, se recomienda que el antígeno sea aplicado directamente en la superficie de la mucosa (Kaul et al., 1998; Medina y Guzman, 2001). El inicio exitoso de la inmunización a nivel de mucosas depende en gran parte de los siguientes criterios:

- Aplicación efectiva del antígeno a sitio inductor (por ejemplo, células epiteliales de las PP).
- Aumento de la respuesta inmune de las mucosas mediante el uso de cepas atenuadas vivas, mejoramiento de los sistemas de aplicación, uso de inmunomoduladores tales como enterotoxinas (CTB y LTB) y citocinas.
- Elección del régimen y ruta de inmunización para inducir respuesta protectora a nivel local, así como sistémico (Medina y Guzman, 2001).

Diferentes estrategias se pueden emplear con la finalidad de aplicar el antígeno vía mucosas (Tabla 5), entre ellas, el uso de acarreadores bacterianos, probablemente constituye la estrategia más estudiada. Se ha reportado que un gran número de antígenos producidos por acarreadores bacterianos vivos y atenuados estimulan respuestas inmunes celulares y humorales, tanto a nivel sistémico como a nivel local.

Tabla 5. Estrategias de vacunación. Tomada de Medina y Guzmán, 2001.

ESTRATEGIA
Acarreadores bacterianos y virales (vectores vivos)
Adyuvantes de mucosas: LTB y CTB.
Partículas virales
ISCOMs
Liposomas
Micropartículas
Plantas transgénicas

La aplicación de antígenos vía mucosas, está asociada a 2 principales problemas: 1) que los antígenos expuestos por esta vía son pobremente inmunogénicos y 2) se necesita que una buena parte del antígeno sea protegido de la degradación. Para resolver estos problemas, se ha recurrido a diferentes estrategias, tales como uso de liposomas, microesferas biodegradables, producción de antígenos mediante vectores virales y bacterianos atenuados (Medina y Guzmán, 2001).

Aunque la gran mayoría de vacunas que actúan a nivel de mucosas son aplicadas oralmente, existen otros sitios de aplicación y que involucran a las mucosas descritas anteriormente. Las fosas nasales, vagina y colon, también pueden ser sitios para administrar las vacunas, ya que la inoculación en alguna de sus superficies puede conferir inmunidad en otros sitios y el sitio de administración puede tener un impacto significativo en el tipo de respuesta inmune (Johansson et al., 2001; Kutteh et al., 2001). Algunos estudios que han evaluado a los vectores vivos para la inmunoterapia del cáncer, han usado la vía intravenosa para administrar bacterias atenuadas (Chabalgoity et al., JA,

2002). Por su parte, la administración intranasal de vacunas con efecto a nivel de mucosas, ha sido ampliamente usada en modelos animales. Otros estudios revelaron la presencia de títulos de anticuerpos mucho más altos cuando el acarreador es administrado intranasalmente, en comparación con los títulos de anticuerpos obtenidos después de haber inmunizado oralmente con el acarreador bacteriano (Galen et al., 1997). Este tipo de estudio aún no ha sido realizado en humanos. Dada la proximidad del sistema nervioso central (SNC) a las fosas nasales, pueden existir complicaciones de invasión directa en cerebro (por ejemplo, la sinucitis por vector), que desafortunadamente no pueden ser predecibles a partir de los modelos animales (Kotton y Hohmann, 2004).

Acarreadores bacterianos como vehículos de inmunización

Se entiende por acarreador bacteriano toda aquella bacteria viva atenuada capaz de producir una ó varias proteínas heterólogas (ó antígenos de especies alejadas filogenéticamente), que puedan inducir la generación de una respuesta inmune en contra de dicho antígeno e inclusive, protección contra el agente patógeno-infeccioso (Jean-Claude et al., 1999). Lo ideal es que estos vectores vivos puedan generar una respuesta protectora, con memoria inmunológica con los mínimos efectos secundarios después de ser aplicada en 1 ó 2 dosis. (Ellis, 1999). Esta estrategia constituye la forma clásica de vacunación. Un ejemplo de esto es el uso del bacilo de Calmette-Guérin (BCG), ó *Mycobacterium bovis* atenuado mediante 231 subcultivos sucesivos durante 13 años (Weill-Halle, 1957). Sin embargo, muchas bacterias patógenas pueden ser atenuadas mediante ingeniería genética ó tecnología del DNA recombinante. No obstante, la atenuación excesiva del acarreador bacteriano puede resultar en una pobre inmunogenicidad. Por otro lado, cuando la atenuación es poco adecuada o insuficiente se produce una infección sintomática, especialmente en pacientes inmunosuprimidos (Hohmann et al., 1996; Garmory et al., 2002).

Las aplicaciones más comunes han incluido el empleo de enterobacterias, las cuales pueden inducir inmunidad a nivel de mucosas contra el antígeno ó epitopo heterólogo, aún cuando éste sea aplicado por vía oral. (Ellis, 1999). El uso de acarreadores bacterianos es de bajo costo y la sencillez asociada con la

que se producen en bioreactores, los cuales a su vez, facilitan la transferencia de tecnología. (Medina y Guzmán, 2000).

Tabla 6. Acarreadores bacterianos comúnmente usados. Tomada Guzmán de Medina y Guzmán, 2000.

Cepa	Localización	Potencial para desarrollar vacunas de DNA	Respuesta inmune que genera *
<i>Salmonella spp</i>	Fagosoma	+	S, M, Ab, Th, CTL
<i>Shigella spp</i>	Citoplasma	+	S, Ab, Th
<i>Listeria spp</i>	Citoplasma	+	S, M, Ab, Th, CTL
		(en estudios <i>in vitro</i>)	
<i>Vibrio spp</i>	Extracelular	-	S, Ab
<i>S. gordonii</i>	Extracelular comensal	-	S, M, Ab, Th
<i>Lactobacillus spp</i>	Extracelular comensal	-	S, M, Ab, Th

Abreviaturas*: respuesta mediada por anticuerpos (Ab), repuesta a nivel de mucosas (M), respuesta mediada por linfocitos T citotóxicos (CTL); repuesta a nivel sistémico (S); respuesta mediada por T colaborador (Th).

Dentro de las bacterias que han sido atenuadas para tales fines se incluyen varias cepas de *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* (serovar Typhimurium y Typhi), *Vibrio cholerae*, *Shigella flexnery*, *Lactobacillus spp* y *Mycobacterium bovis* (BCG) (Higgins et al., 1999; Germanier y Fuer, 1975; Capozzo et al., 2004, Hone et al., 1991; Tacket et al., 1997; 1992; Bellanti et al., 1993; Medina y Guzmán, 2000).

Las bacterias atenuadas mimetizan la infección natural, ya que su capacidad para propagarse y colonizar las mucosas les permite persistir por periodos relativamente prolongados, favoreciendo la inmunoestimulación. La administración por vía oral de los acarreadores, sobre todo en los sitios inductores como el GALT, MALT y NALT, estimulan respuestas tanto locales como sistémicas del tipo humoral y en algunos casos hasta celular, dependiendo de la cepa bacteriana usada como vacuna. Por otra parte, el uso de acarreadores bacterianos, elimina el uso de adyuvantes, ya que muchos componentes de la bacteria, tales como la pared celular y secuencias CpG, pueden funcionar como inmunomoduladores. (Dietrich et al., 2003). Por otra parte, entre las ventajas que ofrecen, es que la producción de antígenos pueden ser inducible *in vivo*, bajo ciertas condiciones, permitiendo así que el antígeno no resulte tóxico para el acarreador (Galen y Levine, 2001). Sin

embargo, estas propiedades dependen en gran medida de encontrar el correcto balance entre la atenuación de la bacteria (para seguridad y mantenimiento de la inmunogenicidad) y la producción estable del antígeno (para producir una vacuna eficaz). (Galen y Levine, 2001; Dietrich et al., 2003). Por tales razones, muy pocas cepas bacterianas con fines de vacuna se encuentran actualmente registradas (Dietrich et al., 2003).

***Salmonella* spp. como acarreador de antígenos heterólogos**

Las cepas atenuadas de *Salmonella* que funcionan como acarreadores de epítopos heterólogos, probablemente constituyen la estrategia más estudiada, debido a la relativa facilidad con la que se puede manipular (Curtiss III et al., 1994; Everest et al., 1995; Schodel et al., 1995; Kotton y Hohmann, 2004). Esta especie bacteriana fue la primera en usarse como vector recombinante para exponer antígenos (Curtis III et al., 1994). En los últimos 17 años ha habido un sustancial y creciente número de publicaciones que han explotado el uso de *Salmonella enterica* (Typhimurium y Typhi) como vector con fines de vacuna (Curtiss RIII, 2002).

Salmonella spp. normalmente ingresa al huésped vía oral. Una vez en el intestino, la bacteria interactúa con la superficie de las mucosas para establecer la infección invasiva e inducir una respuesta inmune sistémica y local a nivel de mucosas (Garmory et al., 2003). La mayoría de las infecciones son controladas a nivel de mucosa, causando un cuadro típico de gastroenteritis (Dougan y Maskell, 1989). Las consecuencias de la infección están determinadas por un lado por la expresión coordinada de los genes de virulencia (diseñada para evadir, disminuir e inclusive abatir la respuesta inmune) y por otro lado por los mecanismos de defensa del huésped (diseñados para restringir la supervivencia bacteriana y la replicación) (Raupach y Kaufmann, 2001). El delicado balance entre la virulencia de *Salmonella* y los mecanismos de inflamación/inmunidad del huésped, tiene importantes implicaciones para el desarrollo de vacunas basadas en esta bacteria (Raupach y Kaufmann, 2001). Al igual que muchas otras bacterias patógenas, *Salmonella* se puede atenuar mediante ingeniería genética o tecnología del DNA recombinante con la finalidad de usarlo sólo

como acarreador de antígenos o péptidos heterólogos (Ellis, 1999). La atenuación se logra mutando genes (*aroA*, *aroC* y *aro D*) implicados en importantes rutas de biosíntesis de aminoácidos aromáticos, ó de purinas (*purA*, *purE*). La atenuación de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium mutantes en *aroA*, se basó en sus propiedades auxotróficas. En general, la auxotrofia puede interferir con la replicación bacteriana dentro del huésped, siempre y cuando el metabolito esté ausente en él, o esté presente en cantidades insuficientes para el crecimiento bacteriano en el compartimento donde la bacteria reside (Stocker, 1988). En el caso de *Salmonella* mutante en el gen *aroA*, la bacteria depende de la adición extrínseca de ácido p-aminobenzoico y de ácido 2,3-dihidrobencico para la síntesis de aminoácidos aromáticos y el crecimiento bacteriano. Sin embargo, estos dos componentes no están presentes en células de huéspedes mamíferos (Hoiseth y Stocker, 1981; Raupach y Kaufmann, 2001).

En algunas de las cepas de *Salmonella* (incluyendo Typhi y Typhimurium) han desarrollado la capacidad de penetrar más profundamente en el huésped, causando la infección sistémica diseminada. Dichas cepas parecen resistir a la acción microbicida de algunas células como macrófagos y otras células de la respuesta inmune (Dougan y Maskell, 1989).

Existen numerosos trabajos que han detallado el uso de *Salmonella* como acarreador de antígenos heterólogos (Tabla 7); en los cuales, las vacunas bivalentes demostraron ser útiles en la inducción de protección en contra del patógeno del cual se deriva el antígeno heterólogo. (Garmory et al, 2002).

Tabla 7. Uso de *Salmonella spp* como acarreador de antígenos heterólogos. Se indica el tipo de respuesta que induce y los niveles de protección.

Antígeno heterólogo	Localización del antígeno en el acarreador	Tipo de respuesta	Referencia
---------------------	--	-------------------	------------

<i>Typhimurium</i>	p60 de <i>L. monocytogenes</i>	Citoplasma	Citotóxica CD 8+ (protección)	Gentschev et al., 1995.
<i>Typhi</i>	Antígeno O de <i>Shigella spp.</i>	Superficie	Humoral (protección parcial)	Formal et al. 1981.
<i>Typhi</i> , <i>Typhimurium</i>	LTB de <i>E. coli</i>	Periplasma	Humoral y Celular	Green et al. 1996.
<i>Typhimurium</i>	NANP (CSP) de <i>P. falciparum</i>	Superficie (MisL)	Humoral	Ruiz-Pérez et al., 2002.
<i>Typhimurium</i>	Ea1A y EaSC2 de <i>Eimeria stiedae</i>	Citoplasma	Citotóxica CD 8+ Protección parcial	Vermeulen, et al. 1998.
<i>Typhimurium</i>	PspA de <i>Streptococcus pneumoniae</i>	Secretado Periplasma Citoplasma	Humoral (protectora) Celular y humoral Celular.	Kang et al., 2002

La capacidad de algunos acarreadores bacterianos para replicarse intracelularmente, puede aumentar la habilidad para expresar péptidos heterólogos y generar una respuesta inmune celular en contra del respectivo agente patógeno. En este sentido, *S. entérica* serovar *Typhi*, también ha sido foco de atención para desarrollar una cepa con fines de vacuna que exprese péptidos y/o proteínas heterólogas. (Ellis, 1999).

Finalmente, cabe mencionar que con el transcurso de los años han emergido varios problemas en el desarrollo de las vacunas basadas en *Salmonella* como vector, resultando en reportes de vacunas poco efectivas o inefectivas (Galen y Levine, 2001). Sin embargo, los avances en esta tecnología en años recientes, han proporcionado algunas soluciones a estos problemas. Algunos de los problemas más comunes son los siguientes:

1. *Inestabilidad ó bajo nivel de expresión del antígeno heterólogo.* La expresión a niveles muy bajos ó insuficientes se verá reflejado en el grado de inmunogenicidad. Si el vector con fines de vacuna es poco inmunogénico, el uso de plásmidos de alto número de copias para incrementar la producción del antígeno puede mejorar la inmunogenicidad. (Covone et al., 1998). Alternativamente, el uso de

promotores inducibles como el *nirB* podría ser de gran utilidad (Chatfield et al., 1992). En este sentido, la expresión de antígenos heterólogos en *Salmonella* bajo el promotor *nirB*, ha mostrado estimular mejor la respuesta inmune en comparación a la respuesta generada por las cepas similares que expresan el mismo antígeno bajo el control de promotores constitutivos. (Chatfield et al., 1992; McSorely et al., 1997; Dunstan et al., 1999). Por otra parte, el uso de plásmidos de alto número de copias puede dirigir la producción de una gran cantidad de antígeno heterólogo que pueda resultar tóxico. Para tal caso, se recomienda emplear plásmidos de bajo número de copias con promotores inducibles.

2. *Baja inmunogenicidad.* Una posible solución podría ser la estrategia de construcción basada en repetidos en tándem del antígeno heterólogo, así como la clonación de adyuvantes como la subunidad B de la toxina termolábil de *E. coli* (LTB) y la subunidad B de la toxina colérica (CTB). También la baja inmunogenicidad puede estar determinada por la sublocalización del antígeno en el acarreador. (Garmory et al., 2002)
3. *Uso de marcadores de selección.* El mantenimiento del plásmido en el acarreador depende del agente de selección. Entre ellos, se encuentra la resistencia a antibióticos. Sin embargo, debido a que algunos plásmidos que llevan genes de resistencia a ciertos antibióticos, su uso en humanos aún está siendo cuestionado e inclusive descartado. Para ello, se recomienda hacer integración cromosómica del gen codificante del antígeno heterólogo en el acarreador bacteriano (Lee et al., 2001).

Localización del antígeno heterólogo en el acarreador

La expresión del antígeno heterólogo en la membrana externa de la bacteria (gramnegativa) ó la secreción del antígeno, parecen ofrecer ciertas

ventajas desde el punto de vista inmunológico (Gentschev et al., 1998; Hess et al., 1996). Varias líneas de investigación han demostrado que los antígenos que son secretados pueden ser más inmunogénicos que su contraparte citoplásmica. Por ejemplo, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium que expresa y secreta el antígeno PspA de *Streptococcus pneumoniae*, fue capaz de inducir un incremento de 10^4 en los títulos de IgG con respecto a los niveles generados por la contraparte citoplásmica y periplásmica (Kang y Curtiss III, 2003). Para llevar a cabo tales fines, diversos estudios han recurrido al uso de los sistemas de secreción tipo I, III y V de las bacterias gramnegativas para secretar antígenos ó péptidos heterólogos. En estos trabajos, el gen que codifica para el antígeno foráneo se ha fusionado a genes que de manera natural están implicados en la secreción de factores de virulencia. Un ejemplo de ello es el empleo del sistema I de secreción: el de la Hemolisina A (*HlyA*) de *coli* uropatógena. En este caso, los antígenos heterólogos se insertan en una versión truncada de la *HlyA* y son secretados por el aparato secretor a nivel de membrana. Se han reportado más de una docena de antígenos foráneos que son secretados por este aparato de secreción. (Gentschev et al., 2002; Ryan et al., 1997). Por su parte, el sistema de secreción tipo III de *Salmonella* y *Yersinia spp.*, también ha sido explotado para la exposición y secreción de antígenos foráneos, evento conocido también como autoexposición (del inglés "autodisplay") (Evans et al., 2003; Gundel et al., 2003, Russmann et al., 1998; Angelakopoulos y Hofmann; 2000; Evans et al., 2003).

El sistema de secreción tipo V ó de autotransportador también ha sido ampliamente usado para mostrar ó translocar en la superficie bacteriana determinantes antigénicas, como parte de las estrategias de vacunación basadas en acarreadores bacterianos (Kramer et al., 2003). Este sistema de secreción, será explicado en detalle, puesto que es de interés para el presente trabajo.

Finalmente, cabe mencionar que existen otros métodos para mejorar la presentación del antígeno al sistema inmune y que incluyen las fusiones a la subunidad B de la toxina termolábil (*LTB*) de *E. coli* (Jagusztyn-Krynicka, et al.,

1993), la señal de exportación *MalE* (Kirschmann et al., 1995), inserción del antígeno en algunas proteínas de superficie como componentes flagelares de *Salmonella FliC* (Newton, et al., 1989) y la fimbrias P87 (Chen et al., 2000), LamB (Hayes et al., 1991), TolC (Spreng et al., 2003) y PhoE (Janssen y Tommansen, 1994) de *E. coli*.

El sistema de secreción tipo V (autotransportador)

En contraste con las bacterias grampositivas, las cuales poseen sólo una membrana celular, la envoltura de las bacterias gramnegativas está compuesta por dos membranas celulares: la interna y la externa. Esta doble envoltura representa un real desafío para el transporte y secreción de moléculas. De hecho, la capacidad que pueda tener una bacteria para infectar, depende en gran parte de la secreción de factores de virulencia proteicos, como adhesinas, toxinas, enzimas y mediadores de motilidad. Lo anterior implica la existencia de sistemas de secreción para que los factores de virulencia puedan ser dirigidos hacia sus células blanco dentro del huésped (Desvaux et al., 2004). A la fecha se han descrito cinco sistemas de secreción que permiten la secreción de proteínas solubles hacia la cara externa de las bacterias (Henderson et al., 2000; Salmond et al., 1993). Entre ellos, se encuentra el quinto sistema de secreción conocido como el de "Autotransportador" (AT), el cual se describió por primera vez, tomando como modelo de estudio, a la proteasa de IgA1 producida por *Neisseria gonorrhoeae* (Pohlner et al., 1987). Desde entonces, un gran número de proteínas han sido identificadas como AT.

Los autotransportadores (ATs) representan a un conjunto de proteínas secretadas en bacterias gramnegativas (Yen et al., 2002), que desde el punto de vista filogenético, está restringido al *phylum Proteobacteria* (Henderson y Lam, 2001), cuya estructura primaria es modular y compuesta por 3 dominios: la secuencia señal, el dominio pasajero y la unidad de translocación. (fig. 3).

En el extremo N-terminal se encuentra una secuencia señal que permite el tráfico de la proteína hacia la membrana interna, para su posterior exportación hacia el espacio periplásmico, sitio donde finalmente es cortada.

Por otra parte, el dominio pasajero confiere las diversas funciones efectoras de los AT. En el extremo C-terminal de la proteína, se encuentra la unidad de translocación que consiste en una región *linker* muy corta que posee una estructura secundaria α -hélice y un dominio β que adoptará una estructura secundaria de β -barril insertado en la membrana externa (Maurer et al., 1999; Renauild-Mongenie et al., 1996). Los autotransportadores son sintetizados en forma de pre-pro-proteína en el citoplasma bacteriano y son liberados en el periplasma en forma de pro-proteína. La translocación a través de la membrana externa finaliza la secreción del autotransportador del citoplasma al medio extracelular. Dependiendo del autotransportador, la pro-proteína puede ser cortada del dominio β -barril ó permanecer asociado a éste (Henderson et al., 1998; Henderson et al., 2000; Henderson et al., 2001 a; Henderson et al., 2001 b; Desvaux et al., 2004).

Algunos autotransportadores exhiben secuencias señales largas que consisten en 42-50 aminoácidos, e inician en el extremo N-terminal con el motivo MNKIYSLKY(S/C/H) seguido de un segundo motivo que contiene residuos hidrofóbicos y aromáticos conservados (i.e. GLIAVSELAR) (Henderson et al., 1998) lo cual, puede proporcionar características adicionales, tales como secreción a través de la membrana interna de una manera Sec-independiente (Fernández y Weiss, 1994) ó el reclutamiento de proteínas accesorias como la partícula de reconocimiento señal (*SRP*, por sus siglas en inglés), necesaria para llevar a cabo el plegamiento de proteínas por el sistema *Sec* de las bacterias gramnegativas (Desvaux et al., 2004).

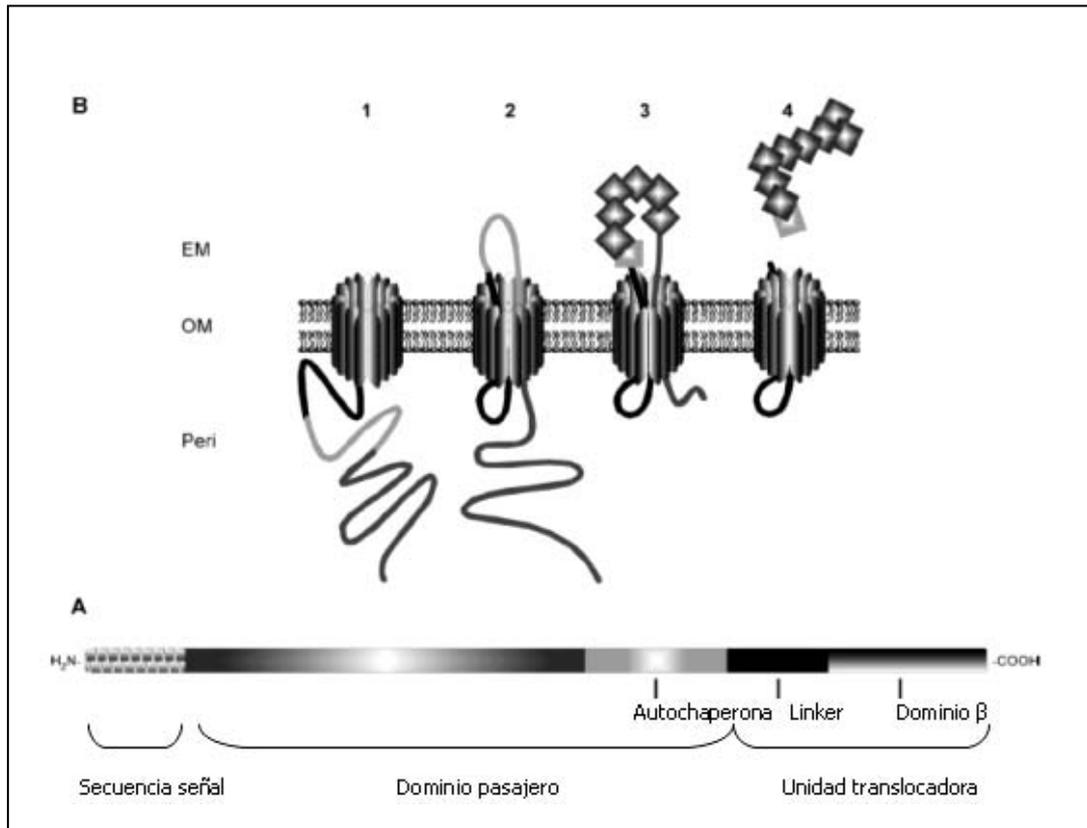


Figura 3. Sistema de secreción tipo V ó autotransportador (AT). (A) Estructura primaria del AT. Cada uno de los dominios principales implicados en la secreción es indicado. (B) Secreción del dominio pasajero a través de la membrana externa. Paso 1: inserción del dominio β en la membrana externa y formación del poro central común en el β-barril. Paso 2: La región linker dirige la secreción a través del poro. Paso 3: El dominio de autochaperona activa el plegamiento del dominio pasajero tan pronto como este emerge del β-barril. Paso 4: Una vez plegado el dominio pasajero, este es expuesto en la superficie de la bacteria y finalmente la molécula efectora se libera hacia el medio extracelular después de un corte proteolítico. Los cuadros representan la forma plegada ó madura del polipéptido. Peri: periplasma; EM: medio extracelular; OM: membrana externa. (Tomada de Desvaux, et al., 2004)

Por su parte, el dominio β de la mayoría de los autotransportadores contiene 250-300 residuos y exhibe 14 hojas anfipáticas y antiparalelas que consisten 9-12 residuos cada una (Loveless y Saier, 1997; Yen et al., 2002). Además la secuencia consenso (Y/V/I/F/W) X (F/W) localizada hacia el extremo C-terminal y que también se encuentra en las proteínas de membrana externa, parece ser necesaria para el correcto plegamiento y la estabilización del autotransportador. Durante la inserción del dominio β en la bicapa lipídica de la membrana externa, la primera y la última hoja β pueden formar puentes de hidrógeno en forma antiparalela permitiendo la formación del poro central del β-barril (Henderson et al., 1998). Además del β-barril, el cual permite la

translocación del dominio pasajero, la región *linker* localizada río arriba del dominio β , es esencial para la secreción. Estos 2 dominios en conjunto forman la unidad de translocación (Loveless y Saier, 1997; Oliver DC, 2003). Más que el dominio β , la unidad de translocación es una definición operacional apropiada para el dominio transportador. La región *linker* consiste de 21-39 aminoácidos de la región α -hélice que precede al dominio β y está probablemente implicada en la formación de una estructura tipo "harpina" que conduce a la secreción del dominio pasajero a través del canal formado por el β -barril (Henderson et al., 1998).

Para la gran mayoría de los autotransportadores, se ha propuesto un modelo estructural monomérico, pero para el caso de la proteasa de IgA1 (IgA1-P) el dominio pasajero es secretado a través de un poro central hidrofílico de 2 nm de diámetro y resultante de una estructura oligomérica que está constituida por un mínimo de 6 β -barriles (Veiga et al., 2002) la estructura exacta del anillo oligomérico aún está bajo investigación, ya que se especula que pudiera tratarse de 6-10 monómeros implicados.

Uno de los modelos que explican el mecanismo de secreción de los autotransportadores establece que la secreción es proceso a dos pasos, en el cual la inserción de la unidad translocadora en el extremo C-terminal ocurre en la membrana externa y así la translocación del dominio pasajero (no plegado) ocurre a través del poro central hidrofílico formado por un β -barril monomérico (Klauser et al., 1990, 1992, 1993a, 1993b). La secuencia señal es cortada por peptidasas inespecíficas a nivel de periplasma y reciclada. El plegamiento del dominio pasajero se lleva a cabo a nivel de periplasma, antes de pasar por la membrana externa (Veiga et al., 1999). Este modelo sigue siendo el más aceptado.

Por otra parte, el dominio pasajero puede tener diversas funciones que corresponden a la molécula secretada efectora (Henderson et al., 2001). A la fecha, todos los autotransportadores funcionalmente caracterizados han sido

implicados en funciones de virulencia ya sea por (i) mostrar actividad enzimática (proteasas, peptidasas, lipasas, esterases), (ii) mediar la motilidad bacteriana promovida por actina, ó por actuar como (iii) adhesinas, (iv) toxinas/citotoxinas, (v) proteínas inmunomoduladoras, o más recientemente demostrado (vi) permitiendo la maduración de otros factores de virulencia (Coutte et al., 2001; Henderson et al., 1998; Henderson y Nataro, 2001).

Además de las funciones de virulencia, algunas investigaciones han revelado la explotación del potencial biotecnológico del sistema de secreción tipo autotransportador; nombrado así por su capacidad de autoexponer proteínas heterólogas en la superficie bacteriana (Henderson et al., 2004); una característica ampliamente usada para: (i) la presentación de receptores ó ligandos para ensayos de purificación y de unión (Valls et al., 2000); (ii) expresión de librerías peptídicas para el mapeo de epitopos o ensayos de especificidad de anticuerpos (Konieczny et al., 2000); (iii) análisis funcional de dominios de proteínas heterólogas (Casali et al., 2002); (iv) bioconversión por expresión de actividad enzimática en la superficie bacteriana (Jose y Bernhardt, 2002) y (v) exposición de determinantes antigénicas para el desarrollo de vacunas (Kramer et al., 2003). Ejemplo de esto último es la expresión de epitopos funcionales de células T de *Yersinia* insertados en sitios permisivos de AIDA-I y expuestos en la superficie de *E. coli* (Konieczny et al., 2000). La misma forma recombinante de AIDA-I se produjo en *Salmonella enterica* atenuada viva con el objeto de hacer una vacuna, de tal forma que se observó una respuesta muy pronunciada de las células T contra el epítopo insertado, en un modelo animal de vacunación (Kramer et al., 2003).

Actualmente la lista de AT conocidos y bien caracterizados se está incrementando. Se conocen cerca de 60 proteínas que cumplen con las características propias de la familia de los de ATs (Henderson y Nataro, 2001; Desvaux et al., 2004). El análisis filogenético ha permitido clasificar a los AT en 11 grupos (fig. 4) (Henderson I, 2004).

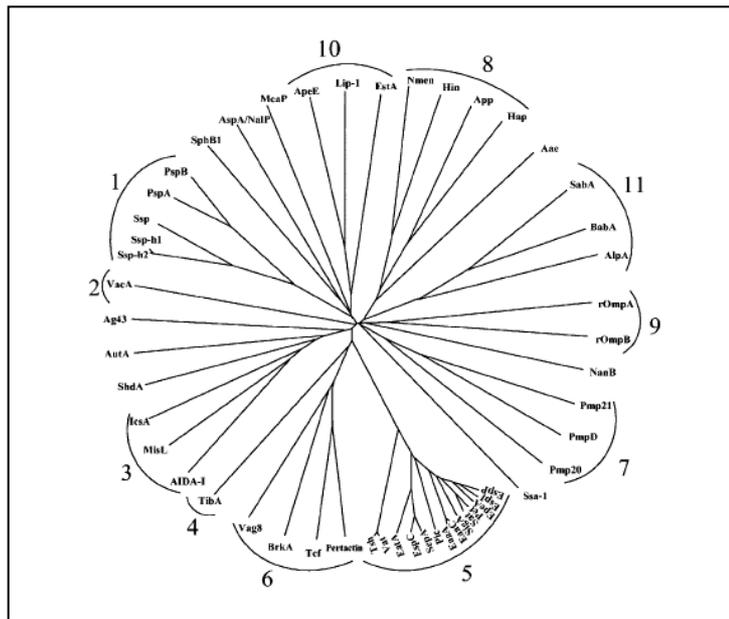


Figura 4. Árbol filogenético de los ATs que muestra a los 11 grupos. Elaborado a partir de los alineamientos correspondientes a cada uno de los dominios C-terminal. (Tomado de Henderson, et al., 2004).

El autotransportador ShdA

ShdA es el AT que se ha descrito más recientemente. Pertenece a los grupos 3 y 4 (ó familia de AIDA-I) (Henderson et al., 2004). Se describió como una proteína de membrana externa restringida a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, cuya estructura primaria reunía las características propias de la familia de los AT. El gen *shda* tiene un tamaño de 6831 pb y que está localizado en una isla de patogenicidad (PAI), lo que desde un principio sugirió que esta proteína podría tener un importante papel en la virulencia de *Salmonella* (Kingsley et al., 2000). El locus que contiene a *shda* está insertado en la región *xseA-yfgK* relacionada al cromosoma K-12 de *E. coli*. La secuencia de esta región, y aquellas que la flanquean, reveló la existencia de PAI de 25 kb, designada como CS54 la cual contiene además de *shda* (fig. 5), algunos otros genes que incluyen *ratA*, *ratB*, *sivI* y *sivH* (Kingsley et al., 2003).

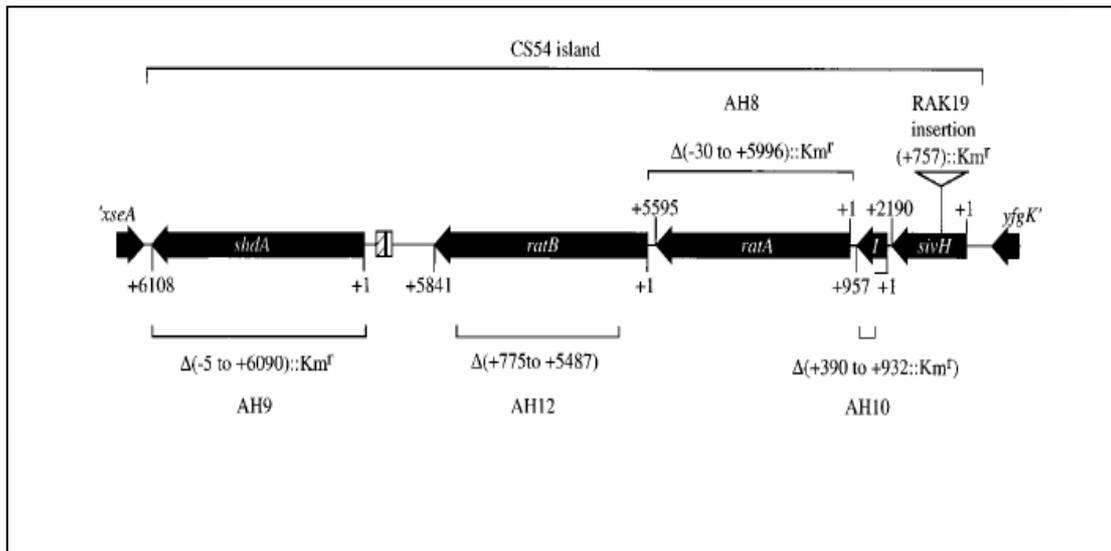


Figura 5. Marco de lectura abierto (ORF) de la isla de patogenicidad CS54 de *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* cepa ATCC 14028 que contiene al gen *shdA*. (Tomado de Kingsley et al. 2003).

Este AT posee un dominio C-terminal conformado por 447 residuos. La secuencia de esta región presentó homología con 440 residuos del dominio C-terminal de AIDA-I de *E. coli* lo que equivale a un 34% de identidad (Benz I, 1992). También presenta homología en un 36% con el AT MisL de *Salmonella* (Blanc-Potard et al., 1999; Ruiz-Pérez et al., 2002) y en un 30% con IcsA (VirG) de *Shigella flexneri* (Bernardini et al., 1989). Adicionalmente, el extremo C-terminal contiene 5 copias de un repetido de 12 aminoácidos, el cual no exhibió homología a secuencias disponibles en la base de datos. Contiene una secuencia señal atípica, similar a las encontradas en AIDA, MISL e IcsA, con un sitio de corte seguido de una alanina en posición 60: (LAMA/DNQV) (Kingsley et al., 2000) (fig. 6). El dominio N-terminal (dominio pasajero: aminoácidos 61-1553) no exhibió homología a las secuencias disponibles en el gene-bank, pero contiene 9 copias de repetidos de 63 aminoácidos y 3 copias de repetidos de 102 aminoácidos. (Kingsley et al., 2004).

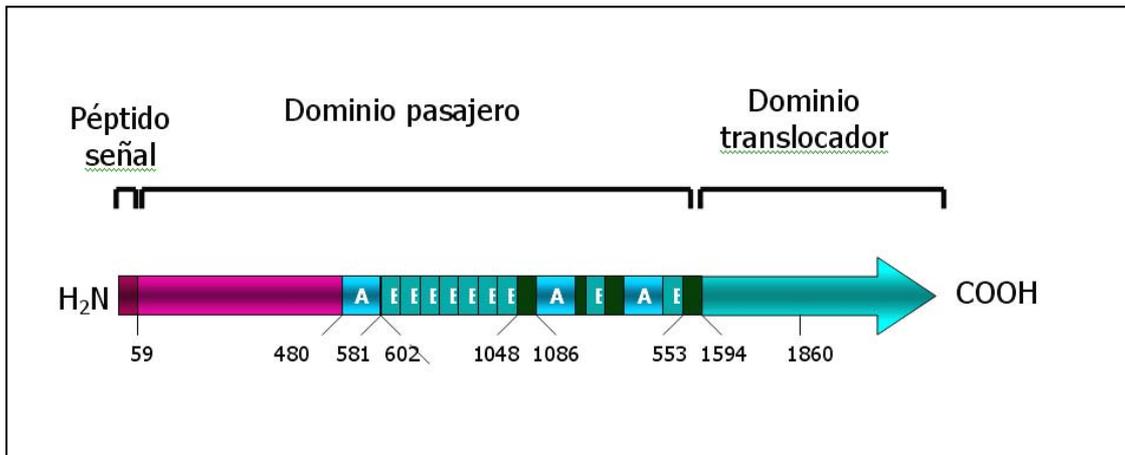


Figura 6. Estructura primaria de ShdA. Hacia el extremo amino se encuentra la secuencia señal, la cual es cortada por proteasas a nivel de periplasma. El dominio pasajero que es propiamente la proteína madura por secretar ó translocar hacia la superficie bacteriana y el dominio translocador que es la región con capacidad para insertarse en la membrana externa de la bacteria. Tomada de Kingsley et al., 2004.

ShdA sólo se expresa por aquellos serotipos de *Salmonella enterica subespecie 1* que están frecuentemente asociados con la infección en especies de sangre caliente. Por su parte, las subespecies II a VII de *Salmonella enterica* asociadas a la infección en reptiles carecen del gen *shdA* (Kingsley et al., 2000).

La inactivación mutacional del dominio pasajero de ShdA resulta en la eliminación de un bajo número de bacterias en las heces en un corto período de tiempo, de aquí el nombre de ShdA (de la palabra en inglés **shedding**, que significa eliminar). Por su parte, las bacterias mutantes en *shda* que fueron recuperadas en heces mostraron una reducción en la capacidad de colonizar el intestino grueso, un órgano que sirve como principal reservorio del serotipo luminal en modelo murino (Kingsley et al., 2003). El análisis inmunohistoquímico de la mucosa del intestino demuestra que el serovar *Typhimurium* coloniza la mucosa en el borde ciliado del epitelio y las áreas de erosión epitelial donde la matriz extracelular está expuesta al lumen intestinal (Kingsley et al., 2000). La fibronectina de la matriz extracelular es un receptor de ShdA (Kingsley et al., 2000). La unión formada por ambas proteínas es sensible a la heparina y ocurre entre el dominio pasajero de ShdA y el dominio Hep-2 de la fibronectina, vía interacción con al menos un residuo catiónico presente en la superficie del módulo repetido ¹³FnIII que también es

el sitio de unión del lipolisacárido de la heparina. Un hallazgo importante es que los anticuerpos antifibronectina no fueron capaces de abatir por completo la unión de ShdA, conduciendo a la posibilidad de que otros receptores también pueden jugar en la adherencia mediada por ShdA (Kingsley et al., 2002). Por otra parte, ShdA también se une a una segunda proteína de unión a heparina, el colágeno I, por un mecanismo sensible a heparina, sugiriendo que la actividad de unión de ShdA es una forma de mimetismo molecular de unión que usa la heparina (Kingsley et al., 2004a). Colectivamente, todos estos datos aportan la idea de que la unión a la matriz extracelular mediada por ShdA, puede ser un mecanismo de persistencia intestinal acarreado por el serovar *Typhimurium*. De hecho, anticuerpos monoclonales dirigidos en contra de uno de los epítomos (repetido **A3**) a nivel del dominio pasajero, inhibieron la unión de ShdA a la fibronectina. Esta región repetida A3, compuesta por 97 residuos parece ser la responsable directa de la unión a la fibronectina, de hecho es muy similar a las regiones repetidas identificadas en otras adhesinas, tales como AIDA-I, TibA y en el AT MisL. El hecho de que se encuentre repetida, sólo implica un aumento en la afinidad de unión a su ligando. Por otra parte, se conoce que la región no repetida de ShdA tiene una actividad de unión completamente independiente, lo cual sugiere la posibilidad de que esta región puede no ser necesaria para la secreción ó correcta presentación del dominio de unión al ligando (región repetida) en la superficie de la bacteria y de esta manera, solo ser requerida para facilitar la interacción con la fibronectina u otros ligandos durante las infecciones naturales (Kingsley et al., 2004b).

El uso de los ATs en el desarrollo de estrategias de vacunación basadas en acarreadores bacterianos vivos y atenuados ha sido recientemente explorado por nuestro grupo de investigación. Se ha demostrado la utilidad del autotransportador MisL para presentar en la superficie de *E. coli DH5a* y de *Salmonella entérica* serovar Typhimurium SL3261, el epítomo inmunodominante de células B NANP y la proteína circunsporozoítica (CSP) de la cual se deriva, ambos de *P. falciparum* (Ruíz-Pérez et al., 2002; Ruíz-Olvera et al., 2003). De manera similar, también se ha demostrado la utilidad de 3 formas recombinantes de ShdA para translocar hacia la superficie de *E. coli DH5a* y de

Salmonella entérica serovar Typhimurium SL3261 los antígenos NANP, CSP (de *P. falciparum*) (Pompa-Mera EN, 2002; Calderón-Corona JP, 2004; Osorio-León JF, 2004; Pompa-Mera et al., 2006 *en prensa*; y ESAT-6 de *M. tuberculosis* (datos no publicados). En resumen, estos estudios demuestran la gran utilidad del dominio translocador de ShdA para presentar péptidos y proteínas heterólogas en la superficie bacteriana. Aún queda por demostrar si la inmunización con los acarreadores bacterianos que producen la proteína de fusión que contiene a ShdA es capaz de inducir niveles de respuesta inmune humoral satisfactorios.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La triquinelosis es una zoonosis de amplia distribución mundial y que puede ser considerada emergente y reemergente, dependiendo de la localización geográfica. La mayoría de los fármacos con actividad antiparasitaria del tipo de los bencimidazoles son seguros, económicos y altamente efectivos contra el parásito, sin embargo, la alarmante y creciente resistencia a estos fármacos obliga a desarrollar otros métodos alternativos de control de esta enfermedad, particularmente en animales como el cerdo, cuya carne constituye la principal fuente de infección para humanos en nuestro país y en otras partes del mundo. Entre las estrategias de control, las vacunas tienen un papel central. Entre las vacunas actualmente disponibles se encuentran los acarreadores bacterianos como lo son algunas cepas atenuadas de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium SL3261. Estas han sido empleadas como vectores bacterianos para la expresión de antígenos heterólogos y han generado inmunidad protectora de tipo humoral y celular tanto a nivel sistémico como a nivel local contra infecciones bacterianas, virales y parasitarias. Por otra parte, existen varias evidencias que demuestran que la localización celular del antígeno heterólogo en el acarreador bacteriano es un factor muy importante que determina el tipo y la calidad de la respuesta inmune hacia dicho antígeno. Así, cuando un antígeno se expresa en los compartimentos subcelulares más externos (membrana interna, periplasma, membrana externa) o es secretado hacia el medio externo, la respuesta inducida será favorablemente del tipo humoral. Por otra parte, se ha demostrado que el péptido p43⁽²¹⁰⁻²³⁹⁾ de *T. spiralis*, se puede usar para inducir una respuesta inmune protectora a nivel intestinal en ratones, en contra del parásito. En este contexto, resulta atractivo el uso del AT ShdA para translocar péptidos heterólogos hacia la superficie bacteriana de *Salmonella*, ya que una de las ventajas de usar a ShdA como parte de un sistema de expresión en *Salmonella*, podría ser la inducción de una respuesta inmune en ratones en contra del antígeno p43⁽²¹⁰⁻²³⁹⁾ de la LM de *T. spiralis* y en contra del acarreador; cuyos componentes celulares sirven de inmunomoduladores. Además la respuesta inmune se llevaría a cabo en las

mucosas, incluyendo aquellas a nivel intestinal, las cuales son un sitio de tránsito natural para *T. spiralis*.

En base a esto, proponemos construir una cepa candidato a vacuna de *Salmonella entérica* serovar *typhimurium* SL3261 que exprese a p43⁽²¹⁰⁻²³⁹⁾ de *T. spiralis*, en la superficie bacteriana del acarreador mediante el autotransportador ShdA, capaz de generar inmunidad humoral protectora contra la LM en modelo murino de triquinelosis.

OBJETIVO GENERAL

Construir una cepa candidato a vacuna de *Salmonella entérica* serovar Typhimurium SL3261, que exprese un péptido de 30 aminoácidos derivado de la gp-43 kDa (p43⁽²¹⁰⁻²³⁹⁾) de *T. spiralis*, en la superficie bacteriana del acarreador mediante el AT ShdA, capaz de generar inmunidad humoral protectora contra la LM del parásito en modelo murino.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Construir un plásmido que garantice la expresión estable e inducible en condiciones microaerófilas *in vitro* e *in vivo* de p43⁽²¹⁰⁻²³⁹⁾ de *T. spiralis* en la superficie de *Salmonella entérica* serovar Typhimurium SL3261.
2. Producir la proteína de fusión que contenga a p43⁽²¹⁰⁻²³⁹⁾ y obtener el anticuerpo en contra de ésta, con la finalidad de analizar la inmunogenicidad de la forma recombinante así como la localización del epitopo p43⁽²¹⁰⁻²³⁹⁾ en el parásito.
3. Evaluar el nivel de protección a nivel intestinal en un modelo murino de triquinelosis generado por la inmunización con el acarreador bacteriano y el reto con la LM de *T. spiralis*.
4. Evaluar el tipo de respuesta humoral generada por el acarreador bacteriano, así como el tipo de respuesta generada por el epitopo p43⁽²¹⁰⁻²³⁹⁾.

MATERIAL Y MÉTODOS

I. Ingeniería genética

Cepas bacterianas:

Tabla 8. Cepas bacterianas empleadas en el presente trabajo.

Cepa	Genotipo	Referencia
<i>Escherichia coli DH5α</i>	SupE44 □ lac 169Φ 80lac Z□M 15hsd R17 recA1 endA1 gyrA 96 thi-1re1A1	Invitrogen®
<i>Salmonella enterica</i> serovar <i>Typhinurium</i> <i>SL3261</i>	Aro A :: Tn 10	Hoiseith SK, et al. 1981

Tabla 9. Oligonucleótidos empleados en el desarrollo del sistema de expresión.*Todos los oligonucleótidos fueron sintetizados por Invitrogen®.

NOMBRE	SECUENCIA	CARACTERÍSTICAS
Flag-1	5' <u>CT AGA</u> GAT TAC AAG GAT GAC GAC GAT AAG <u>GCT AGC ATG</u> <u>CAT G</u> 3'	Sentido. Contiene a la secuencia FLAG y los sitios de restricción <i>XbaI</i> , <i>NheI</i> , <i>Nsi I</i> y <i>BamH I</i> (subrayados)
Flag-2	5' <u>GA TCC ATG CAT GCT AGC</u> CTT ATC GTC GTC ATC CTT GTA ATC <u>I</u> 3'	Antisentido. Contiene a la secuencia FLAG y los sitios de restricción <i>XbaI</i> , <i>NheI</i> , <i>Nsi I</i> y <i>BamH I</i> (subrayados)
Linker-1	5' GCT AGG <u>ACT AGT GTC GAC</u> <u>CTC GAG</u> GAT TAC AAG GAT GAC GAC GAT AAG GCT 3'	Sentido. Contiene a los sitios de restricción <i>SpeI</i> , <i>Sal I</i> y <i>Xho I</i> (subrayados)
Linker-2	5' GCT AGG <u>ACT AGT AAG CTT</u> <u>TCT AGA</u> TCC GTG TGC ACA TAG AGA GGA TAG TAA 3'	Antisentido. Contiene a los sitios de restricción <i>SpeI</i> , <i>Hind III</i> y <i>Xba. I</i> (subrayados)
Triqui-1	5' CTC TAG <u>AAG CTT</u> CGC CTG GAG ATG TAT GGT TCG TTC CTG GCC AAG GTG ATG GTT GTG AAC ATG CGT ATT T 3'	Sentido. Contiene secuencia codificante del epitopo Ag30 y el sitio de restricción <i>Hind</i> <i>III</i> (subrayado)
Triqui-2	5' CGC CGC <u>CTC GAG</u> GAG CTC CGT GGT CTG CAG GGT ATT ATC AGT CAC CGC CCA AAT ACG CAT GTT CAC AAC C 3'	Antisentido. Contiene secuencia codificante del epitopo Ag30 y el sitio de restricción <i>Xho I</i> (subrayado)
PNIR-1	5' TTC AGG TAA ATT TGA TAC ATC AAA 3'	Sentido. Contiene al promotor <i>nirB</i> del gen de la enzima nitrato reductasa de <i>E. coli</i> .

Características de los plásmidos

Todos los plásmidos (a excepción de *puc19 CSP*) que a continuación se describen, tienen en común: el promotor de la enzima nitrato reductasa de *E. coli nirB* (inducible en anaerobiosis *in vitro* e *in vivo*), la secuencia señal **LTB** (que asegura el tráfico de la proteína de fusión hacia el periplasma) y el marcador de **selección de resistencia a la ampicilina** (Tabla 10). Los mapas de aquellos plásmidos generados en el presente trabajo se representan como parte de la figura 7.

Plásmido *pnirB LTB*. Únicamente contiene el promotor *nirB* y la secuencia señal LTB. No contiene péptido heterólogo y La proteína de fusión resultante es de sublocalización periplásmica.

Plásmido *pnirB LTB NANP β -ShdA*. Además de los elementos antes señalados, posee la secuencia que codifica para una proteína de fusión conformada por 4 repetidos del tetrapéptido NANP (Asparagina-Alanina-Asparagina-Prolina) y el dominio β translocador completo del autotransportador ShdA (277 aa) más 110 aminoácidos del dominio α . La proteína de fusión es de sublocalización tanto periplásmica como de superficie bacteriana.

Plásmido *pASM-A*. Contiene los mismos elementos mencionados en el plásmido anterior, salvo que la secuencia que codifica para el dominio α del AT ShdA, está constituida por 37 aa., dando un total de 314 aa. Esta forma acotada de ShdA también será referida como forma acotada A.

Plásmido *pnirB LTB NANP FLAG*. Contiene los elementos del plásmido *pnirBLTB*, río abajo de LTB se encuentra la secuencia que codifica para el tetrapéptido NANP, seguido por una secuencia que codifica para el péptido bandera FLAG, el cual es un octapéptido que permite la detección de todas las proteínas de fusión de interés. La proteína de fusión es de sublocalización periplásmica.

Plásmido *pFLAG ShdA-A*. Contiene los elementos señalados en el plásmido anterior, pero carece de la secuencia NANP. Río abajo de la secuencia

codificante de la bandera FLAG, este plásmido tiene subclonada una forma acotada del AT ShdA, designada como *A*, y que contiene 111 pb del dominio, 831 pb del dominio β , dando un total de 314 aminoácidos del dominio translocador del AT. ShdA-A se inserta en la membrana externa de la bacteria, mientras que la bandera FLAG es dirigida hacia la superficie bacteriana.

Plásmido *pENP-01*. Tiene como estructura base al plásmido *pnirBLTB*, río abajo de la LTB contiene un sitio múltiple de clonación artificial (LINKER) con 5 sitios de restricción para las enzimas *Xba I*, *Hind III*, *Spe I*, *Sal I* y *Xho I*; seguido por la secuencia codificante de FLAG y la forma acotada *A* de ShdA (ShdA-A). El destino final de la proteína de fusión es la superficie de la bacteria, toda vez que su secuencia nucleotídica sea subclonada en el linker y río arriba de FLAG.

Plásmido *pAg30*. Este plásmido es una modificación del plásmido *pENP-01*, la cual consiste en la subclonación del epitopo p43⁽²¹⁰⁻²³⁹⁾ de la LM de *T. spiralis* flanqueada los sitios HindIII y XhoI. La función de este vector de expresión, consiste en que una vez que la bacteria se encuentre en condiciones anaeróbicas ó microaerófilas, se induce *in vivo* la expresión de la proteína de fusión que contiene al epitopo p43⁽²¹⁰⁻²³⁹⁾. Puesto que la proteína de fusión también contiene al AT ShdA-A, se asegura así, que p43⁽²¹⁰⁻²³⁹⁾ se transloque hacia la superficie bacteriana.

Plásmido *pUC19 CSP*. Contiene a la secuencia que codifica para la proteína circunsporozoítica (CSP) de *Plasmodium falciparum*, cuya región central contiene 42 repetidos del tetrapéptido NANP. Esta proteína se encuentra bajo el control del promotor *lac* y la localización del producto en el acarreador bacteriano, es exclusivamente a nivel de citosol.

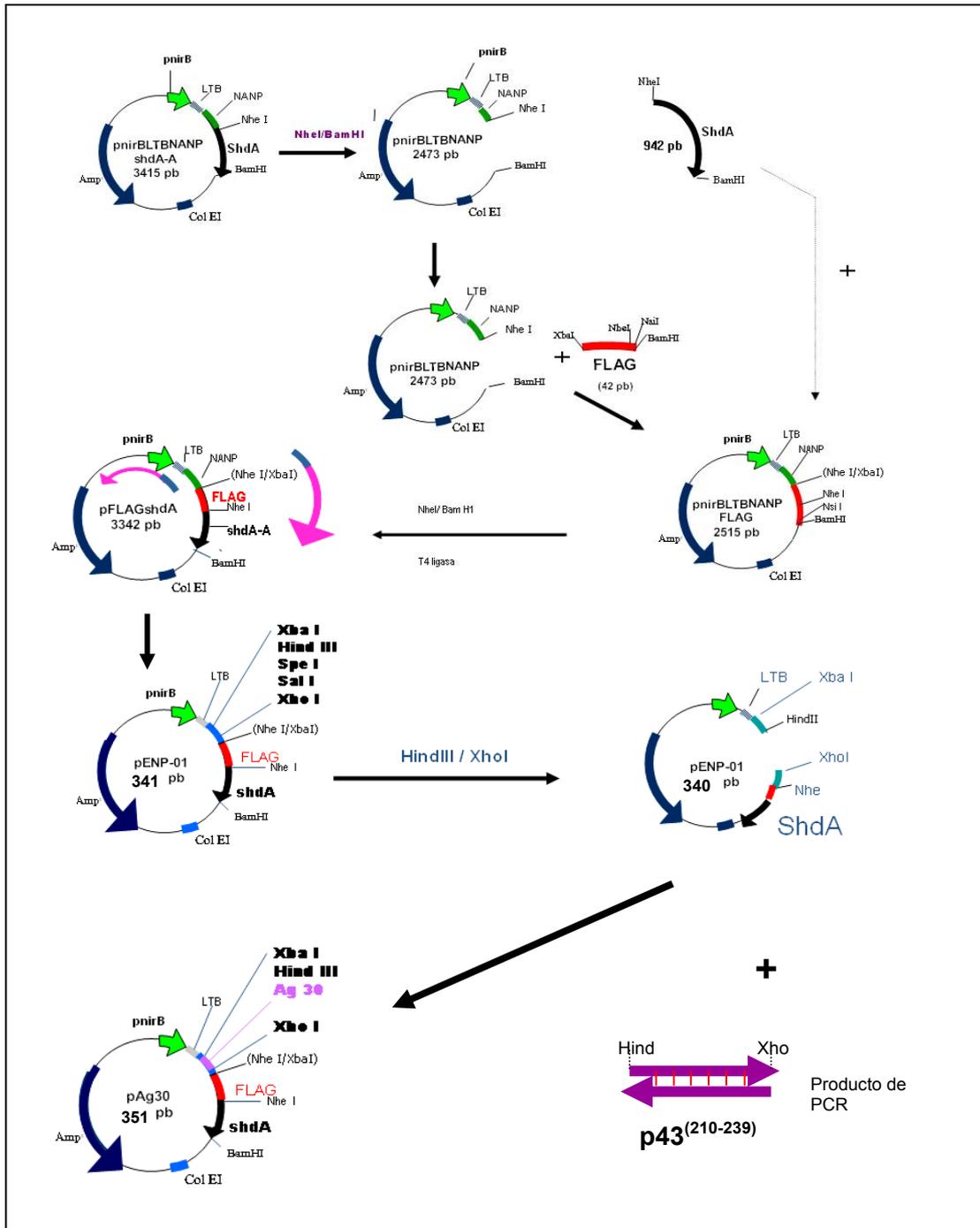


Figura 7. Estrategia general para la construcción de los plásmidos. A partir del plásmido *pnrB LTB NANP ShdA-A* (*pASM-A*) se genera el plásmido *pnrB LTB NANP FLAG*, retirando el gen de *ShdA* y subclonando el adaptador *FLAG*. Posteriormente el gen de *ShdA* se regresa y el plásmido resultante (*pFLAG ShdA*) es mutado por PCR para generar el plásmido *pENP*. Finalmente la secuencia *ag30* que codifica para *p43⁽²¹⁰⁻²³⁹⁾* que es subclonada en *pENP-01*, para generar el plásmido *pAg30*, el cual codifica para el epítipo de interés.

Tabla 10. Resumen de las características más relevantes de los plásmidos empleados en el presente trabajo.

Plásmido	Gen o secuencia codificada	Tamaño (pb)	Referencia
p <i>nirB</i> LTB	Promotor <i>nirB</i> y secuencia señal de la <i>LTB</i>	2425	Ruíz-Pérez F, et. al., 2002
p <i>nirB</i> LTB NANP β - <i>ShdA</i>	Fusión LTB-epitopo (NANP) ₄ -dominios α y β del AT <i>ShdA</i>	3880	Ruíz-Pérez F, et. al. 2006. <i>En prensa</i>
pUC19 CSP	CSP de <i>P. falciparum</i>	3686	González-Bonilla C., et al., 1994.
pASM-A	Fusión LTB-epitopo (NANP) ₄ -forma acotada A del AT <i>ShdA</i> (<i>ShdA-A</i>)	3463	Ruíz-Pérez F, et. al. 2006. <i>En prensa</i>
p <i>nirB</i> LTB NANP FLAG	Fusión LTB-(NANP) ₄ -FLAG	2515	Este trabajo
pFLAG- <i>ShdA-A</i>	Fusión LTB -(NANP) ₄ -FLAG- <i>ShdA-A</i>	3342	Este trabajo
pENP-01	Fusión LTB –LINKER- FLAG- <i>ShdA-A</i>	3450	Este trabajo
pAg30	Fusión LTB –LINKER- FLAG- <i>ShdA-A</i> - p43 ⁽²¹⁰⁻²³⁹⁾	3546	Este trabajo

Técnicas de DNA recombinante

La preparación de las cepas bacterianas, la manipulación genética, así como las técnicas de biología molecular, como obtención y preparación del DNA, PCR, electroporación, transformación con los plásmidos, se realizaron de acuerdo a los protocolos de Sambrook (Sambrook, 2001) y de acuerdo a las indicaciones de los *kits* comerciales empleados en la extracción y purificación de DNA plasmídico (Plasmid Midi purification QIAGEN[®]) y QIAquick Gel Extraction Kit QIAGEN[®] para la purificación de los productos de digestión enzimática. Por su parte, todas las enzimas de restricción utilizadas fueron de *New England Biolabs*[®], mientras que los oligonucleótidos fueron sintetizados por INVITROGEN[®].

Estrategia general para la construcción de cada uno de los plásmidos

Se tomó como punto de partida al plásmido *pASM-A*, el cual fue digerido con las enzimas de restricción *BamHI* y *NheI* con la finalidad de retirar temporalmente la región codificante del AT *ShdA-A* (fragmento de 942 pb, el

cual se reserva para ser usado más adelante). Posteriormente se ligó el plásmido abierto resultante (2.7 kb) con el fragmento codificante de FLAG (36 pb) (amablemente donado por el Dr. Rosendo Luria), empleando 15 U de T4 DNA ligasa. El plásmido resultante (*pnirB LTB NANP FLAG*) se transformó en *E. coli DH5a* por choque térmico. La selección de clonas positivas se realizó mediante la extracción de plásmido por la técnica de miniprep (Sambrook, 2001) y se analizó el patrón de restricción con la enzima *Nsi I*, un sitio nuevo incorporado al plásmido obtenido. Una vez confirmada la entrada de la secuencia FLAG, el plásmido *pnirB LTB NANP FLAG* se digirió con las enzimas *Nhe I* y *BamH I* para generar extremos cohesivos que permitan la inserción de la secuencia que codifica para ShdA-A, con la subsecuente pérdida del sitio *Nsi I*. El plásmido resultante *pFLAG NANP ShdA-A*, nuevamente se transformó en *E. coli DH 5a* y se seleccionaron las clonas positivas por análisis de restricción utilizando la enzima *Nsi I*, ya que la pérdida de este sitio sugiere la posibilidad de clonas positivas. Para generar el vector de clonación *pENP-01* a partir del plásmido *pFLAG NANP ShdA-A*, se procedió a realizar una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (véase condiciones más adelante) con la finalidad de mutar la región que codifica para NANP y sustituirla por una región linker que contenga los sitios de restricción *Xba I*, *Hind III*, *Spe I*, *Sal I*, *Xho I* que permitan la posterior clonación de secuencias que codifiquen para epitopos de interés. Una vez seleccionadas las clonas positivas, se procedió a realizar una doble digestión del plásmido *pENP-01*, con las enzimas *Hind III* y *Xho I*. El plásmido abierto *pENP-01*, se ligó con la secuencia codificante del epitopo Ag30 (véase más adelante) en presencia de T4 DNA ligasa. Finalmente, el plásmido resultante *pAg30* se analizó con las enzimas de restricción *Xba I*, *Hind III*, *Spe I*, *Sal I* y *Xho I*. Se consideraron clonas positivas todas aquellas clonas que perdieron los sitios *Spe I* y *Sal I* e incrementaron su tamaño en 108 pb. La estrategia de clonación se representa en la figura 7.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la obtención de pENP-01

Se preparó una reacción a un volumen final de 30 μ L y que contenía 7.8 ng de DNA templado (plásmido *pFLAG ShdA-A*), amortiguador de amplificación

(Tris-HCl/KCl), $MgCl_2$ 1.5mM, mezcla de los 4 desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTP's) 2mM, 20 picomoles de cada uno de los oligonucleótidos LINKER-1 y LINKER-2, agua destilada estéril y 2.5 U de *Taq polimerasa platinun* (Accesolab[®]). La reacción se llevó a cabo en un termociclador *Eppendorf Mastercycler gradient*[®]. El programa de temperaturas usado incluyó un ciclo de desnaturalización previa a 94°C por 5 minutos, 30 ciclos de desnaturalización (94°C por 15 segundos), alineamiento (58°C por 2 minutos) y extensión (72°C por 5 minutos), seguidos de un ciclo de extensión final de 72°C por 10 minutos. El producto de la amplificación se separó por electroforesis en geles de agarosa al 1%, teñidos con 1µL de bromuro de etidio (10mg/mL) y se analizó en un Equipo analizador de imágenes Kodak[®] ID 3.6 adaptado a una cámara digital EDAS 290. Se incluyó un marcador de tamaños moleculares de 1 kb para verificar el peso del producto.

Generación de la secuencia codificante del péptido p43⁽²¹⁰⁻²³⁹⁾

La generación de la secuencia Ag30 se llevó a cabo mediante una PCR por acoplamiento en ausencia de templado. Se preparó una reacción en un volumen final de 30 µL y que contenía 20 picomoles de cada uno de los oligonucleótidos Triqui-1 y Triqui-2, amortiguador de amplificación (Tris-HCl/KCl), $MgCl_2$ 1.5mM, mezcla de los 4 desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTP's) 2mM, agua destilada estéril y 2.5 U de *Taq polimerasa platinun* (Accesolab[®]). La reacción se llevó a cabo en un termociclador *Eppendorf Mastercycler gradient*[®]. Se realizó un gradiente de temperaturas, cuyo rango comprendió de 65.9 a 77°C. Una vez establecida la T_m óptima, el programa de temperaturas usado incluyó un ciclo de desnaturalización previa a 94°C por 3 minutos, 30 ciclos de desnaturalización (94°C por 15 segundos), alineamiento (77°C por 1 minuto) y extensión (72°C por 1 minuto), seguidos de un ciclo de extensión final de 72°C por 10 minutos. El producto de la amplificación se analizó por electroforesis en geles de agarosa al 2.5%, teñidos con 1µL de bromuro de etidio (10 mg/mL) y se analizó al igual que el plásmido *pENP-01*. Se incluyó un marcador de tamaños moleculares de 100 pb Invitrogen[®] para verificar el peso del producto. Posteriormente 600 ng de este producto se

cortaron con 40 U de las enzimas *Hind III* y *Xho I*. Previo al siguiente paso, en todos los casos se realiza una purificación por columna Gene-clean Qiagen®.

Secuenciación automatizada de los plásmidos pENP-01 y pAg30

En este proceso, se realizó una reacción adicional de PCR en la que se utilizó el *kit Big Dye terminator* (Applied Biosystems®) y plásmido pAg30 como templado (purificado por la técnica de Midiprep). La reacción se realizó preparando un volumen de 30 µL el cual contenía 10 ng de plásmido pAg30, 4 µL de la solución *kit Big Dye terminator*, 20 pmoles de oligonucleótido PNIR-1 y la cantidad necesaria de agua destilada estéril libre de DNAasa para completar 20 µL de volumen. El programa de amplificación incluyó: desnaturalización a 97°C por 30 segundos, alineamiento a 56°C por 15 segundos y extensión a 60°C por 4 minutos. El producto de amplificación se purificó en una columna *Centrisep*®. El producto de amplificación recuperado se resuspendió en 25 µL de amortiguador de carga TSR (Applied Biosystems®) y se desnaturalizó a 95°C durante 5 minutos. Finalmente, la muestra se colocó en el secuenciador automatizado Genetic Analyzer 310 de Applied Biosystems®, y se inició el análisis siguiendo las indicaciones del equipo.

Electroporación de Salmonella entérica serovar Typhimurium SL3261

Los plásmidos *pENP-01* y *pAg30* generados primero en *E. coli DH5a*, se introdujeron en bacterias electrocompetentes de la cepa *Salmonella entérica* serovar Typhimurium SL3261 mediante electroporación. Se partió de un cultivo bacteriano de 250 mL con una D.O.= 1 el cual se centrifugó a 3000 x g y se cosechó hasta obtener una pastilla bacteriana, la cual se lavó 3 veces con agua desionizada estéril bajo condiciones de esterilidad y en frío. La pastilla final se resuspendió en 2 mL de solución de agua desionizada-glicerol 20% y se prepararon alícuotas de 100 µL en viales de 500 µL c/u, los cuales se congelaron a -70°C hasta su uso. Para la electroporación, se procedió a descongelar los viales anteriores en hielo a 4°C por 30 minutos. Al término de este tiempo se adicionaron 0.1 µg de cada uno de los plásmidos de interés y se colocó la mezcla en una celda para electroporar colocada en el equipo *Equibio*

Easyject Plus[®] con las condiciones: r=2500; c=0025; nr R= 0201: T= 0005. Posteriormente a mezcla se sometió a un pulso eléctrico e inmediatamente las bacterias se depositaron en 2 mL de medio SOC (0.5 % de extracto de levadura, 2% de triptona, NaCl 10 mM, KCl 2.5 mM, MgCl 10 mM, MgSO₄ 20 mM, glucosa 20 mM) y se incubaron 1 hora a 37°C en un agitador orbital (Orbit Lab-line Environ-Shaker[®]) a 200 rpm. Finalmente las bacterias se sembraron en placas de BHI agar suplementado con 2 μ L de 2,3-ácido dihidroxibenzoico (DHB) (Sigma[®]) y 3 μ L de ampicilina (Sigma[®]) por cada mL de medio de cultivo.

Curvas de crecimiento

Se llevaron a cabo curvas de crecimiento de las cepas bacterianas de *Salmonella spp*, transformadas con los diferentes plásmidos con la finalidad de ver su efecto sobre la viabilidad. Para ello, se cultivaron las cepas en 250 mL de medio tioglicolato (suplementado con 100 μ g de ampicilina y DHB 0.01%) a 37°C en un agitador orbital (Orbit Lab-line Environ-Shaker[®]) a 200 rpm. Se tomaron muestras de 1 mL a los tiempos 0, 2, 4, 5, 6, 10, 15 y 24 horas. Se midió la densidad óptica (DO) a 540 nm. La cepa de *Salmonella entérica* serovar Typhimurium SL3261 sin plásmido se creció únicamente en medio en presencia de DHB 0.01%.

II. Evaluación de la expresión de la proteína de fusión

Inducción en condiciones microaerofílicas in vitro

Se cultivaron las cepas de *E. coli DH5a* y *Salmonella entérica* serovar Typhimurium SL3261 con los distintos plásmidos en condiciones microaerofílicas *in vitro*. Para ello, se tomó una asada en condiciones de esterilidad, y se inocularon las cepas en 45 mL de medio líquido tioglicolato suplementado con 135 μ L de ampicilina y 90 μ L de DHB al 0.01%, de acuerdo con lo descrito por Ruiz-Olvera y colaboradores (2003). Los cultivos se incubaron a 37°C con agitación constante en un aparato Orbit Lab-line Environ-Shaker[®] hasta lograr un crecimiento bacteriano con densidad óptica DO_{540 nm} de 1.0 (aproximadamente 5-6 horas de incubación). Este cultivo se utilizó para los

ensayos de SDS-PAGE, Western-blot, inmunofluorescencia indirecta y citometría de flujo.

Extracción de proteínas totales

A partir de un cultivo inducido, se tomó una alícuota de 1 mL (equivalente a 1×10^9 UFC/mL), se cosechó la pastilla bacteriana en una microcentrífuga (modelo ALC 4214) a $2000 \times g$ T°C ambiente. Se descartó el sobrenadante y el botón bacteriano se lavó 4 veces con 1.5 mL de solución salina isotónica (SSI) estéril. La pastilla bacteriana final se resuspendió con 50 μ L de agua destilada y se adicionó 50 μ L de solución amortiguadora-muestra (SDS 25%, Glicerol 25%, Tris-base 200mM, Azul de bromofenol 0.025%) para proteínas. Las muestras se desnaturalizaron por ebullición durante 10 minutos, se dejaron enfriar, se pasaron por jeringa Hamilton a fin de homogenizar. Se tomó una alícuota de 3 μ L para cuantificar según el método de Bradford.

Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida en condiciones reductoras (SDS-PAGE)

Las proteínas se ajustaron a una concentración de 30 μ g/mL y se separaron en un gel de poliacrilamida al 12.5% (para ver expresión) en condiciones reductoras según el método de Laemmli (Laemmli, 1970). La separación se llevó a cabo en una cámara de electroforesis vertical BioRad® (modelo Mini-Protean 3 Cell). Se utilizó solución amortiguadora de corrimiento Tris-Glicina (Tris base 25mM, glicina 250 mM, SDS 0.01%, pH 8.3) y las condiciones del corrimiento fueron a 35 mA por una hora. Este gel se transfirió a una membrana de nitrocelulosa (véase más adelante). De manera paralela se corrió otro gel bajo las condiciones antes señaladas, el cual se fijó por 3 horas con solución metanol, ac. Acético y agua (proporción 45:10:45), posteriormente las bandas de las proteínas totales se tiñeron con azul de Coomassie por 30 min y se decoloró con solución decolorante (metanol: ac. acético: agua, 30:10:60) hasta obtener una visualización nítida ó clara de las bandas de las proteínas. Finalmente el gel de poliacrilamida se secó en medio de una membrana (Gel drying Promega®) que se encuentra en un soporte de acrílico.

Western-blot ó Inmunoelectrotransferencia (IET)

Las proteínas separadas por SDS-PAGE, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa ó de nylon cargada positivamente (Boehringer-Mannheim[®]), usando una cámara vertical de transferencia (BioRad[®] Mini Trans-Blot Cell 2005). La transferencia fue llevada a cabo a 150 V por una hora, a 4°C. Posteriormente, la membrana fue bloqueada con PBS-leche al 5% toda la noche. Al día siguiente se lavó con 10 mL de PBS 1X y se incubó durante toda la noche con 5mL del anticuerpo monoclonal (Ac Mo) anti-FLAG biotinilado Sigma-Aldrich[®] en dilución 1:250. Tanto la solución de bloqueo, como la del primer anticuerpo, fueron suplementados con azida de sodio a una concentración final de 0.05%, a fin de evitar contaminación. Al día siguiente, se realizaron tres lavados de 5 minutos con 10 mL con PBS 1X. Se adicionaron 5 mL de Streptavidina conjugada con peroxidasa de rábano (HRP) diluído 1:500. Se incubó durante 2 horas. Nuevamente se realizaron tres lavados con PBS 1X de 10 mL y con una duración de 5 minutos cada uno. Todas las incubaciones y los lavados se realizaron en un horno de hibridación Amersham Pharmacia Biotech[®], a temperatura ambiente (TA) y a 25 rpm. Finalmente para revelar la membrana, ésta se puso en contacto con una mezcla de 50 mL de PBS (pH 7.4), 30 mg de 4-cloro-1-naftol disuelto en 10 mL de metanol y 100 µL de peróxido de hidrógeno; durante 10-20 segundos. Al final la reacción se detuvo con agua destilada ó PBS (pH 7.4).

Citometría de flujo

Se cultivaron las cepas bajo las condiciones microaerófilicas anteriormente descritas hasta lograr una $D.O_{540\text{ nm}}$ de 1.0. Se tomó una alícuota equivalente a 1×10^6 bacterias y se depositó en tubo eppendorf de 1.5 mL, la cual se lavó tres veces con PBS 1X estéril, centrifugando a 2000 x g en cada caso, eliminando el sobrenadante. El botón bacteriano se resuspendió en 60 µL de Ac Mo Anti-FLAG biotinilado (dilución 1:50). Se incubó durante 90 min a 37°C con agitación constante de 250 rpm en un aparato Master mixer eppendorf[®]. Transcurrido este tiempo, las bacterias se centrifugaron a 2000 x g y se lavaron dos veces con 1.5 mL de PBS 1X estéril. El botón bacteriano se

resuspendió con 60 μ L de anticuerpo secundario anti-IgG de ratón (hecho en cabra) conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Zymed[®]) en una dilución 1:100. Se incubó a 37°C con agitación y en la oscuridad por 30 minutos. Se centrifugó a 2000 x g y el botón bacteriano se lavó dos veces con PBS para retirar el exceso de anticuerpo secundario sin reaccionar. Al final el botón bacteriano se resuspendió en 500 μ L de PBS 1X. Finalmente se analizaron las muestras en un equipo de Citometría de flujo Becton-Dickinson, utilizando el Software CELLQuest^R.

Inmunofluorescencia indirecta (IIF) de Salmonella entérica serovar Typhimurium SL3261

A partir del cultivo bacteriano para citometría de flujo, se tomó una alícuota equivalente a 1×10^8 bacterias y se depositó en tubo eppendorf de 1.5 mL y se centrifugó a 2000 x g para recuperar el botón bacteriano. Este último se lavó tres veces con PBS 1X estéril, centrifugando a 2000 x g en cada caso. El botón bacteriano resultante se resuspendió en 60 μ L de Ac Mo anti-FLAG biotinilado dilución 1:50 y se incubó durante 1 hora a 37°C con agitación constante. Se lavaron las bacterias dos veces con 1.5 mL de PBS 1X estéril, centrifugando a 2000 x g en cada caso. El botón bacteriano, se resuspendió con 60 μ L de anticuerpo secundario streptavidina-FITC (ZYMED[®]), a una dilución 1:100 y se incubó a 37°C en agitación y en la oscuridad. Al término de este tiempo las bacterias se centrifugaron a 2000 x g y el botón bacteriano se lavó dos veces con PBS 1X para retirar el exceso de streptavidina sin reaccionar. Al final el botón bacteriano se resuspendió en 500 μ L de PBS, se realizaron frotis en portaobjetos y se les añadió 0.5 μ L de vecta-shield[®] antes de ser analizadas en microscopio de epifluorescencia Olympus BX40 .

Preservación del ciclo de vida del parásito

Ratas machos de la cepa *Sprague Dawley* fueron infectadas con 3000 LM respectivamente por vía oral con ayuda de una sonda gástrica. Los animales se mantuvieron bajo condiciones estándar de bioterio (25°C, 12 horas luz

alternados con 12 horas oscuridad y alimentación *ad libitum*) durante un mínimo de 21 días, tiempo en el cual se completa el ciclo de vida del parásito.

Obtención de larva muscular (LM)

Las LM de *T. spiralis* se obtuvieron de acuerdo a lo descrito previamente por Denis y colaboradores (1970). Los ratones de la cepa BALB/c fueron sacrificados al día 21 post-infección. Posteriormente, los animales fueron despojados de piel, cabeza, cola, vísceras, extremidades, dejándose únicamente el músculo esquelético y diafragma. El músculo esquelético se cortó en pequeños pedazos y se sometieron a digestión artificial con solución de pepsina al 1% (p/v) y con HCl 1% (p/v) en agua destilada, durante 3 horas a 37°C. El producto de digestión se pasó a través de un tamiz de acero inoxidable y se depositó en un aparato de Bearman modificado con una gasa estéril como tamiz. Las LM se dejaron sedimentar durante 20 min. Las LM sedimentadas se lavaron 3 veces con PBS (pH 7.4), tratando de eliminar la mayor cantidad de restos de tejido muscular. Las larvas se recuperaron y se diluyeron 1:10 en PBS. Se procedió a contarlas LM presentes en unas 5 gotas de 5µL y se obtuvo el promedio de todas éstas.

Evaluación de la inmunogenicidad de la proteína de fusión

Obtención del suero anti-proteínas de fusión

El epítipo p43⁽²¹⁰⁻²³⁹⁾ recombinante y la proteína de fusión codificada por el plásmido producido por *E. coli DH5α*, se purificó a partir de geles preparativos de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 10%. Una vez evidenciada la banda de interés, se cortó y se homogenizó con un volumen mínimo de PBS estéril, y se inmunizó de acuerdo con el procedimiento descrito por Igarashi y colaboradores (2000). Ratones machos de la cepa BALB/c de 10 semanas de edad (pesos 25-30g) se inmunizaron por vía i.p., con la solución que contiene la proteína de fusión mezclada 1:1 con adyuvante, en un volumen de 100 µL. Se usó adyuvante completo de Freund para la primera inmunización y adyuvante incompleto de Freund para las siguientes 2 inmunizaciones; todas llevadas a

cabo a intervalos de 1 semana. Se colectaron muestras de sangre, del plexo retro-orbital empleando capilares heparinizados, tanto antes de la inmunización, como al final de la última inmunización. Se separó el suero de la fracción celular por centrifugación a 1500 x g y se congeló a -80°C hasta su uso.

Reconocimiento del epítipo p43⁽²¹⁰⁻²³⁹⁾ nativo en la superficie de la LM de T. spiralis, por los sueros anti-proteínas de fusión

Se fijaron 300 LM completas de *T. spiralis* con solución de paraformaldehído al 4% (en PBS, pH 7.4) durante 30 minutos, en un microtubo de 1.5 mL. Se realizaron 6 lavados con 1mL de PBS (pH 7.4), centrifugando a 1000 x g en cada caso y eliminando el sobrenadante. Los sueros dirigidos contra las proteínas de fusión de interés, se adsorbieron durante 4 h con *E. coli DH5a* y se incubaron toda la noche (a 37°C) con las LM en un aparato Master mixer eppendorf®, en diluciones 1:50. Como control positivo se utilizó suero inmune de ratón (de 28 días de infección con *T. spiralis*) y suero preinmune como control negativo; ambos diluidos 1:50 en PBS estéril (pH 7.4). Al día siguiente se retiró el suero y las LM nuevamente se lavaron 6 veces y se incubaron con 600 µL de anticuerpo anti-IgG de ratón acoplado con FITC (Zymed®) en dilución 1:100. Las LM se incubaron en la oscuridad durante 90 minutos y a 37°C en agitación constante. Las LM se lavaron 4 veces con PBS, y se resuspendieron en un volumen final de 500 µL con PBS. Se tomó una alícuota de 20 µL, la cual fue depositada en un portaobjetos con 1 µL de Vecta-shield® para finalmente analizarla al microscopio de epifluorescencia Olympus BX40.

Reconocimiento del epítipo p43⁽²¹⁰⁻²³⁹⁾ nativo a nivel de estructuras internas del parásito, por los sueros de ratones inmunizados con proteínas de fusión

Se congelaron 2000 LM en nitrógeno líquido a -70°C, empleando 1.5 mL de tissue-tek®. Se realizaron criosecciones de 5 µm a -20°C (Microm® HM520), las cuales fueron depositadas en portaobjetos electrocargados de 25 x 75 x 1.0

mm. (Fisherbrand colorfrost⁺⁺/Plus, Fisher Scientific[®]). Los cortes se lavaron durante 3 minutos con agua destilada y se prefijaron con acetona al 80% (diluída en etanol absoluto) por un minuto a 4°C. Posteriormente se realizó una segunda fijación con solución de paraformaldehído al 4%. Se lavaron los cortes 2 veces con PBS por 3 minutos. Estas criosecciones se incubaron en una cámara húmeda durante 2 horas a 37°C, con los sueros dirigidos contra las proteínas de fusión (previamente adsorbidos) diluídos 1:10, 1:50. Los controles empleados en esta parte, fueron los mismos señalados en el ensayo para LM completa. Se retiró el suero y se realizaron 4 lavados con PBS. Posteriormente, se incubó con anticuerpo con 50 µL de anticuerpo anti-IgG de ratón acoplado con FITC (Zymed[®]) en dilución 1:100. Las LM se incubaron en la oscuridad por 90 minutos a 37°C y en agitación de 300 rpm. Finalmente para observar los cortes al microscopio de fluorescencia modelo Zeiss Axios Kop 2 MOT, éstos se lavaron 4 veces y se adicionaron 20 µL de PBS con 1 µL de Vecta-shield[®] antes de sellar con el cubreobjetos.

III. Ensayos de protección

Inmunización con acarreador bacteriano y reto con el parásito

Grupos de ratones machos BALB/c de 7-8 semanas de edad, se inmunizaron con 10⁹ UFC de *Salmonella* recombinante inducida, recuperada en la fase logarítmica de crecimiento. La figura 8 muestra el esquema de inmunización, y como se alternaron las tomas de muestra sanguíneas con las inmunizaciones con el acarreador y en qué momento se procedió a retar con el parásito. Los animales se inmunizaron intranasalmente aplicando 20 µL de la carga

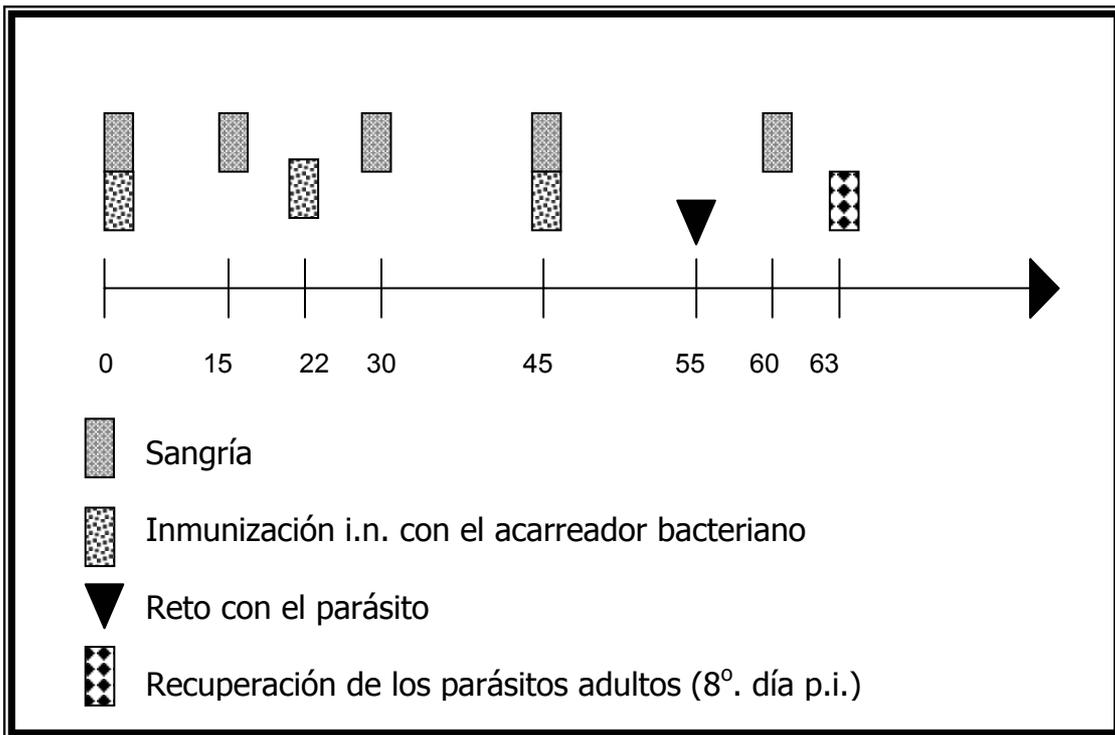


Figura 8. Esquema de inmunización empleado en el presente trabajo. Se realizó una sangría previa a la primera inmunización el mismo día. Posteriormente, cada inmunización se realizó cada 3 semanas, mientras que la obtención del suero inmune se realizó cada 15 días hasta el día 60. Al día 55 se procedió a retar con el parásito (10 días después de la última inmunización). Finalmente, los parásitos adultos, se recuperaron al día 8 p.i. (63 días después de haber iniciado el esquema). Los animales se inmunizaron vía i.n. con 10^9 UFC.

bacteriana, en cada fosa nasal, en 3 ocasiones, espaciadas por 3 semanas. Durante todo el esquema de inmunización, los animales recibieron por vía oral ampicilina en el agua a una concentración de 0.6 mg/mL. Se colectaron muestras de sangre del plexo retro-orbital a los días 0, 15, 30 y 45 y se obtuvo el suero, el cual fue almacenado en microtubos de 500 μ L y congelado a -80°C . Antes de iniciar el esquema de inmunización, se colectó también suero preinmune. Diez días después de la última inmunización se procedió a retar/infectar a los animales con una carga parasitaria de 300 LM de *T. spiralis* vía i.g. Los parásitos adultos fueron recuperados de acuerdo al procedimiento descrito por Dennis y colaboradores (1970), con algunas modificaciones. Brevemente, 24 h antes de la obtención de los parásitos adultos, se retiró por completo el alimento a los animales. Los ratones fueron sacrificados al octavo día post-infección (8 p.i.). Posteriormente, la zona abdominal se limpió con etanol al 70% y se procedió a realizar una incisión longitudinal en esta región,

cuidadosamente se sacaron los intestinos, se separó el intestino delgado y se cortó longitudinalmente. El contenido intestinal se recuperó en una caja petri que contenía 5 mL de solución amortiguadora de fosfatos (PBS pH 7.4). El intestino se cortó en pequeñas porciones de 1 cm de largo y se depositaron en un aparato de Bearman modificado que contenía PBS en su interior. Los intestinos se incubaron a 37°C durante 3 h. Al término de este periodo, los adultos sedimentados en el tubo de ensayo se lavaron con PBS y se procedió a realizar una cuenta total en microscopio de luz con objetivo de 10X.

IV. Evaluación de la respuesta inmune

Determinación de anticuerpos contra Salmonella spp mediante ensayo inmunoenzimático (ELISA)

En este ensayo se usó como antígeno total a la bacteria completa de *Salmonella* de acuerdo al método descrito por Salas-Rojas M (2005). Se partió de un cultivo bacteriano de la cepa SL3261 en medio líquido BHI (suplementado con DHB al 0.01%) y se incubó durante 18 h a 37°C con agitación constante. Se ajustó en el nefelómetro a 0.5 en la escala de McFaland (1.5×10^8 UFC) con solución salina formalizada al 0.6%. Placas de 96 pozos (NUNC 475094) fueron sensibilizadas con 100 μ L de la solución antes mencionada y se incubaron a 37°C por 30 minutos y luego a 4°C toda la noche. Al día siguiente se realizaron 3 lavados con solución de PBS-Tween 20 al 0.3% (200 μ L por pozo) y se bloquearon con PBS-leche descremada 5% (Sveltes[®]) a temperatura ambiente (TA) por 30 minutos. Por duplicado, se adicionaron los sueros a evaluar en diluciones seriadas en PBS-leche descremada 5%. Las placas se incubaron a 37°C por 1 hora en agitador (Rocker Platafom Bellco Glass[®]). Se realizaron 3 lavados y un bloqueo como se describió anteriormente y se adicionó el anticuerpo secundario anti-IgG (H+L) de ratón acoplado a peroxidasa de rábano (HPO) (Zymed[®]) en dilución 1:1000 en PBS-leche 5% y se incubó a TA durante una hora a 37°C con agitación. El revelado consistió en utilizar reactivo TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (R&D systems[®]) de acuerdo a las especificaciones del proveedor; posteriormente la reacción se detuvo con 50 μ L de H₂SO₄ 2 N y se registraron las lecturas a 450 nm usando un filtro de

referencia a 540 nm en un lector de ELISA (Modelo Multiscan Ascent). Se usó como control positivo: un anticuerpo primario contra el antígeno somático de *Salmonella typhimurium* (O:B) diluído 1:50 y como control negativo anticuerpo anti-capsular VI de *Salmonella typhi*, ambos hechos en conejo, por lo que se usó como anticuerpo secundario un anti-IgG (H+L) de conejo acoplado a HPR (Zymed®) en dilución 1:2000.

Determinación de anticuerpos contra antígenos de T. spiralis mediante ensayo inmunoenzimático (ELISA)

Se sensibilizaron placas de 96 pozos (NUNC 475094) con 100 µL de antígeno total (ET, 20 µg/mL) de *T. spiralis* y de péptido sintético p43⁽²¹⁰⁻²³⁹⁾ (Anaspec®, tabla 11), este último disuelto previamente en DMSO y a una concentración de 5 µg/mL en solución amortiguadora de carbonatos (Na₂CO₃ mM, NaHCO₃, pH 9.0). En la tabla 11 se presenta la secuencia de aminoácidos del péptido p43⁽²¹⁰⁻²³⁹⁾. Las placas se incubaron toda la noche a 4°C y con agitación constante. Al día siguiente se eliminó el exceso de antígeno por inversión de las placas y se bloquearon con 200 µL de solución PBS-BSA (3%)-Tween 20 (0.05%) y se incubaron a 37°C durante 1 h. Posteriormente se eliminó el exceso de bloqueador mediante 3 lavados con PBS-Tween 20 (0.05%) por 5 minutos c/u. Se adicionaron por duplicado los sueros a evaluar en diluciones seriadas 1:10, 1:25, 1:50, 1:100 y 1:200 en PBS-BSA (3%)-Tween 20 (0.05%). Se incubaron las placas toda la noche a 4°C. Se usó como control positivo suero inmune de ratón BALB/c con 28 días de infección con *T. spiralis* y como control negativo suero preinmune, ambos se diluyeron 1:50. Después de 24 horas de incubación, se hicieron 4 lavados con PBS-Tween 20 (0.05%) y se adicionó un anticuerpo secundario anti-IgG (H+L) de ratón acoplado a peroxidasa HRP (Zymed®) en dilución 1:500 en PBS-BSA (3%)-Tween 20 (0.05%) y se incubó 1 h a 37°C con agitación constante. Se realizaron 3 lavados de 5 minutos c/u. Al final se procedió a revelar de acuerdo a lo descrito anteriormente.

Tabla 11. Péptido sintético p43⁽²¹⁰⁻²³⁹⁾.

Nombre	Secuencia	Referencia
Péptido derivado de la p43- kDa (p43 ⁽²¹⁰⁻²³⁹⁾)	RLEMYGSFLAKVMVVMRIWAVTDNTLQTT	McGuire et al., 2002.

RESULTADOS

Construcción del plásmido *pnirB LTB NANP FLAG*

La estrategia de clonación señalada en la figura 7, nos muestra que a partir del plásmido *pnirB LTB NANP ShdA-A (pASM-A)*, se construyeron los plásmidos *pnirB LTB NANPFLAG* y *pnirB LTB NANPFLAG ShdA*. En principio, el dominio α del AT ShdA contiene 110 residuos y 277 aminoácidos del dominio β . Por su parte, el plásmido *pASM-A*, contiene una forma acotada del autotransportador ShdA (ShdA-A), cuyo dominio α consta de 37 aminoácidos. En base a experimentos previos realizados por nuestro grupo de trabajo, se demostró que esta forma acotada era la que conservaba gran parte de la región *linker* (situada hacia el extremo amino, además de que permite el paso del dominio pasajero y de esta manera, translocarse de manera mucho más eficiente que con el dominio completo α de ShdA (Osorio-León JF, 2004; Pompa-Mera, et al., *manuscrito en preparación*). Otra de las ventajas que ofrece el usar la forma acotada ShdA-A, es que se pueden fusionar a este autotransportador, proteínas ó péptidos de mayor tamaño, sin comprometer la funcionalidad de la región *linker*. Debido a la necesidad de contar con un gen cuyo producto fuera de fácil detección y de esta manera se pudiera evaluar a futuro la expresión de las proteínas, se consideró la subclonación de un adaptador que codifica para el péptido *FLAG*, cuyo anticuerpo se encuentra disponible comercialmente. Por otra parte, los extremos del adaptador FLAG poseen a los sitios de restricción para las enzimas *Xba I* y *Bam HI*, lo que obligó a retirar la secuencia *shda-a* del plásmido *pASM-A*, con la finalidad de dejar los sitios *NheI* y *Bam HI* como sitios de inserción para el adaptador de FLAG. El fragmento correspondiente a *shda-a* (fig. 7) de 942 pb, se reservó para después ligarlo al plásmido. La construcción resultante (*pnirB LTB NANP FLAG*) de 2515 pb (fig. 9 A) se analizó por restricción, empleando las enzimas *Nhe I*, *Xba I*, *Bam HI* y *Nsi I*. La ganancia de este último sitio, confirmó la positividad de las clonas para esta construcción, ya que el adaptador FLAG tiene integrado el sitio *Nsi I* (fig. 9 B, carril 5).

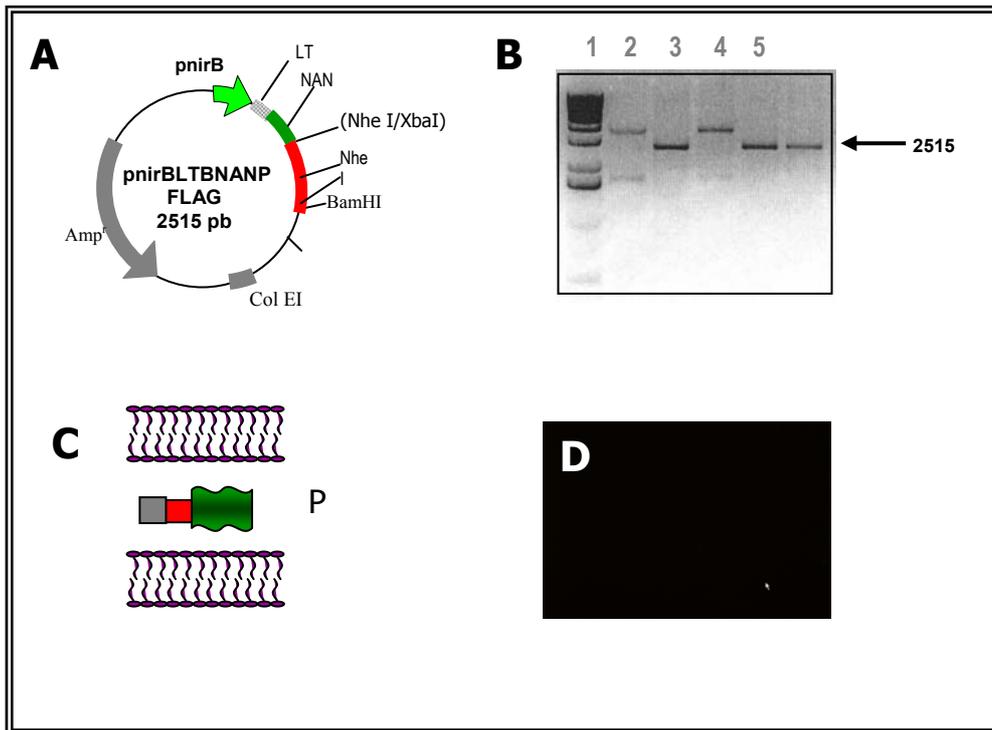


Figura 9. Caracterización y funcionalidad del plásmido *pnirB LTB NANP FLAG*. Panel A: Mapa del plásmido; panel B: Análisis de restricción, carriles 1 Marcador de tamaños moleculares (1 kb *NEB*[®]); 2 Control sin digerir, 3,4,5 y 6 digestión del plásmido con las enzimas *Nhe I*, *Xba I*, *Nsi I* y *Bam HI*, respectivamente. Panel C: Esquema de la no translocación de la proteína de fusión codificada por el plásmido. Panel D: IFA de *E. coli DH5α* portando el plásmido *pnirB LTB NANP FLAG*, la cual no presenta en la superficie la bandera FLAG. En la IIF Se usó anticuerpo monoclonal anti-FLAG biotinilado y revelado con streptavidina-FITC. Abreviaturas: membrana externa (EM), periplasma (P), membrana interna (IM). La flecha indica el tamaño del plásmido cuando este es cortado por las enzimas de restricción anteriormente señaladas.

Construcción del plásmido *pnirB LTB NANPFLAG Shda*

El plásmido *pnirB LTB NANP FLAG* sirvió como punto de partida, el cual se sometió a una digestión doble con las enzimas *Nhe I* y *Bam HI*, para dejar los mismos sitios cohesivos que poseía el fragmento de *shda-a* (fig. 7). De esta manera, al ligar plásmido abierto y el fragmento codificante de *shda-a* en presencia de T4 DNA ligasa, se obtuvo un plásmido con un tamaño de 3445 pb (fig. 10 A). Se realizó un análisis de restricción con este plásmido, empleando las enzimas *Sal I*, *Nsi I*, *Spe I*, *Xba I* y *Xho I* y una doble digestión con *Nhe I*/*Bam HI*. La pérdida del sitio *Nsi I* (fig. 10 B, carril 5) y la generación de un fragmento de 942 pb con *Nhe I*/*Bam HI* (fig. 10B, carril 4) comprobó la positividad de las clonas para la construcción en cuestión.

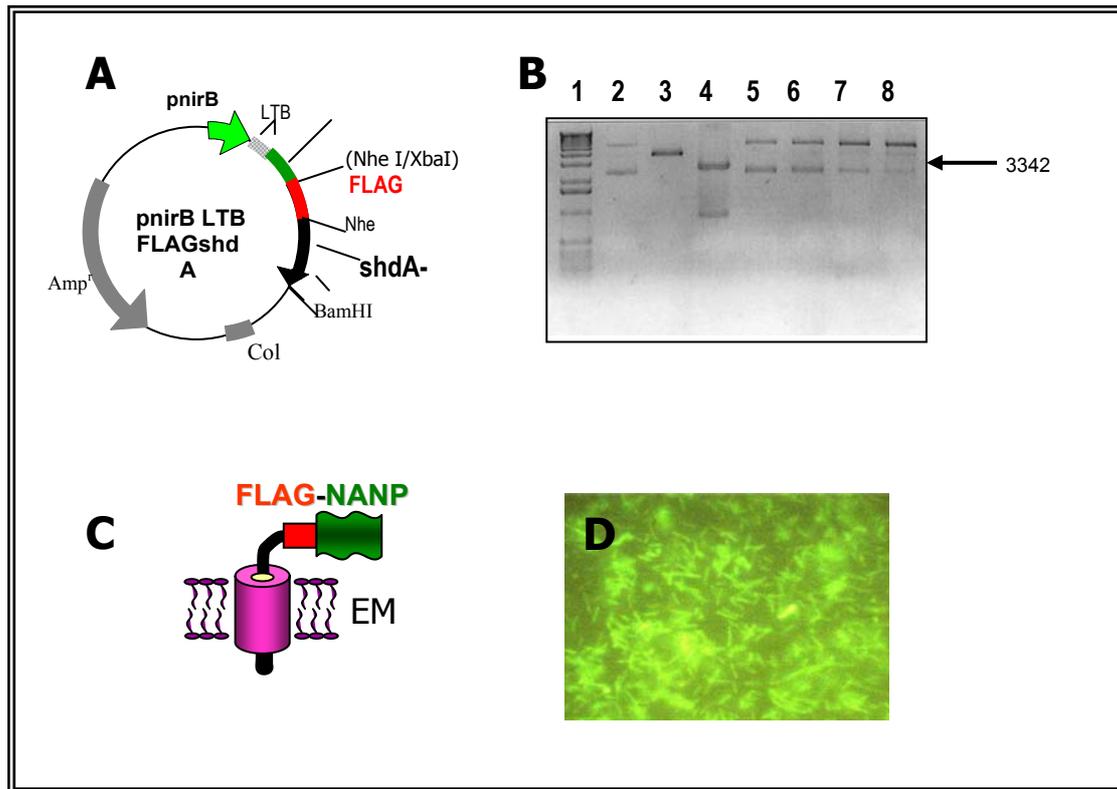


Figura 10. Caracterización y funcionalidad del plásmido *pnrB LTB NANP FLAG ShdA-A*. A) Mapa del plásmido; B) Análisis de restricción, carriles 1 Marcador de tamaños moleculares (1 kb *NEB*[®]); 2 Control sin digerir, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 digestión del plásmido con las enzimas *Sal I*, *Nhe I/Bam HI*, *Nsi I*, *Spe I*, *Xba I* y *Xho I*, respectivamente. C) Translocación de la proteína de fusión codificada por el plásmido. D) IIF que demuestra la translocación de la proteína de fusión en la superficie de *E. coli DH5a* que porta el plásmido; empleando anticuerpo monoclonal anti-FLAG biotinilado y revelado con streptavidina-FITC.

Construcción del plásmido *pENP-01*

La creación del plásmido *pENP-01* tiene por objeto el tener un vector de clonación que sea versátil, con capacidad de aceptar en la región polilinker secuencias que codifiquen para péptidos, epítomos, proteínas, etc., que puedan ser translocados y presentados en las superficie de *E. coli DH5a* y de *Salmonella spp.*, a través del AT ShdA-A; con la fácil detección de la proteína de fusión usando un anticuerpo monoclonal comercial (no necesariamente el anticuerpo dirigido hacia la proteína pasajera). En este contexto, la secuencia correspondiente al tetrapéptido *NANP* (derivado de la *CSP* de *P. falciparum*) localizado río arriba de *shda-a*, se deletó y se sustituyó por un polilinker artificial que contiene los sitios de restricción para las enzimas *Xba I*, *Hind III*, *Spe I*, *Sal I*, *Xho I* que permitan posteriormente clonación de secuencias que

codifiquen para epitopos de interés. Para ello se llevó a cabo una reacción en cadena de la polimerasa (PCR), empleando 6 ng del plásmido *pnirB LTB NANPFLAG ShdA* como templado. Los oligonucleótidos usados en esta reacción incluyen los mismos sitios que el polilinker. El plásmido resultante *pENP-01* se analizó con las enzimas de restricción *Xba I*, *Hind III*, *Spe I*, *Sal I*, *Xho I* (fig. 11 A) También se realizó una digestión doble con las enzimas *Nhe I* y *Bam HI*. Se obtuvo un total de 4 clonas positivas para este análisis de restricción y los resultados mostraron una digestión parcial con la enzima *XbaI* (fig. 11 B, carril 6) y la generación de 2 fragmentos con enzima *Sal I* (fig. 11 B, carril 7) además de los cortes esperados con el resto de las enzimas. Cabe mencionar que con la digestión doble, empleando las enzimas *Nhe I* y *Bam HI* se cortó el gen *shda-a* (942 pb), el cual pudo apreciarse (fig. 11B, carril 8). La secuencia del plásmido *pENP-01* confirmó el marco de lectura de todos sus elementos (fig. 11 E)

Generación de la secuencia codificante *ag30*

La secuencia de aminoácidos que conforman el epítipo $p43^{(210-239)}$ se obtuvo a partir de la secuencia descrita por Vassilatis et al.,(1992) y McGuire et al., (2002). En principio se obtuvo su correspondiente secuencia de nucleótidos en DNA, considerando aquellos codones de preferencia tanto para *E. coli*, como para *Salmonella spp.* Lo anterior se tomó en cuenta para diseñar los 2 megaprimers de 70 pb, los cuales alineaban entre sí en 20 pb (fig. 12 A). Se realizó un gradiente de PCR para establecer la T_m , cuyo intervalo de temperaturas abarcó de 65.9-77°C. Los resultados mostraron que a 77°C se obtuvo el producto esperado, cuyo peso fue de 120 pb (fig. 12 B, carril 9 y fig. 12 C). Este último, se sometió a una digestión doble con las enzimas *Hind III* y *Xho I*, dando como resultado un fragmento de 108 pb. La mínima diferencia de tamaño del inserto digerido y no digerido, solo pudo ser visualizada a través de un gel de poliacrilamida al 20% (fig. 12 D, carriles 2 y 3).

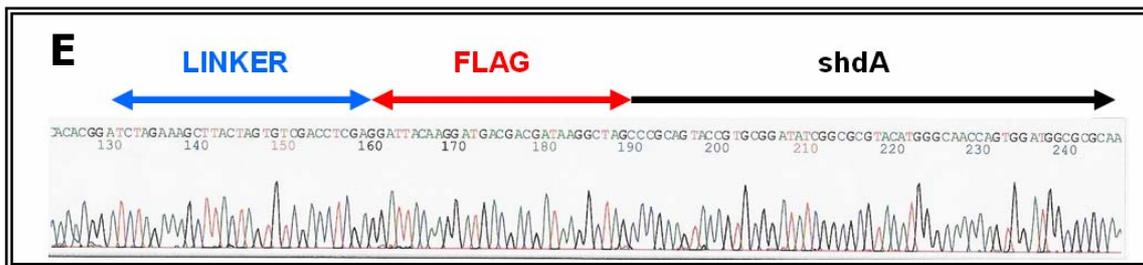
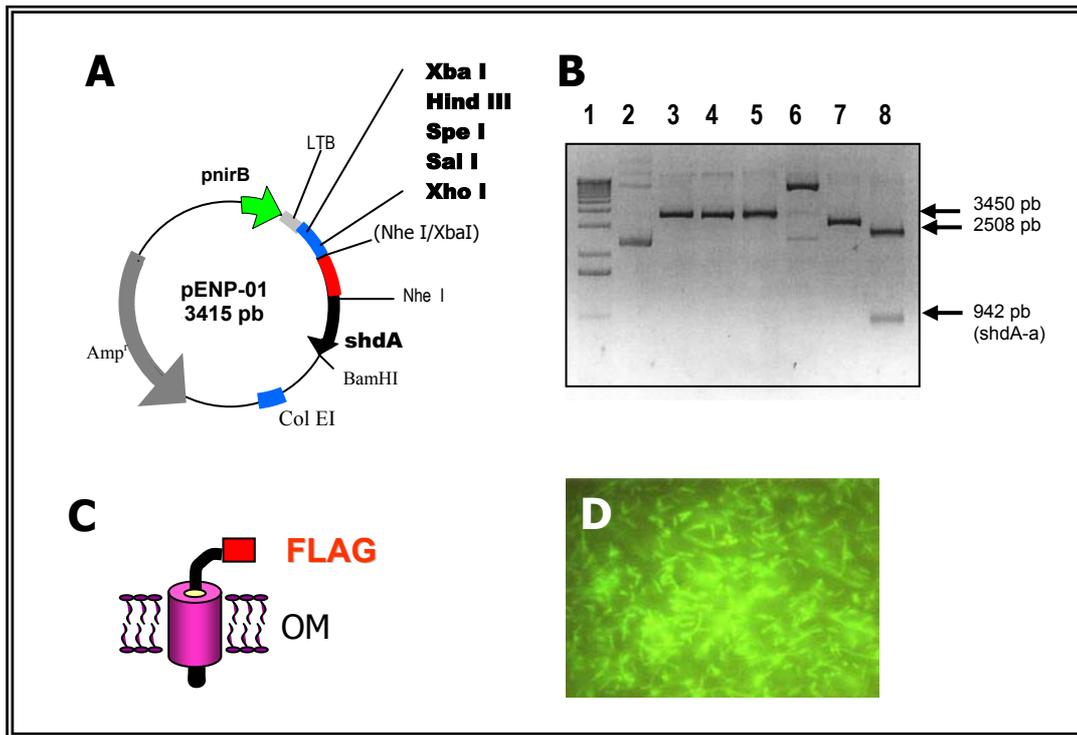


Figura 11. Caracterización y funcionalidad del plásmido *pENP-01*. A) Mapa del plásmido; B) Análisis de restricción, carriles 1 Marcador de tamaños moleculares (1 kb *NEB*[®]); 2 Control sin digerir, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 digestión del plásmido con las enzimas *Hind III*, *Spe I*, *Xho I*, *Xba I*, *Sal I* y *Nhe I*/*Bam HI*, respectivamente. C) Translocación del péptido bandera *FLAG*, codificado por el plásmido. Panel D: IIF que demuestra la translocación de *FLAG* en la superficie de *E. coli DH5α A* mediante el AT *ShdA-A*. En este último ensayo, se utilizó anticuerpo monoclonal anti-*FLAG* biotinilado y revelado con streptavidina-FITC. E) Secuencia de las principales regiones del plásmido *pENP-01*.

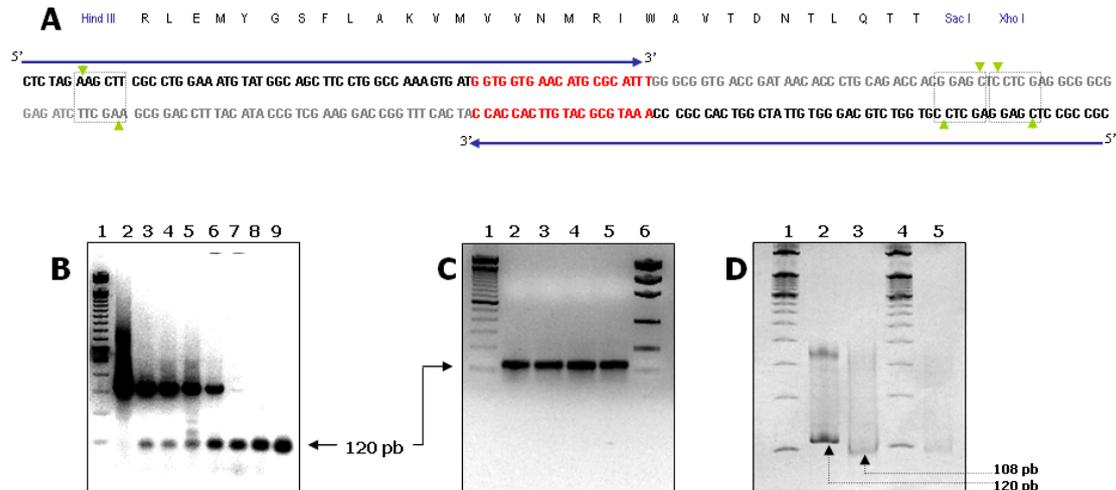


Figura 12. Estrategia para obtener la secuencia (ag30) que codifica para el epitopo p43⁽²¹⁰⁻²³⁹⁾ de *T. spiralis*. **A)** Secuencia de aminoácidos del epitopo p43⁽²¹⁰⁻²³⁹⁾ con su correspondiente secuencia de DNA codificante, considerando los codones de preferencia para *E. coli* y *Salmonella spp.* Las flechas indican los nucleótidos que conforman a cada uno de los oligonucleótidos empleados para obtener la secuencia codificante de interés, flanqueada por los sitios de restricción Hind III y Xho I. **B)** Productos de amplificación de la secuencia ag30 obtenidos mediante un gradiente de PCR, cuyas *T_m* empleadas fueron 65.5, 66.2, 67.2, 68.7, 70.5, 72.6, 74.8 y 77°C (carriles 2-9), respectivamente. **C)** Amplificación de la secuencia de interés a una *T_m* de 77°. Tanto en B y C, el carril 1 corresponde al marcador de tamaños moleculares de 100 pb (Invitrogen®), así como la concentración del gel de agarosa fué de 2.5%. **D)** Electroforesis en gel de acrilamida al 20% de la secuencia ag30; carril 1 y 4: marcador de tamaños moleculares (100 pb Invitrogen®); carril 2: producto ag30 sin digerir, carril 3 producto ag30 doblemente cortado con las enzimas de restricción Hind III y Xho I. Los tamaños de las secuencias en cada caso, son indicadas por las flechas.

Construcción del plásmido pAg30

El fragmento ag30 resultante de 108 pb (fig. 12 D, carril 3) que codifica para el epitopo p43⁽²¹⁰⁻²³⁹⁾, se ligó con el plásmido *pENP-01* previamente abierto con las enzimas *Hind III* y *Xho I*. *E. coli DH5a* y *Salmonella enterica* serovar Typhimurium SL3261 se transformaron con este plásmido. Las clonas positivas para esta construcción se revelaron por análisis de restricción con las enzimas *Hind III* y *Xho I*. Se compararon los tamaños de los plásmidos, a partir del análisis de restricción de los plásmidos *pENP-01* y *pAg30* (fig. 13 B). Las diferencias entre ambos pudieron ser observadas en un gel de agarosa al 1.8%, mostrándose una ligera disminución en el tamaño de la banda generada por la digestión de *pAg30* con *Hind III* y *Xho I*, con respecto al tamaño de la banda generada con el plásmido *pENP-01*, bajo las mismas condiciones (fig. 13 B, carriles 2 y 3). Las diferencias en tamaño de *pAg30* y *pENP-01* a través de la

digestión con *Hind III*, muestra que el plásmido *pAg30* tiene un tamaño relativamente mayor con respecto al tamaño del plásmido *pENP-01*, lo que demuestra la correcta inserción de la secuencia codificante *ag30* (fig. 13 B, carriles 4 y 5). Al igual que el plásmido *pENP-01*, el plásmido *pAg30* fué secuenciado para confirmar el marco de lectura abierto de la secuencia $p43^{(210-239)}$ (fig. 13 E).

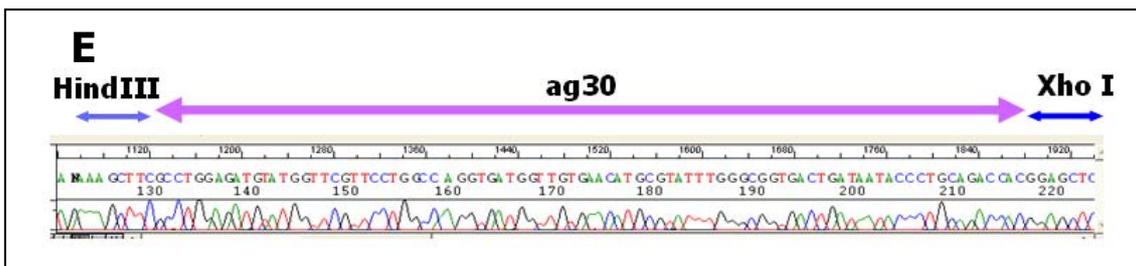
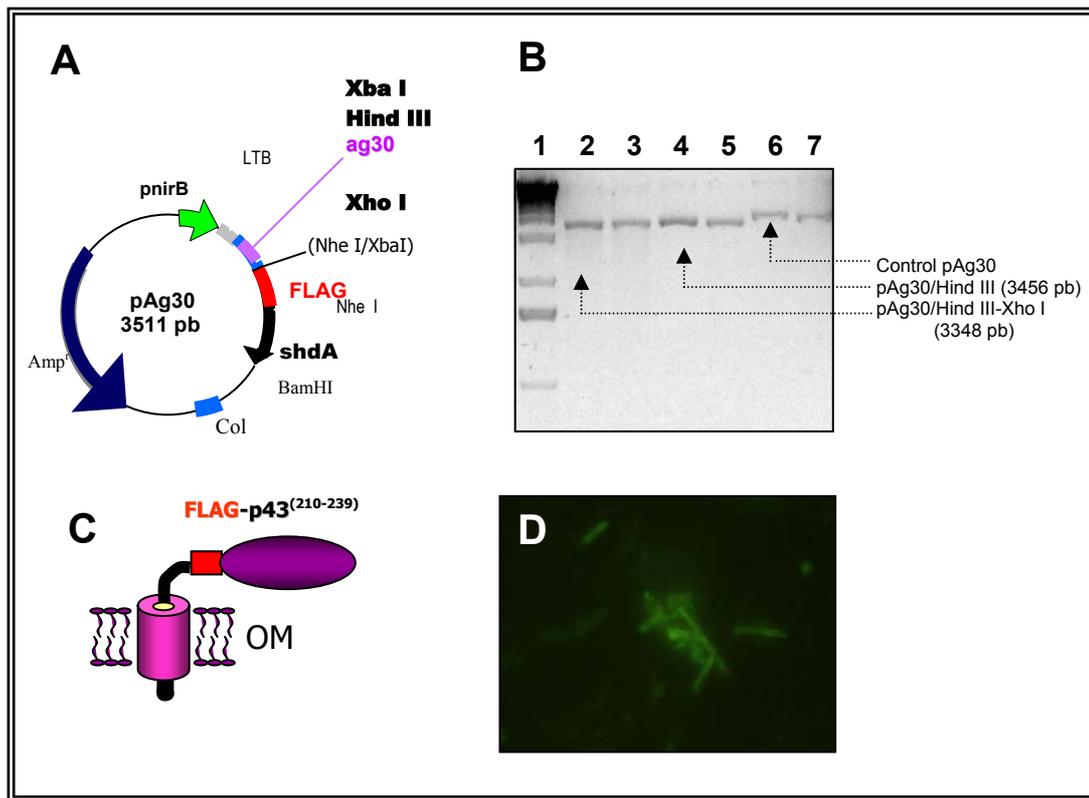


Figura 13. Caracterización y funcionalidad del plásmido *pAg30*. A) Mapa; panel B) Análisis de restricción, carriles 1 Marcador de tamaños moleculares (1 kb *NEB*[®]); 2 digestión doble de *pAg30* con *Hind III* y *Xho I*; 3 misma digestión con el plásmido *pENP-01*; 4 y 5 digestión con *Hind III* de *pAg30* y *pENP-01*, respectivamente. Carriles 6 y 7 controles *pAg30* y *pENP-01*, respectivamente. C) Translocación de la proteína de fusión FLAG- $p43^{(210-239)}$ codificada por el plásmido. D) IIF que demuestra la translocación de la proteína de fusión FLAG-Ag30 en la superficie de *E. coli DH5a*, empleando anticuerpo monoclonal anti-FLAG biotinilado y revelado con streptavidina-FITC. E) Secuencia de *ag30* flanqueado por los sitios de restricción de *HindIII* y *Xho I* en el plásmido *pAg30*.

Finalmente cabe mencionar que el análisis de restricción de las construcciones *pENP-01* y *pAg30*, solo fueron evaluadas en *E. coli DH5 a*. No

obstante los estudios subsecuentes para evaluar la funcionalidad de los mismos, se realizaron tanto en *E. coli DH5* α (datos no mostrados), como en *Salmonella enterica* serovar Typhimurium SL3261.

Evaluación de la expresión de las proteínas de fusión en E. coli y Salmonella mediante Western-blot

Para evaluar la expresión de las proteínas de fusión (codificadas por los plásmidos *pENP-01* y *pAg30*) en *E. coli DH5* α (figura 14) y *Salmonella enterica* serovar Typhimurium SL3261 (fig. 15), se extrajeron proteínas totales de las cepas bacterianas inducidas en condiciones microaerófilas y se separaron por SDS-PAGE al 12%. Para tener una mayor resolución de las bandas correspondientes a las proteínas expresadas en *Salmonella*, se usaron geles de acrilamida al 10% (SDS-PAGE-10%) y se detectaron por la técnica de Western-blot, empleando el Ac Mo anti-FLAG biotinilado. La banda correspondiente a la proteína quimérica codificada por el plásmido *pENP-01*, tuvo un peso correspondiente a 38.64 kDa (fig. 14 B, carril 3), mientras que la codificada por *pAg30* de 42.24 kDa. Estas características en cuanto a tamaño, también se observaron en extractos totales de *Salmonella* (Figura 15 B, carriles 5-7)

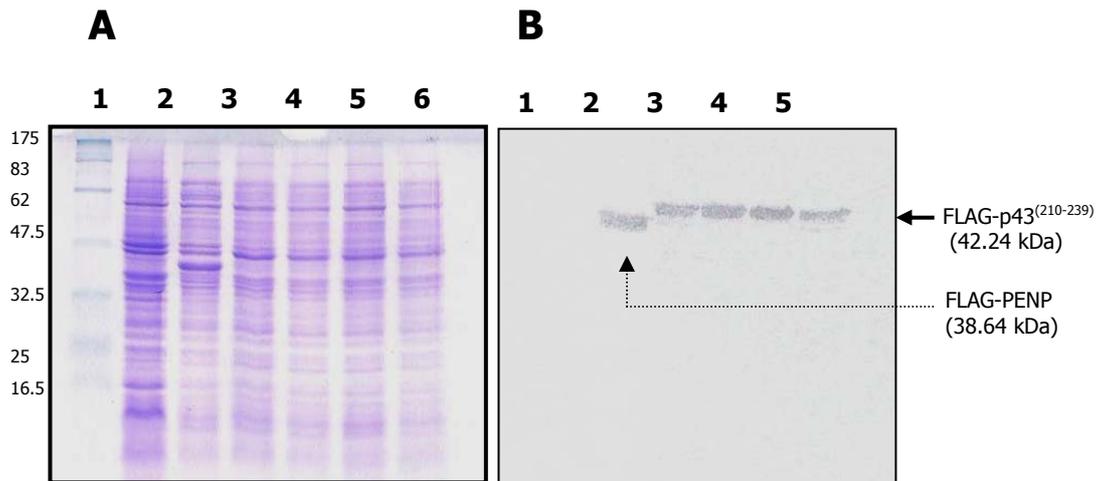


Figura 14. Análisis electroforético y por Western-blot de la expresión de las proteínas de fusión codificadas por los plásmidos *pENP* y *pAg30*, en *E. coli DH5a* inducida anaeróbicamente. A) SDS-PAGE 12% de los extractos proteicos totales de la bacteria transformada con los plásmidos. Carriles 1 marcador de pesos moleculares en kDa; 2 cepa *pnirB* (control negativo); 3 *pENP-01* (control positivo); 4-7 clonas positivas para *pAg30*. B) Western-blot de las muestras del panel A, empleando el anticuerpo primario anti-FLAG biotinilado en dilución 1: 250. Se usó el marcador de tamaños moleculares de proteínas Prestained protein marker, Broad Range NEB®

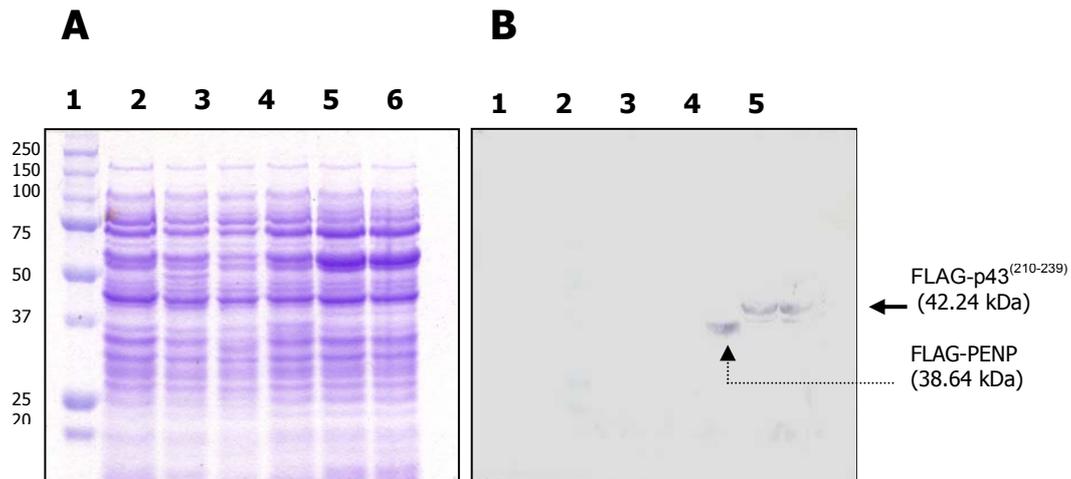


Figura 15. Análisis electroforético y por Western-blot de la expresión de las proteínas de fusión codificadas por los plásmidos *pENP* y *pAg30*, en *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium SL3261* inducida anaeróbicamente. A) SDS-PAGE 10% de los extractos proteicos totales de la bacteria transformada con los plásmidos. Carriles: 1 marcador de pesos moleculares en kDa; 2 cepa *pnirB* (control negativo); 3 *pnirB LTB β-ShdA*; 4 *pASM-A*; 5 *pENP-01*, 6-7 clonas positivas para *pAg30*. B) Western-blot de las muestras del panel A, empleando el anticuerpo primario anti-FLAG biotinilado en dilución 1:250.

Evaluación de la expresión de las proteínas de fusión en la superficie de *Salmonella* mediante inmunofluorescencia indirecta (IIF) y citometría de flujo

Una vez que se comprobó que las cepas bacterianas producen la proteína de interés, era necesario demostrar que la proteína pase a la superficie bacteriana, demostrando que el sistema de AT ShdA está translocando eficientemente la proteína heteróloga. Para ello se realizó una IIF con cultivos inducidos en condiciones microaerófilas *in vitro* de *Salmonella*, los cuales portaban los plásmidos mostrados en la figura 7. Las bacterias se incubaron con Ac Mo anti-FLAG biotinilado. Los resultados mostraron que *Salmonella* que porta los plásmidos *pENP-01* y *pAg30* expresan en la superficie bacteriana el péptido bandera FLAG (fig. 16 A y 16 B), mientras que las cepas *pnirB LTB ShdA* y *pnirB LTB NANP ShdA-A* no lo hacen (fig. 16 A y 16 B).

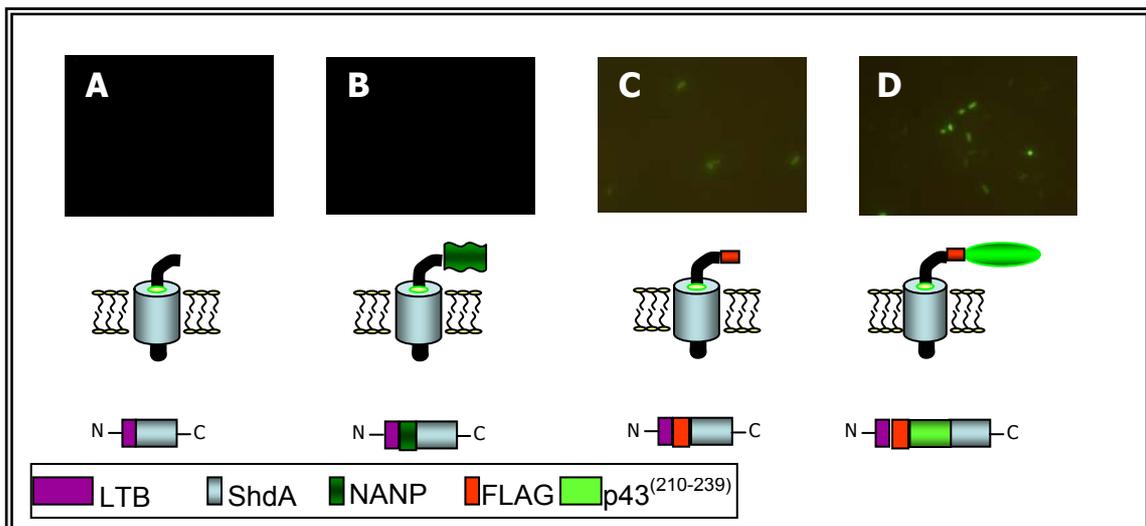
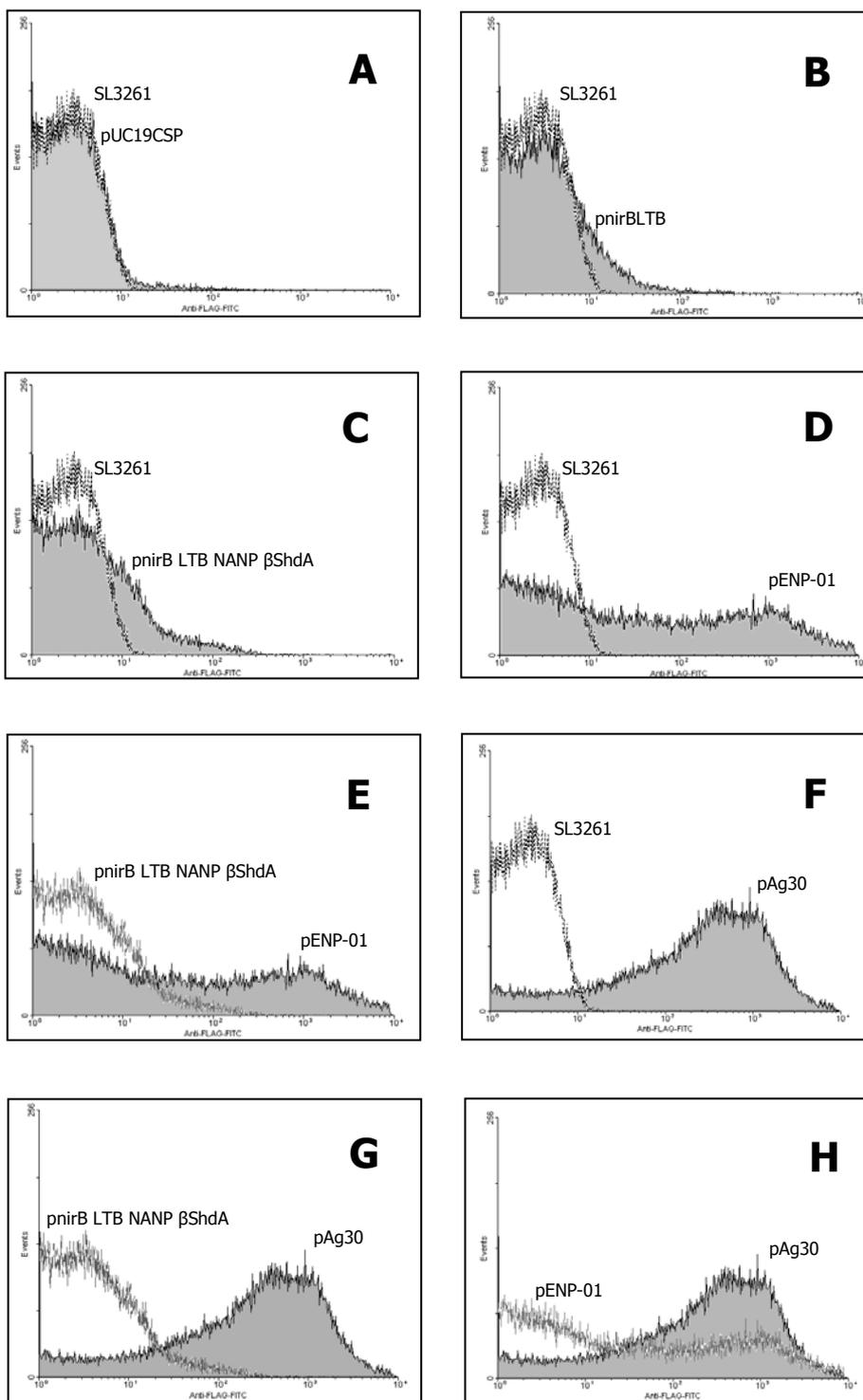


Figura 16. Expresión del péptido FLAG en la superficie de *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* SL3261. Se muestran las inmunofluorescencias (IIF) realizadas con cada una de las cepas de *Salmonella* portando los diferentes plásmidos: A) *pnirB LTB ShdA*; B) *pnirB LTB NANP ShdA-A*; C) *pENP-01*; D) *pAg30*. En la parte media de la figura se representa para cada caso un modelo de la translocación del epitopo heterólogo a nivel de membrana externa (EM), mientras que la parte inferior muestra como está constituida cada una de las proteínas de fusión. Las regiones que forman parte de la proteína de fusión se indican en el recuadro inferior izquierdo.

Estos resultados fueron confirmados en 3 ensayos independientes y se correlacionaron con los resultados de la citometría de flujo (fig. 17). En estos

experimentos, se aprecia que *Salmonella enterica* serovar Typhimurium SL3261 no expresa el péptido FLAG. De manera similar tampoco es expresado por la misma bacteria aún cuando ésta porta el plásmido *pUC19CSP*, el cual codifica para la proteína circunsporozoítica (CSP) de *Plasmodium falciparum* y cuya localización en la bacteria es a nivel del citoplasma (fig. 17 A), esta cepa se usó como control negativo para el AT ShdA y para el epítipo en estudio. Resultados muy similares se obtuvieron con *Salmonella* que porta el plásmido *pnirB LTB* (fig. 17 B) y con la cepa *pnirB LTB NANP β -ShdA*, la cual ya tiene una forma completa del autotransportador ShdA que transloca al epítipo inmunodominante heterólogo llamado NANP y que forma parte de la CSP (fig. 17 C). Esta cepa fué usada como control negativo para el epítipo únicamente. Por otra parte, al analizar los histogramas de la cepa *pENP-01* (cepa que expresa ShdA y FLAG sin epítipo) se observa un desplazamiento de la curva correspondiente de hasta 2 unidades logarítmicas de luz fluorescente, con respecto a la cepa que no porta plásmido alguno (fig. 17 D) y con respecto a la cepa *pnirB LTB NANP β -ShdA* (fig. 17 E). Por su parte el histograma correspondiente a *Salmonella* que porta el plásmido *pAg30* muestra un desplazamiento de 2.5 unidades logarítmicas con respecto a la cepas SL3261 (fig. 17 F) y *pnirB LTB NANP β -ShdA* (fig. 17 G). Finalmente, cuando se comparan los histogramas de las cepas *pENP-01* y *pAg30*, se observa que ambos tienen un desplazamiento de 2 unidades logarítmicas e intensidades medias de fluorescencia (IMF) de 329.81 y 332.20 respectivamente. Sin embargo, en el caso de la cepa *pENP-01* se observan 2 poblaciones: una que expresa el péptido FLAG y otra que no lo hace (fig. 17 H). Esto puede estar estrechamente relacionado con la viabilidad, ya esta cepa retarda su crecimiento 30 minutos con respecto a la cepa *pAg30*. Es importante subrayar que *Salmonella* transformada con *pAg30* tuvo la expresión más elevada, además de tener un sólo tipo de población. En la fig. 17 panel I se muestra detalladamente las IMF para cada cepa.



CEPA	IMF
SL3261	14.77
pUC19 CSP	34.46
pnirB LTB	27.00
pnirB LTB NANP ShdA-A	31.73
pENP-01	329.81
pAg30	332.20

Figura 17. Análisis de la expresión del péptido FLAG en la superficie de *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* SL3261 mediante citometría de flujo. Histograma de las poblaciones sin permeabilizar de la bacteria transformada con distintos plásmidos e inducidas en condiciones microaerofílicas *in vitro*. Se utilizó anticuerpo monoclonal anti-FLAG biotinilado y estreptavidina conjugada con FITC. La intensidad media de fluorescencia (IMF) de cada una de las cepas se indica en el recuadro superior.

Inmunogenicidad de la forma recombinante de p43⁽²¹⁰⁻²³⁹⁾

Uno de los aspectos más importantes en la tecnología de las proteínas recombinantes, es el hecho de que éstas conserven las mismas propiedades que la forma nativa correspondiente, como estructura, conformación, propiedades funcionales e inmunogenicidad. Para comprobar si el p43⁽²¹⁰⁻²³⁹⁾ recombinante (como parte de una proteína de fusión producida por *E. coli DH5α*) mantiene sus propiedades estructurales e inmunogénicas, se inmunizaron ratones por vía intraperitoneal (i.p) con la proteína de fusión antes mencionada. Posteriormente se emplearon los sueros de los animales a fin de determinar si eran capaces de reconocer al epítopo nativo p43⁽²¹⁰⁻²³⁹⁾ presente tanto en extractos totales (ET) de la LM de *T. spiralis*, como a nivel de superficie del parásito. Para ello, primero se realizó un ensayo tipo Western-blot en el cual se separaron proteínas totales de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium SL3261 transformada con los diferentes plásmidos (fig. 18 A, carriles 2-5) y ET de LM de *T. spiralis* (fig. 18 A, carril 7). Se analizó la reactividad del suero anti-p43⁽²¹⁰⁻²³⁹⁾ y se observó que este suero reconoció la banda correspondiente a la p43 nativa presente en el ET de la LM (fig. 18 D, carril 7) y otras bandas de peso superior (datos no mostrados) y las bandas de las proteínas codificadas por los plásmidos *pnirB LTB NANP β ShdA-A*, *pENP-01* y *pAg30* (fig. 18 D, carriles 3-5 respectivamente). Es importante señalar que estos sueros no se titularon previamente al realizar el ensayo tipo western-blot. Por su parte, el suero inmune (de ratón con 28 días de infección con el parásito) solo reconoce las bandas correspondientes a los antígenos de superficie de la LM de *T. spiralis* (fig. 18 C; carril 7) pero no reconoce las proteínas de fusión codificadas por los plásmidos *pnirB LTB NANP β*, *ShdA-A* y *pENP-01* (fig. 18 C, carriles 2-4). Sin embargo, llama la atención que este suero reconoció muy levemente la banda correspondiente a la proteína quimérica que contiene a p43⁽²¹⁰⁻²³⁹⁾ de *Salmonella*. Finalmente, empleando suero preinmune como control negativo, no se observó reacción alguna con las proteínas de fusión en estudio (fig. 18 B).

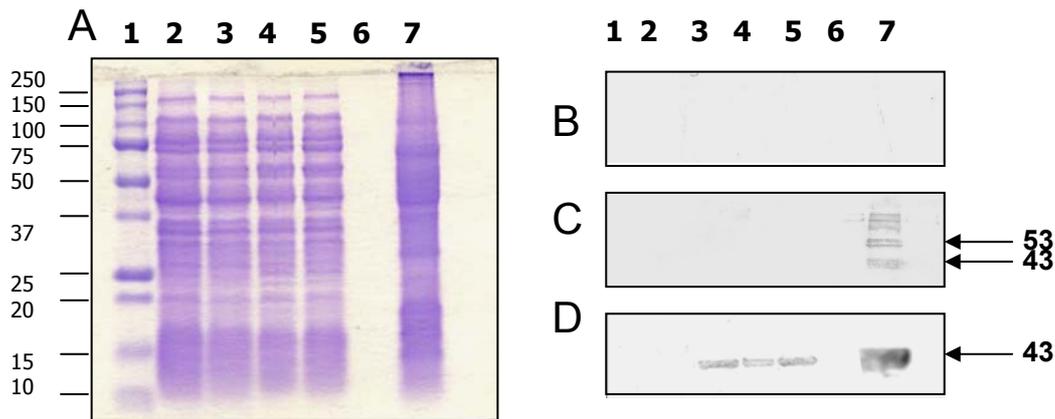


Figura 18. Análisis de la inmunogenicidad de la proteína de fusión mediante SDS-PAGE y Western-blot. A) SDS-PAGE 10 % de extractos proteicos totales de *Salmonella* transformada con los diferentes plásmidos; carriles 1) marcador de tamaños moleculares en kDa; 2) pnr B LTB, 3) pnrB LTB NANP ShdA-A, 4) pENP-01, 5) pAg30, 6) sin muestra y 7) ET de LM de *T. spiralis*. B) Western-blot con las mismas muestras del panel A, incubadas con suero preinmune de ratón (1:250). C) Muestras incubadas con suero inmune de 28 días de infección en ratón. D) Muestras incubadas con suero anti-p43⁽²¹⁰⁻²³⁹⁾ (dilución 1:200). En todos los casos se usó como anticuerpo secundario anti-IgG de ratón acoplado a HPO en dilución 1:500.

Reconocimiento del p43⁽²¹⁰⁻²³⁹⁾ en su forma nativa por los sueros anti-p43⁽²¹⁰⁻²³⁹⁾

La expresión de la p43 en la superficie y en el ET de la LM de *T. spiralis* es estadio-específica y exclusiva de la LM (Vassilatis et al., 1996). Con la finalidad de evaluar si los sueros dirigidos contra la forma recombinante de p43⁽²¹⁰⁻²³⁹⁾ (sueros anti-p43⁽²¹⁰⁻²³⁹⁾) podían reconocer a la forma nativa del epítipo p43⁽²¹⁰⁻²³⁹⁾ tanto en la superficie, como a nivel de estructuras internas del parásito, se llevó a cabo una inmunofluorescencia indirecta (IIF) empleando LM completa de *T. spiralis* y criosecciones del mismo parásito. Este ensayo se realizó con sueros preinmune, inmune, anti-pENP-01 y anti-p43⁽²¹⁰⁻²³⁹⁾ a 2 diluciones (1:10 y 1:50). En ambos casos los resultados son muy similares. En la figura 19 D se puede apreciar que los sueros anti-p43⁽²¹⁰⁻²³⁹⁾ reconocen de manera muy leve antígenos en la superficie de la LM completa con respecto al reconocimiento por parte del suero inmune de ratón con 28 días de infección (control positivo) (fig. 19 B). No hubo reconocimiento de antígenos en la superficie de la LM incubada con suero preinmune ni con suero anti-pENP-01 (fig.

19-C y 19-A, respectivamente). Sin embargo es necesario realizar un estudio de inhibición para demostrar que este reconocimiento a nivel de la superficie del parásito es específico para p43⁽²¹⁰⁻²³⁹⁾. Cuando se realizaron los ensayos en criosecciones de LM tratadas con los sueros antes señalados, se observaron resultados muy similares (fig. 20). De manera interesante, las criosecciones incubadas con suero anti-p43⁽²¹⁰⁻²³⁹⁾ (fig. 20 F) mostraron un patrón de fluorescencia característico, ya que existen regiones en la LM que no fueron teñidas, sugiriendo la posibilidad de que los sueros reconocieron zonas en las cuales pudieran encontrarse las células llamadas α -esticocitos, los cuales son responsables de producir a la p43. Por su parte, el suero preinmune de los ratones BALB/c (fig. 19-D); así como los sueros dirigidos a la proteína quimérica codificada por el plásmido *pENP-01*, no reconocieron a los antígenos presentes en las criosecciones de la LM de *T. spiralis*. Estos resultados sugieren que p43⁽²¹⁰⁻²³⁹⁾ aún como parte de una proteína de fusión, muy probablemente mantiene sus propiedades antigénicas e inmunogénicas.

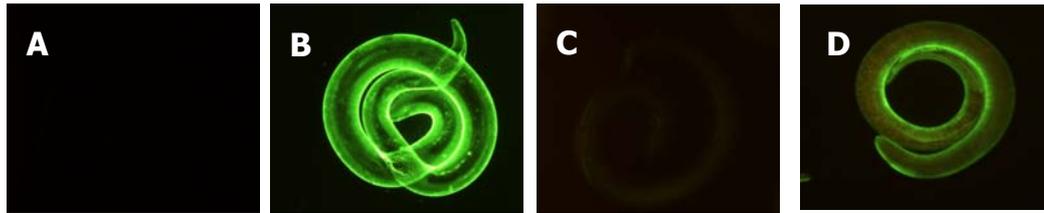


Figura 19. Análisis por IIF del reconocimiento del epitopo nativo p43⁽²¹⁰⁻²³⁹⁾ en la superficie de *T. spiralis* por los anticuerpos inducidos por la proteína de fusión FLAG-p43⁽²¹⁰⁻²³⁹⁾ en ratones BALB/c. Inmunofluorescencia indirecta (IIF) de: A) LM incubada con suero preinmune (control negativo), B) LM incubada con suero inmune (control positivo), C) LM con suero anti-pENP y D) LM con suero anti-p43⁽²¹⁰⁻²³⁹⁾. Todos los sueros se adsorbieron previamente con *E. coli DH5 α* , se usaron en dilución 1:50 y se revelaron con un anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con FITC dilución 1: 1:100.

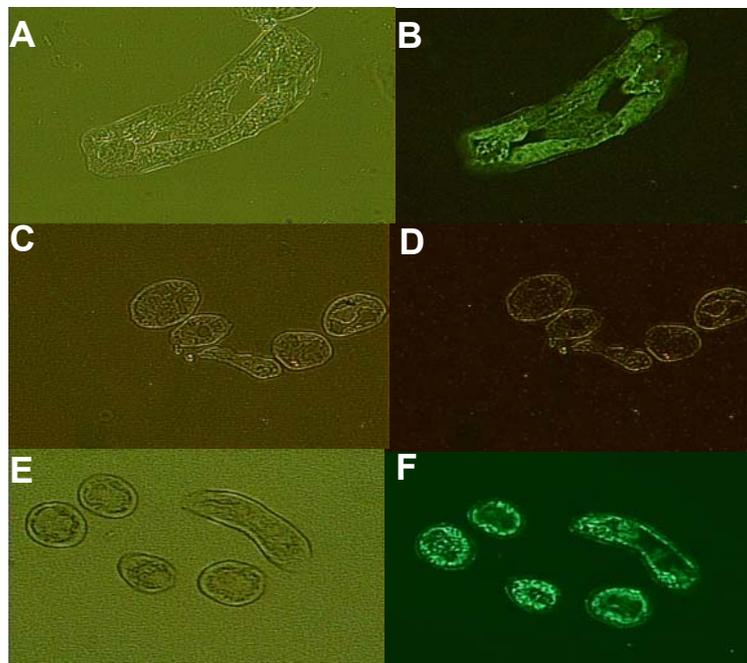


Figura 20. Análisis por IIF del reconocimiento del epitopo nativo p43⁽²¹⁰⁻²³⁹⁾ a nivel de estructuras internas de la LM de *T. spiralis* por los anticuerpos anti-p43⁽²¹⁰⁻²³⁹⁾. Crio-secciones de: A-B) LM incubada con suero inmune (control positivo), C-D) LM incubada con suero preinmune (control negativo), y E-F LM con suero anti-p43⁽²¹⁰⁻²³⁹⁾. A, C y E corresponde al contraste de fases; B, D y F corresponde a epifluorescencia. Se usaron los mismos sueros especificados en la figura 19 y se reveló con anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado a FITC en dilución 1:100.

Curvas de crecimiento

Con la finalidad de observar un posible efecto en la viabilidad de las cepas de *Salmonella* transformadas con los plásmidos, así como el determinar la fase logarítmica de crecimiento se procedió a realizar curvas de crecimiento con las cepas que se usaron para inmunizar vía i.n. a los animales. Se analizó el comportamiento del crecimiento de las cepas de *Salmonella* que contienen a los plásmidos *pENP-01* y *pAg30*. La fase logarítmica se alcanza a las 4 h y se completa a las 6 h para el caso de la cepa *pENP-01*; mientras que para la cepa *pAg30*, esta fase tiene lugar de las 4.5 h y concluye a las 7 h. Lo anterior se

tomó en cuenta para ajustar el número de unidades formadoras de colonias (UFC) para inmunizar a los ratones BALB/c. De esta manera, previo a realizar el esquema de inmunización, se creció primero la cepa *pAg30* y una hora después la cepa *pENP-01* (fig. 21).

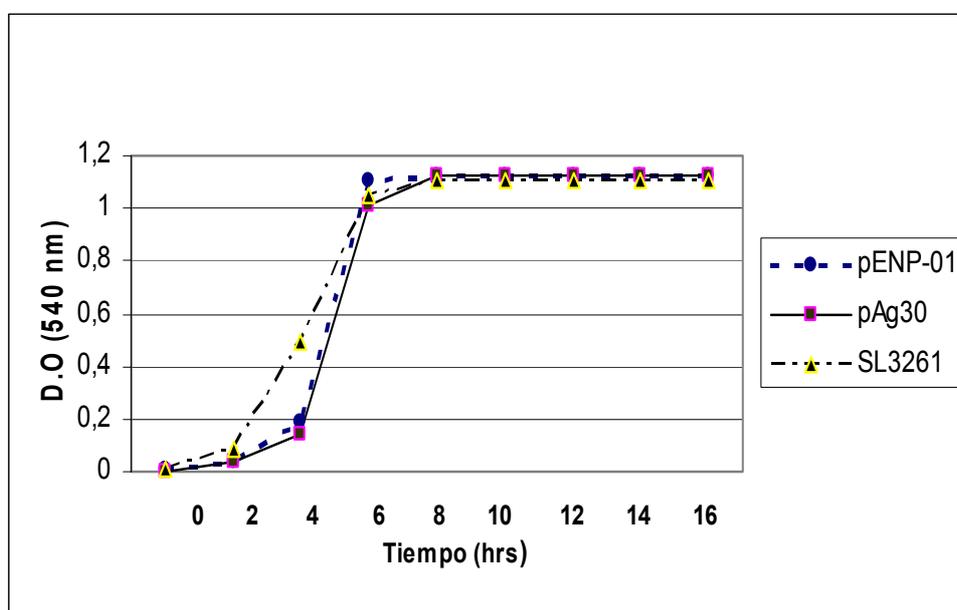


Figura 21. Curva de crecimiento bacteriano de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium SL3261.

Cinética de expresión de las proteínas de fusión

Otro de los parámetros relevantes a considerar antes de llevar a cabo la inmunización de los ratones, es que la bacteria acarreadora de péptidos heterólogos produzca la proteína en suficiente cantidad y en la fase logarítmica, ya que es en esta etapa de crecimiento bacteriano donde se recuperan las bacterias para inmunizar a los animales. En la figura 22 se muestra que la producción de las proteínas quiméricas codificadas por los plásmidos *pENP-01* y *pAg30* (que codifica para $p43^{(210-239)}$), es detectable a partir de las 6 h de crecimiento, tiempo que coincidió con la fase logarítmica de crecimiento. Por otra parte, es posible observar que existen algunas diferencias en cuanto a tamaño de las bandas correspondientes a las proteínas de fusión codificadas por los plásmidos *pENP* y *pAg30* a las 6 y a las 10 horas de crecimiento. De hecho, a las 10 horas existe una ligera disminución del tamaño de la banda

correspondiente a la proteína de fusión. Lo anterior se debe a que en el citoplasma los ATs son producidos como una pre-pro-proteína (Desvaux et al., 2004), posteriormente estas proteínas de fusión se encuentran como preproteínas (ya que contienen la secuencia señal de tráfico fusionada al AT ShdA), y finalmente son translocadas hacia la superficie bacteriana una vez que la secuencia señal de la LTB es cortada a nivel de periplasma. Al final, el AT ShdA, permanece anclado a la membrana celular externa, siendo el epitopo de interés y el péptido FLAG, las únicas regiones expuestas en la superficie bacteriana sin ser secretadas.

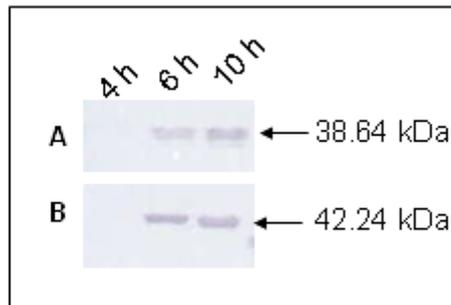


Figura 22. Determinación de la cinética de expresión de las proteínas de fusión de *Salmonella enterica* serovar typhimurium SL3261 en el transcurso de 10 horas empleando Western-blot. Expresión de: A) FLAG-PENP, B) FLAG-p43(210-239). Se usó anticuerpo primario anti-FLAG 1:250 y para el revelado anti-IgG de ratón conjugado con HRP en dilución 1: 500.

Ensayos de protección

La reducción de la carga parasitaria del adulto de *T. spiralis* a nivel intestinal resulta de gran utilidad como medida directa de los niveles de protección inducidos por *Salmonella enterica* serovar Typhimurium SL3261, como acarreador del epitopo heterólogo p43⁽²¹⁰⁻²³⁹⁾. Diez días después de la última inmunización i.n. con el acarreador, se procedió a retar a los animales con 300 LM de *T. spiralis*, administradas por vía i.g. Ocho días posteriores al reto, se recuperaron los parásitos adultos, de acuerdo a lo descrito por McGuire et al., (2002). La figura 23 muestra los resultados de las cargas parasitarias de los grupos de animales a los 8 días p.i. Los animales inmunizados i.n. con la cepa pAg30 mostraron una reducción del 61.83 % (86.25 parásitos adultos

± 19.62) con respecto al grupo control de infección (226 parásitos adultos ± 35.45); esta reducción resultó estadísticamente significativa ($p < 0.001$). Los grupos controles tratados con vehículo de inmunización (PBS) y con la cepa *pENP-01*, sólo mostraron una reducción del 18.14 % y 24.55 % respectivamente, las cuales no son estadísticamente significativas con respecto al control ($p = 0.061$, $p = 0.007$). Tampoco se encontró diferencia estadísticamente significativa entre estos 2 últimos grupos controles ($p = 0.787$).

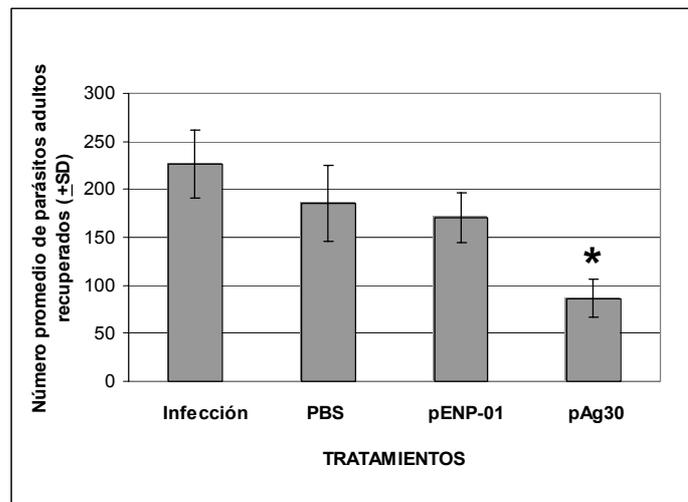


Figura 23. Niveles de protección generados por *Salmonella entérica serovar Typhimurium SL3261* acarreando el epítipo heterólogo p43⁽²¹⁰⁻²³⁹⁾ de *T. spiralis*. Número parásitos adultos de *T. spiralis* recuperados a los 8 d.p.i. (promedio \pm SD). Grupos de ratones BALB/c ($n = 8$) fueron desafiados con una carga parasitaria de 300 LM después de haber sido inmunizados vía i.n. con *Salmonella* portando los diferentes plásmidos. (*)Grupo con una reducción estadísticamente significativa de la carga parasitaria intestinal ($p < 0.005$), con respecto a los grupos controles de infección natural e inmunización con vehículo.

Respuesta inmune contra el acarreador y contra el epítipo heterólogo

Para evaluar si el acarreador de epítipos heterólogos *Salmonella enterica* serovar Typhimurium era capaz de inducir una respuesta de tipo humoral en los animales inmunizados por vía i.n., se realizó un ensayo de ELISA empleando bacteria completa como antígeno y los sueros a una dilución 1:100. Se determinaron lecturas ópticas a 450 nm correspondientes a la IgG total de los días 0, 15, 30 y 45 del esquema de inmunización (fig. 24). Se puede apreciar un aumento significativo de IgG total sérica desde el día 30, pero más evidente al día 45 ($p = 0.006$), tanto en los sueros de animales inmunizados con la cepa que contiene al plásmido *pENP-01*, como en los sueros de los ratones inmunizados con la cepa *pAg30*, no así en los sueros de los

animales que recibieron tratamiento con PBS como vehículo de inmunización. Estos resultados demuestran la generación de una respuesta inmune humoral en contra del acarreador bacteriano aunque por los tiempos analizados, no se pudo determinar el momento en el cual los anticuerpos declinan.

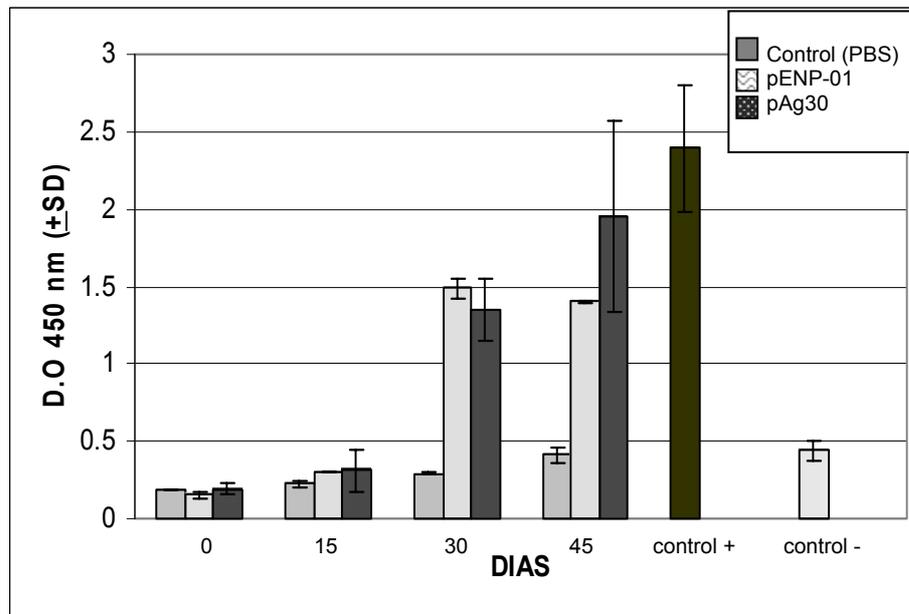


Figura 24. Valores de D.O obtenidas de los ensayos de ELISA para determinar IgG total contra el acarreador *Salmonella entérica serovar Typhimurium SL3261* durante 45 días previos al reto con el parásito . Se usó bacteria completa como antígeno total. Los sueros se usaron en una dilución de 1:100. Se revelaron Los anticuerpos anti-CHA se evaluaron por ELISA. Las D.O. Todos los sueros se diluyeron 1:100 y se revelaron con anticuerpo secundario anti-IgG de ratón (H+L) acoplado a HPO en dilución 1: 1000. El grupo control de inmunización corresponde al grupo inmunizado solo con vehículo (PBS). Por otra parte, se incluyen 2 sueros control negativo (preinmune) y control positivo (inmune de ratón con 28 días de infección con el parásito).

Por otra parte, para evaluar la IgG total y los isotipos IgG1, IgG2a e IgG2b generados por la forma recombinante del epítipo p43⁽²¹⁰⁻²³⁹⁾ (expresado en la superficie del acarreador bacteriano de *Salmonella* SL3261) se realizaron ensayos de ELISA, en los cuales se emplearon ET de LM de *T. spiralis* y péptido sintético p43⁽²¹⁰⁻²³⁹⁾ como antígenos. Para llevarlo a cabo, primero se realizó este ensayo para evaluar a los sueros de animales inmunizados con *Salmonella* SL3261 que porta el plásmido *pENP-01* (el cual no codifica para p43⁽²¹⁰⁻²³⁹⁾). Al día 45 del esquema de inmunización, las lecturas ópticas correspondientes a los sueros que se incubaron con ET del parásito resultaron bajas con respecto al control positivo (suero inmune de ratón con 28 días de infección) y

comparables al control negativo (suero preinmune) (fig. 25 A). Resultados similares se obtuvieron al incubar los mismos sueros con el péptido sintético p43⁽²¹⁰⁻²³⁹⁾ a los días 0, 15, 30 y 45 del esquema de inmunización. Estos resultados demuestran que no existe un reconocimiento inespecífico por parte de los isotipos anteriormente señalados dirigidos contra la p43⁽²¹⁰⁻²³⁹⁾ (fig. 25 B).

Por otra parte, se determinaron las densidades ópticas correspondientes a la IgG total, IgG1, IgG2a e IgG2b en contra del ET del parásito (fig. 26 A) y del péptido sintético p43⁽²¹⁰⁻²³⁹⁾ (fig. 26 B) en los sueros de los animales inmunizados con *Salmonella* que expresa al epítipo p43⁽²¹⁰⁻²³⁹⁾; en ambos experimentos se registró un incremento progresivo en las lecturas ópticas de IgG total sérica a partir del día 15 hasta el día 45 de inmunización. No se determinó en qué momento estos anticuerpos declinan. De manera interesante estos resultados sugieren que gran parte de respuesta humoral de IgG total parece estar dirigida contra p43⁽²¹⁰⁻²³⁹⁾ en el modelo de estudio. En contraste, los isotipos IgG1 e IgG2b no se incrementaron de manera importante durante el esquema de inmunización. Sin embargo, la IgG2a de los sueros incubados con ET de LM de *T. spiralis* se incrementó ligeramente al día 45 del esquema de inmunización (fig. 26 A). Por su parte, la IgG2a de los sueros incubados con péptido sintético p43⁽²¹⁰⁻²³⁹⁾ aumentó desde el día 30 pero disminuyeron al día 45 del esquema de inmunización. De manera interesante, las lecturas ópticas correspondientes a todos los isotipos estudiados muestran datos muy similares a las lecturas ópticas correspondientes al suero control positivo. (Fig. 26 B).

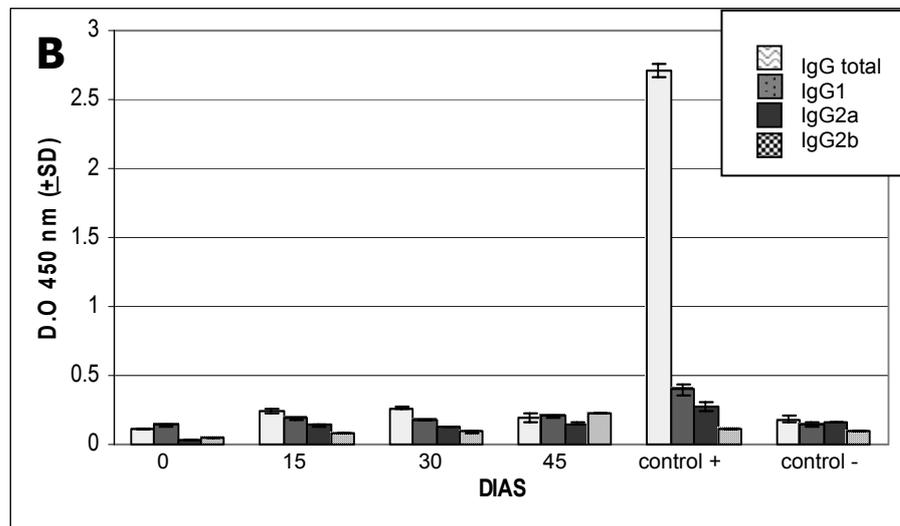
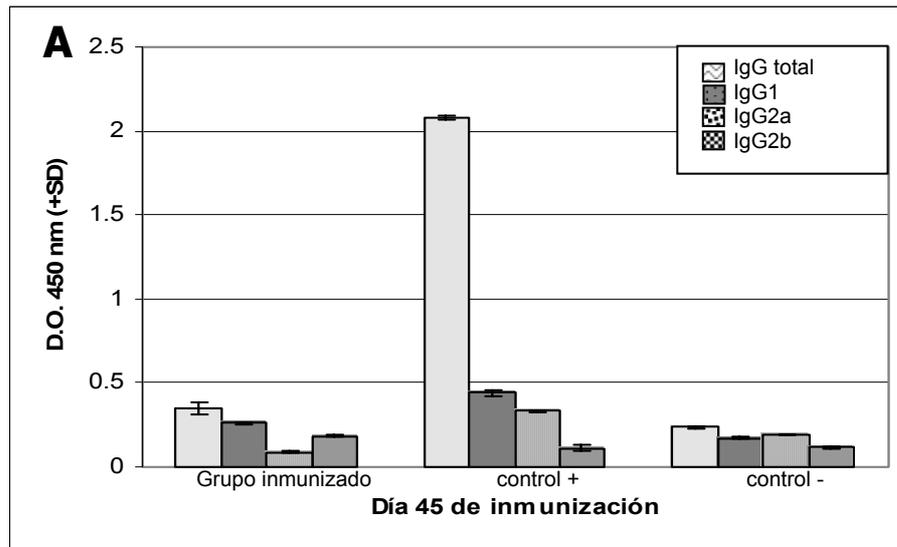


Figura 25. Respuesta de IgG total, IgG1, IgG2a e IgG2b en sueros de ratones BALB/c inmunizados con *Salmonella entérica serovar Typhimurium SL3261* que porta el plásmido *pENP-01*. (A) Lecturas ópticas de los diferentes isotipos de IgG dirigidos contra: (A) ET de *T. spiralis* al día 45 de inmunización. (B) Nivel de anticuerpos dirigidos contra el péptido sintético p43(210-239) durante los días 0, 15, 30 y 45 de inmunización. Los anticuerpos anti-ET se evaluaron por ELISA. Todos los sueros se diluyeron 1:100 y se revelaron con anticuerpo secundario anti-IgG de ratón (H+L) acoplado a HPO en dilución 1: 1000.

Finalmente, la figura 27 representa la respuesta de IgG total presente en los sueros de los animales inmunizados con cepas de *Salmonella* acarreando los diferentes plásmidos, que reconocieron al péptido sintético p43⁽²¹⁰⁻²³⁹⁾. En conjunto, estos resultados sugieren que la respuesta humoral está dirigida en gran parte en contra del epítipo en estudio. Sin embargo, sería de gran utilidad

realizar un estudio de inhibición para reforzar este hallazgo, además de evaluar otros péptidos de la p43, así como estudiar la memoria a largo plazo de estos anticuerpos.

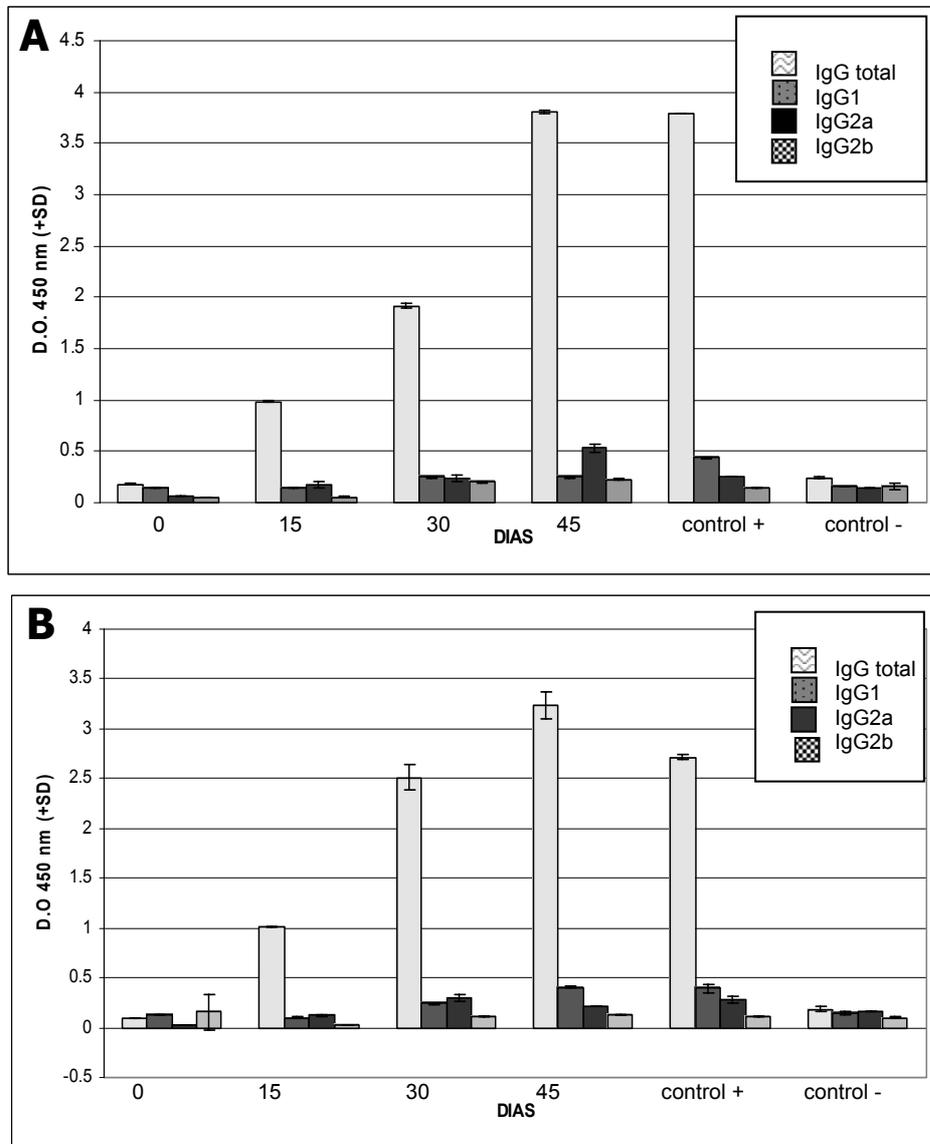


Figura 26. Respuesta de IgG total, IgG1, IgG2a e IgG2b en sueros de ratones BALB/c inmunizados con *Salmonella* pAg30. (A) Anticuerpos dirigidos contra el ET de la LM de *T. spiralis* y (B) Lecturas ópticas de los anticuerpos contra el péptido sintético p43(210-239). Los sueros se colectaron a los días 0, 15, 30 y 45 del esquema de inmunización. Los anticuerpos se evaluaron por ELISA. Todos los sueros se diluyeron 1:100 y se revelaron con anticuerpo secundario anti-IgG de ratón (H+L) acoplado a HPO en dilución 1: 1000.

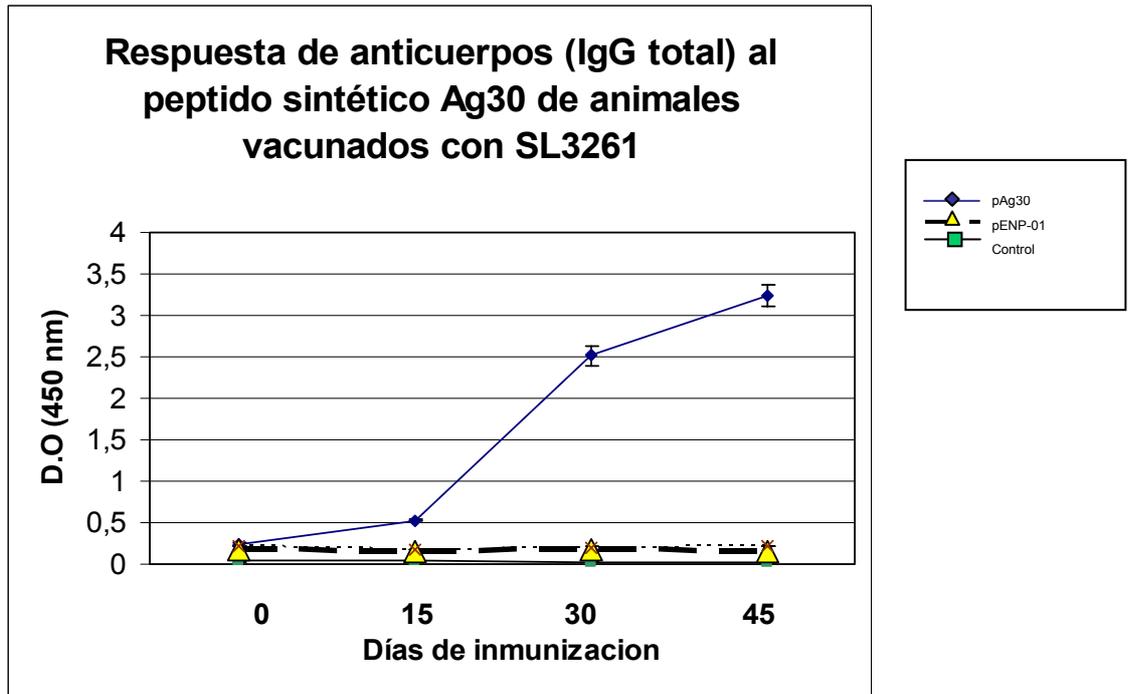


Figura 27. Especificidad de la IgG total de sueros de ratones BALB/c inmunizados con las diferentes cepas de *Salmonella* y contra el péptido sintético p43⁽²¹⁰⁻²³⁹⁾. El reconocimiento específico se evaluó mediante ELISA, usando p43⁽²¹⁰⁻²³⁹⁾ sintético a una concentración de 5 µg/mL; mientras que los sueros en estudio se diluyeron 1:100 y se revelaron con anticuerpo secundario anti-IgG de ratón (H+L) acoplado a HPO en dilución 1: 1000. Se incluyó suero control de animales que recibieron únicamente tratamiento con PBS.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La vacunación constituye la herramienta más efectiva para la profilaxis de las enfermedades infecciosas (Levine y Sztein, 2004). Muchos patógenos ganan acceso al huésped mediante el tránsito por las mucosas en las primeras etapas de la infección. Por lo tanto, la generación de una respuesta inmune eficiente a este nivel resulta de gran interés. Existen diferentes estrategias para liberar ó exponer el antígeno a nivel de mucosas, entre las cuales se encuentra el uso de acarreadores bacterianos. A este respecto, la utilización de *Salmonella spp.*, como acarreador de epítopos heterólogos con fines de vacuna ha permitido la generación de una respuesta hacia el patógeno mismo, así como una respuesta específica hacia el antígeno heterólogo (Medina y Guzmán, 2001). Al igual que *Shigella*, *Salmonella* estimula el sistema inmune innato y tiende a ser modestamente inmunogénica, además puede ser administrada en las mucosas para generar una amplia respuesta inmune humoral y celular (Levine y Sztein, 2004).

En principio, todas aquellas proteínas que son secretadas también se exponen al sistema inmune del huésped y por lo tanto representan excelentes candidatos en el desarrollo de vacunas. Es importante que el epítipo sea accesible al sistema inmune, ya sea como epítipo conformacional ó lineal expresado en la superficie (Dalton et al., 2003). La aplicación de la tecnología del DNA recombinante para el estudio de los parásitos gastrointestinales, inicialmente requiere una gran esfuerzo para identificar moléculas y vías de señalización en la respuesta inmune contra el parásito. Sin embargo, la complejidad de los datos obtenidos con estos procedimientos, requiere de una cuidadosa selección de los sistemas biológicos que permitan la obtención de información útil y que permita entender los mecanismos que se generen durante la respuesta inmune (Newton y Meeusen, 2003). Es posible que los enfoques para controlar las infecciones gastrointestinales producidas por parásitos, ya sea mediante vacunación con antígenos recombinantes o uso de inmunoterapia pasiva tienen más perspectivas de generar un conocimiento detallado acerca de la respuesta inmune del huésped, así como en la selección

de aquellos antígenos protectores. Generalmente, el tracto gastrointestinal, responde pobremente a antígenos "no vivos", lo cual debe considerarse en el diseño de una vacuna (McDonald, 2003). Además se debe seleccionar un epítipo ó antígeno que genere protección. En relación con *T. spiralis*, se han realizado estudios en los cuales se han inmunizado ratones NIH con péptidos sintéticos derivados de productos de excreción y secreción, mostrando diferentes grados de protección (Robinson et al., 1995a; McGuire et al., 1992).

Por esta razón se diseñó un sistema de expresión en *Salmonella*, que permitiera la expresión de un epítipo (péptido derivado de la p43) en la superficie bacteriana, mediante el AT ShdA. Por un lado, esta forma de exposición del epítipo favorecería una respuesta tipo humoral a nivel de mucosas, las cuales tienen un importante papel en una infección por helmintos gastrointestinales y por otro lado, se favorecería la producción en cantidades suficientes de la proteína recombinante *in vivo*. Cabe mencionar que, aunque ShdA de *Salmonella enterica*, se describió inicialmente como un factor de colonización (Kingsley et al., 2000; 2002; 2003; 2004a; 2004b), tiene otras funciones relevantes para la persistencia de la bacteria a nivel intestinal. Nuestro interés con respecto a esta proteína se centró únicamente en utilizar su dominio translocador. Así en este contexto, no se consideró a las secuencias adyacentes, tales como el péptido señal y el dominio pasajero (de unión a fibronectina) en la construcción de los plásmidos. Recientemente se construyeron en nuestro grupo de trabajo, diferentes formas acotadas del dominio α ($\Delta\alpha$), conservando todo el dominio translocador (Osorio-León, 2003; Pompa-Mera et al., *manuscrito en preparación*). De estas formas acotadas, la denominada A (ShdA-A) (AF140550, bases: 5161-6103, 314 aminoácidos), mostró una mejor eficiencia para presentar en la superficie de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, el epítipo inmunodominante NANP de *P. falciparum*. Por esta razón, se eligió a esta forma acotada, como una herramienta para translocar hacia la superficie bacteriana, péptidos y/o proteínas heterólogas de importancia inmunológica. Por otra parte, para asegurar el destino hacia la membrana externa de la bacteria, fue necesario

considerar a la secuencia señal de tráfico de la subunidad B de la toxina termolábil (LTB) de *E. coli* ETEC, con la finalidad de asegurar la translocación de la proteína de fusión hacia el periplasma de la bacteria y hacia la membrana externa. Esta secuencia Sec-dependiente, ha sido ampliamente usada por nuestro grupo de trabajo (Ruiz- Pérez F, 2002). Por su parte, el promotor de la nitrato reductasa (*nir B*), el cual es inducible en anaerobiosis y en condiciones microaerofílicas (Chatfield, 1992), permitió la expresión de todas las proteínas de fusión bajo condiciones reductoras y microaerofílicas. El empleo de esta estrategia supone que este promotor permite la expresión de la proteína recombinante *in vivo*, ya que la bacteria encuentra un ambiente microaerófilo en las mucosas, incluyendo las del intestino. También es importante señalar que para evaluar todas las proteínas de fusión, se requirió de subclonar el péptido bandera FLAG, ya que se encuentra comercialmente disponible anticuerpos contra éste péptido.

Para evaluar la funcionalidad de nuestro sistema de expresión, fué necesario detectar la presencia de las proteínas de fusión LTB-FLAG-pENP-ShdA-A y LTB-FLAG-(p43⁽²¹⁰⁻²³⁹⁾)-ShdA-A usando técnicas de SDS-PAGE y Western-blot con extractos totales de *E. coli* DH5a y *Salmonella enterica* serovar Typhimurium SL3261. El nivel de expresión fué eficiente en ambas cepas bacterianas, ya que se obtuvieron las mismas características en cuanto a tamaño molecular y patrón de migración en los ensayos de SDS-PAGE y Western-blot en ambos tipos de bacteria. Otro de los aspectos importantes a evaluar de nuestro sistema fué la translocación de p43⁽²¹⁰⁻²³⁹⁾ hacia la superficie bacteriana a través del AT ShdA-A (el cual se inserta en la membrana externa), para este objetivo, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia indirecta (IIF) y citometría de flujo. Los resultados demuestran de nuevo que en ambos tipos de bacteria, la proteína de fusión que contiene al péptido FLAG es translocada eficientemente hacia la superficie bacteriana mediante el autotransportador ShdA-A. De hecho, la cepa de *Salmonella* que expresó en mayor grado la proteína de fusión, correspondió a la que portaba el plásmido que codificaba para el epítipo p43⁽²¹⁰⁻²³⁹⁾. Ninguna de las construcciones, ni la subclonación

del epítipo p43⁽²¹⁰⁻²³⁹⁾, tuvo efecto letal sobre la viabilidad bacteriana, como pudo apreciarse en las curvas de crecimiento, pero cabe aclarar que la cepa pAg30 tiende a retrasarse 30 minutos para alcanzar la fase logarítmica. Por esta razón se ajustaron tiempos durante el crecimiento bacteriano, ya que esto determina directamente la cantidad de UFC necesarias para generara un mayor título de anticuerpos (Galen et al., 1997; Pasetti M et al., 2000). De hecho para la inmunización intranasal se requiere de 1×10^8 a $1-4 \times 10^9$ UFC de cada una de las cepas de *Salmonella* (Galen et al., 1997). Por debajo de esta cifra la respuesta de anticuerpos es pobre, por el contrario, 1×10^{10} UFC representa una dosis letal (Pasetti M et al., 2000).

Por otra parte, las proteínas de fusión se producen originalmente para facilitar la obtención y purificación de la proteína heteróloga (Bayneyx et al., 1999), pero también deben de ser exhaustivamente analizadas, sobre todo para probar la conservación de sus propiedades estructurales, conformacionales, enzimáticas e inmunogénicas (Dalton et al, 2003). A este respecto, la proteína de fusión que contiene a p43⁽²¹⁰⁻²³⁹⁾, generó anticuerpos en ratones BALB/c que reconocieron a la glicoproteína p43 nativa presente en el ET de *T. spiralis*, tal como pudo apreciarse en los ensayos tipo western-blot, indicando que el epítipo p43⁽²¹⁰⁻²³⁹⁾ aún en su forma recombinante, conservó sus propiedades inmunogénicas. Adicionalmente, los anticuerpos anti-p43⁽²¹⁰⁻²³⁹⁾ reconocieron moléculas de peso de superior, las cuales parecen estar inmunológicamente relacionadas. Sin embargo, este reconocimiento fue de menor intensidad. Otros autores, han realizado estudios en los cuales, extractos nucleares de células infectadas con *T. spiralis*, fueron aislados y probados con anticuerpos dirigidos únicamente en contra de la p43, encontrándose reactividad con cuatro proteínas de cuyos pesos fueron de 71, 79, 86 y 97 kDa (Jasmer DP, 1994). Lo anterior llevó a la posibilidad de que algunos de los antígenos nucleares deriven en los productos de excreción/secreción (ESP), sin embargo esto implicaría la existencia de modificaciones de los ESP, resultando en un peso molecular mayor en la célula huésped. Otra posibilidad que aún no ha sido explorada es si diferentes moléculas de los ESP comparten ciertos epítipos.

Interesantemente, los sueros contra la forma recombinante de p43⁽²¹⁰⁻²³⁹⁾, reconocieron epítomos a nivel de superficie de la LM del parásito y a nivel de estructuras internas, particularmente los α -esticocitos, que son responsables de sintetizar los productos tivelosilados. Estos datos sugieren la posibilidad de que aún en su forma recombinante, el epítomo conserva sus propiedades inmunogénicas.

La respuesta inmune del huésped limita y en algunos casos elimina las infecciones producidas por nemátodos. No obstante, estos responden con una amplia variedad de estrategias, contrarrestando los mecanismos efectores del huésped (Maizels et al., 1993). De esta manera, la relación entre los nemátodos y la respuesta inmune del huésped puede ser vista como la interacción entre dos fuerzas opositoras en donde los nemátodos activamente intentan persistir. Sin embargo, desde la otra arista los efectos de la respuesta inmune del huésped sobre el nemátodo, pueden ser evaluadas en base a la reducción de la fecundidad, sobrevivencia, tamaño, pérdida de la capacidad de invasión y en última instancia, reducción de la carga parasitaria como resultado de la expulsión (Viney, 2002). En el caso de *T. spiralis*, existen estudios en los que ha quedado demostrado que se puede generar protección parcial usando antígenos de la LM de *T. spiralis*. En estos estudios se ha evaluando la carga parasitaria intestinal como medida directa de los niveles de protección (Gamble et al., 1985; Ortega-Pierres et al., 1989; McGuire et al., 2002).

En el presente estudio, evaluamos la capacidad de *Salmonella entérica* serovar Typhimurium, que expresa en la superficie el epítomo heterólogo p43⁽²¹⁰⁻²³⁹⁾ de *T. spiralis* para generar inmunidad y protección contra el parásito a nivel intestinal. Una de las ventajas que ofrece la vacunación con los acarreadores es que se puede eliminar el uso de adyuvante, ya que algunos de los componentes de la pared celular bacteriana pueden actuar como inmunomoduladores; lo cual significa que representa una alternativa sencilla y relativamente económica (Ellis, 1999; Medina y Guzmán, 2000; Garmory, 2002). Más aún, la inmunización por vía i.n. con *Salmonella* genera títulos mucho mayores de anticuerpos dirigidos contra el epítomo heterólogo que

aquellos títulos de anticuerpos generados después de la inmunización por vía i.g. (Galen, et al., 1997). Por otro lado, la inmunización i.n puede generar una respuesta de tipo humoral caracterizada por IgG sistémica e IgA de secreción en las mucosas (Jones et al., 2001). En base a estos antecedentes, se llevó a cabo un esquema de inmunización por vía i.n. con el acarreador bacteriano que expresa el epítipo p43⁽²¹⁰⁻²³⁹⁾. Al concluir nuestro esquema de inmunización, se encontró que la carga parasitaria se redujo de manera significativa al día 8 p.i., hasta en un 61.83 % con respecto al control de infección solo ($p < 0.001$). McGuire y colaboradores (2002) emplearon el péptido sintético p43⁽²¹⁰⁻²³⁹⁾ de *T. spiralis* en conjunto con la CTB para inmunizar ratones por vía i.n. Los autores realizaron 6 inmunizaciones, cada una con 100 µg del péptido, logrando una reducción de la carga parasitaria estadísticamente significativa al día 8 p.i. En contraste con nuestros resultados, es posible que la acción inmunomoduladora de todos los componentes bacterianos tenga un efecto mayor que la del adyuvante CTB solo. De hecho, el efecto adyuvante de la CTB consiste en aumentar la inmunogenicidad del antígeno, resultando en una masiva infiltración de células mononucleares en pulmón y activando a nivel sistémico una respuesta de tipo Th2, con producción de IL-4, citocina estrechamente relacionada con el proceso de expulsión del adulto de *T. spiralis* (Laurence et al., 1998). De hecho, la inmunización del péptido p43⁽²¹⁰⁻²³⁹⁾ con CTB resultó en una respuesta de tipo Th2 (McGuire et al., 2002). Sin embargo, la LTB resulta ser un mejor adyuvante de mucosas que la CTB, pero principalmente estimula la respuesta de tipo Th1 (Jones et al., 2001; Yamamoto et al., 2001).

Es posible que la reducción de la carga parasitaria observada en el presente estudio, se deba al bloqueo de un epítipo muy importante implicado en la penetración del parásito. Este epítipo forma parte de un producto tivelosilado, perteneciente a la familia de los TSL-1 (Ortega-Pierres et al., 1996). Aunque la tivelosa es la porción inmunodominante de los antígenos glicoproteicos de *T. spiralis* se ha demostrado que ésta no tiene un efecto protector a nivel intestinal (Goyal et al., 2002). Otros estudios sugieren que es la parte peptídica de los antígenos tivelosilados la responsable de generar

protección, por ejemplo, dos regiones peptídicas de la glicoproteína de 43 kDa (40-80 y 210-230) son protectoras, mientras que aquellas regiones glicosiladas no lo son (Robinson et al., 1995a, 1995b; McGuire et al., 2002). Sin embargo, los antígenos sintéticos son menos inmunogénicos que las vacunas inactivadas ó el extracto total, salvo en los casos en donde se recurre al uso de un adyuvante (Deville et al., 2005); de hecho algunas pruebas de vacunación contra *T. spiralis* parecen haber sido completadas con éxito en ratones, usando extracto total (ET) (Sun et al., 1994; Raefa et al., 1996). Destacan también el uso de los productos de expresión/secreción de la LM del parásito dentro de microcápsulas hechas de copolímero (Dea-Ayuela et al., 2006) y la vacunación con DNA que inducen una respuesta de tipo humoral (Wang, et al., 2006).

Los resultados en este estudio muestran que se generaron anticuerpos de la clase IgG total contra *Salmonella*. Por su parte, *Salmonella* atenuada es particularmente prometedora entre los diversos vectores vivos debido a su capacidad para estimular una amplia variedad de respuesta inmune cuando ésta es usada para inmunizar vía superficie de las mucosas (González CR, 1998; Chatfield SN, 1992). Cuando *Salmonella enterica* serovar Typhimurium SL3261 es administrado oralmente a ratones induce una respuesta inmune a proteínas heterólogas, pero que administrado i.n. genera títulos mucho más elevados (Galen et al., 1997). Esta es la razón por la cual se eligió la vía i.n. para inmunizar a los animales en el presente trabajo. Se observaron elevados niveles de IgG total contra el acarreador mismo, así como en contra del péptido heterólogo, los cuales se incrementaron significativamente al día 30 (entre la 2ª y 3ª inmunización) pero debido a los tiempos evaluados, no se determinó el momento al cual declinan. Los animales vacunados con las cepas *pENP-01* y *pAg30* mostraron lecturas óptica de IgG total muy similares, lo que demuestra que ambas cepas generaron una respuesta contra el acarreador independientemente del péptido heterólogo que éstas producen.

Por otro lado, el tipo de respuesta humoral en contra del péptido heterólogo resulta de gran importancia para evaluar la utilidad del acarreador

bacteriano con fines de vacuna. Nuestros datos muestran una gran la presencia de IgG total específica contra el péptido sintético p43⁽²¹⁰⁻²³⁹⁾. Sin embargo se evidenció una pobre respuesta de IgG2a e IgG2b contra este péptido, contrario a lo reportado por McGuire y colaboradores (2002). No obstante, se observó que la IgG2a específica de p43⁽²¹⁰⁻²³⁹⁾, se incrementa al día 30 (25 días después de haber iniciado el esquema de inmunización) y disminuyen al día 45. Además se observó un incremento de IgG1 específica de p43⁽²¹⁰⁻²³⁹⁾ hacia el día 45, cuyos valores de D.O. resultaron similares a los obtenidos con el suero de infección. Desafortunadamente, se desconocen los niveles de estos isotipos previos al reto. Sin embargo, se sabe que la respuesta de tipo humoral mediada por IgG1 relacionada con Th2, resulta en la expulsión del parásito adulto. Nuestros resultados de protección (61.8% de reducción de la carga parasitaria), sugieren que en los días previos al reto con el parásito, los anticuerpos de la clase IgG1 eran los predominantes y se ha asociado este isotipo a la expulsión del adulto. No obstante, es recomendable determinar la presencia de este isotipo al momento del desafío y al 8 p.i., así como la titulación de estos sueros.

Es interesante notar la IgG total detectada en los animales inmunizados con el acarreador cepa pAg30, parece estar dirigida en gran parte hacia el péptido p43⁽²¹⁰⁻²³⁹⁾ recombinante. Sin embargo, para precisar la reactividad de estos isotipos de IgG sería de gran utilidad la realización de un ensayo de inhibición, así como evaluar otros antígenos, especialmente aquellos con tamaño molecular mayor que la p43 y que también forman parte de los productos de expresión/secreción.

Por otro lado el epítipo presente en p43 podría estar relacionado inmunológicamente con otros epítipos de los antígenos y productos de expresión/secreción de mayor peso molecular. Este hallazgo parece reforzar la hipótesis de Jasmer y colaboradores (1994); aunque es necesario obtener mayor evidencia experimental a este respecto. Interesantemente, el epítipo nativo p43⁽²¹⁰⁻²³⁹⁾ en el parásito no se encuentra tivelosilado, pero si está localizado entre dos epítipos que poseen 2 motivos de tivelosa (Vassilatis et al.,

1992). De hecho la tivelosa (Wisnewski et al., 1993) confiere inmunogenicidad a las glicoproteínas, pero los anticuerpos que induce no juegan un papel importante en la protección contra los estadíos intestinales de *T. spiralis* (Goyal et al., 2002). La tivelosa ó las proteínas a las cuales se une desempeñan una función crítica en la supervivencia del parásito dentro del huésped, ya que los anticuerpos anti-tivelosa de la clase IgG protegen al epitelio de la invasión (McVay et al., 1998; Bolas-Fernandez F et al., 2006). Nuestros resultados correlacionan con la idea propuesta por Jarvis y colaboradores (1992), acerca de que la tivelosa no parece ser esencial para la protección, puesto que en este trabajo se clonó y se demostró que un epítipo de naturaleza peptídica, expuesto en la superficie de un acarreador, redujo la carga parasitaria casi en un 62%.

Finalmente, sería muy interesante conocer el papel del epitopo p43⁽²¹⁰⁻²³⁹⁾, en la penetración e invasión de células epiteliales por el parásito durante la fase intestinal de la infección.

CONCLUSIONES

1. Los datos presentados en este trabajo demuestran y confirman la utilidad de la forma acotada A del autotransportador ShdA de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, para translocar hacia la superficie bacteriana, el epitopo heterólogo p43⁽²¹⁰⁻²³⁹⁾ derivado de la glicoproteína de 43 kDa de *T. spiralis*.
2. Se demostró la funcionalidad *in vitro* del sistema de expresión para la producción de epítomos heterólogos, específicamente el p43⁽²¹⁰⁻²³⁹⁾ de *T. spiralis*, el cual pareció conservar sus propiedades inmunogénicas aún en su forma recombinante.
3. La inmunización intranasal con *Salmonella enterica* serovar Typhimurium SL3261 que expresa el epitopo p43⁽²¹⁰⁻²³⁹⁾ de *T. spiralis*, fué capaz de inducir una reducción de la carga parasitaria intestinal en un 61.83%.

PERSPECTIVAS

Evaluar la respuesta de tipo humoral generada a nivel intestinal en los animales vacunados con el acarreador bacteriano.

Evaluar la presencia de citocinas en el microambiente intestinal inducidas durante la vacunación con el acarreador bacteriano y previo al reto.

Determinar el papel del epítipo p43⁽²¹⁰⁻²³⁹⁾ en la invasión del epitelio intestinal.

Por otra parte, sería interesante estudiar la duración de la respuesta inmune generada en los animales inmunizados con el acarreador bacteriano.

Evaluar la participación de otros epítipos en la inducción de la respuesta inmune empleando el acarreador bacteriano.

BIBLIOGRAFIA

- Andersen DC & Krummen L. Recombinant protein expression for therapeutic applications. *Curr Opin Biotechnol.* 2002. 13(2):117-23.
- Angelakopoulos H, Hohmann EL. 2000. Pilot study of phoP/phoQ-deleted *Salmonella enterica* serovar Typhimurium expressing *Helicobacter pylori* urease in adult volunteers. *Infect. Immun.* 68:2135-2141.
- Appleton J, Romaris F. A pivotal role for glycans at the interface between *Trichinella spiralis* and its host. *Vet Parasitol.* 2001. 101(3-4):249-60.
- Appleton J, Usack L. Identification of potential antigenic targets for rapid expulsion of *Trichinella spiralis*. *Mol Biochem Parasitol.* 1993. 58(1):53-62.
- Arasu P, Ellis LA, Igelsias R, Ubeira FM, Appleton J. Molecular analysis of antigens targeted by protective antibodies in rapid expulsion of *Trichinella spiralis*. *Mol Biochem Parasitol.* 1994. 65(2):201-11
- Baneyx F. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol.* 1999. 10(5):411-21.
- Bellanti JA, Zeligs BJ, Vetro S, Pung YH, Luccioli S, Malavasic MJ, Hooke AM, Ubertini TR, Nencioni L. Studies of safety, infectivity and immunogenicity of a new temperature-sensitive (ts) 51-1 strain of *Salmonella typhi* as a new live oral typhoid fever vaccine candidate. *Vaccine.* 1993. 11(5):587-90.
- Benz I, Schmidt MA. AIDA-I, the adhesin involved in diffuse adherence of the diarrhoeagenic *Escherichia coli* strain 2787 (O126:H27), is synthesized via a precursor molecule. *Mol Microbiol.* 1992. 6(11):1539-46.
- Berzofsky JA, Ahlers JD, Belyakov IM. Strategies for designing and optimizing new generation vaccines. *Nat Rev Immunol.* 2001. 1(3):209-19.
- Bernardini ML, Mounier J, d'Hauteville H, Coquis-rondon M, Sansonetti PJ. Identification of icsA, a plasmid locus of *Shigella flexneri* that governs bacterial intra- and intercellular spread through interaction with F-actin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989. 86(10):3867-71.
- Blanc-Potard AB, Solomon F, Kaiser J, Groisman EA. The SPI-3 pathogenicity island of *Salmonella enterica*. *J Bacteriol.* 1999 Feb; 181(3):998-1004.
- Boireau P, Vayssier M, Fabien JF, Perret C, Calamel M, Soulé C. Characterization of eleven antigenic groups in *Trichinella* genus and identification of stage and species markers. *Parasitology.* 1997. 115 (Pt 6):641-51.
- Bolas-Fernández F. Biological variation in *Trichinella* species and genotypes. *J Helminthol.* 2003. 77(2):111-8
- Bolas-Fernández F, Del Corral-Bezara L. TSL-1 antigens of *Trichinella*: An overview of their potential role in parasite invasion, survival and serodiagnosis of trichinellosis. *Res Vet Sci.* 2006. *In press.*
- Calderón-Corona JP. *Evaluación de la respuesta inmune humoral inducida por antígenos recombinantes expresados en diferentes compartimentos de acarreadores bacterianos con fines vacunales.* Tesis de Licenciatura. Escuela de Ciencias Químicas. Universidad La Salle. 2004.

Campbell WC. Epidemiology I: Modes of transmission. In Campbell WC (Ed), Trichinella and Trichinosis. Plenum press. New York (London). 1983. 425-444.

Capó V, Despommier DD. Clinical aspects of infection with *Trichinella spp.* *Clin Microbiol Rev.* 1996. 9(1):47-54.

Capozzo AV, Cuberos L, Passetti M, Levine MM, Mucosally delivered Salmonella live vector vaccines elicit potent immune responses against a foreign antigen in neonatal mice born to naive and immune mothers. *Infect Immun.* 2004. 72(8):4637-46.

Carlisle MS, McGregor MD, Appleton JA. Intestinal mucus entrapment of *Trichinella spiralis* larvae induced by specific antibodies. *Immunology.* 1991. 74(3):546-51.

Casali N, Konieczny M, Schmidt A, Riley LW. Invasion activity of a *Mycobacterium tuberculosis* peptide presented by the *Escherichia coli* AIDA autotransporter. *Infect Immun.* 2002. 70(12):6846-52.

Chabalgoity JA, Dougan G, Mastroeni P, Aspinall RJ. Live bacteria as the basis for immunotherapies against cancer. *Expert Rev Vaccines.* 2002 Dec;1(4):495-505

Chan MS, Medley GF, Jamison D, Bundy DA. The evaluation of potential global morbidity attributable to intestinal nematode infections. *Parasitology.* 1994. 109 (Pt 3):373-87.

Charles I, Fairweather N, Pickard D, Beesley J, Anderson R, Dougan G, Roberts M. Expression of the Bordetella pertussis P.69 pertactin adhesin in Escherichia coli: fate of the carboxy-terminal domain. *Microbiology.* 1994. 140 (Pt 12):3301-8.

Chatfield, S. N., I. G. Charles, A. J. Makoff, M. D. Oxeer, G. Dougan, D. Pickard, D. Slater, and N. F. Fairweather. Use of the *nirB* promoter to direct the stable expression of heterologous antigens in *Salmonella* oral vaccine strains: development of a single-dose oral tetanus vaccine. *Biotechnology.* 1992. 10:888-892.

Chen H, and Schifferli DM. 2000. Mucosal and systemic immune responses to chimeric fimbriae expressed by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium vaccine strains. *Infect. Immun.* 68:3129-3139.

Colley DG, Lo Verde P, Savioli L. Infectious disease. Medical helminthology in the 21st century. *Science.* 2001. 293(5534):1437-8.

Cooper ES, Whyte-Alleng CA, Finzi-Smith JS, McDonald TT. Intestinal nematode infections in children: the pathophysiological price paid. *Parasitology.* 1992; 104 Suppl:S91-103.

Cornelissen AW, Schetters TP. Vaccines against protozoal diseases of veterinary importance. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 1996. 15(2-3):61-72.

Coutte L, Antoine H, Drobecq C, Loch F, Jacob-Dubuisson. Subtilisin-like autotransporter serves as maturation protease in a bacterial secretion pathway. *EMBO J.* 2001. 20(18):5040-8.

Covone MG, Brocchi M, Palla M, Diaz Da Silveira E, Rapuoli W, Galeotti CL. Levels of expression and immunogenicity of attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strains expressing *Escherichia coli* mutant heat-labile enterotoxin. *Infect Immun.* 1998. 66(1):224-31.

Curtiss III R, Kelly SM, Tinge MA, Tacket CO, Levine MM, Srinivasan J, Koopman M. Recombinant Salmonella vectors in vaccine development. *Dev Biol Stand.* 1994. 82:23-33.

Curtiss III R. Bacterial infectious disease control by vaccine development. *J Clin Invest.* 2002 Oct; 110(8):1061-6.

Dalton JP, Mulcahy G. Parasite vaccines: a reality? *Vet Parasitol.* 2001. 98(1-3):149-67.

Dalton JP, Brindley PJ, Knox DP, Brady CP, Hotez PJ, Donnelly S, O'Neill SM, Mulcahy G, Loukas A. Helminth vaccines: from mining genomic information for vaccine targets to systems used for protein expression. *Int J Parasitol.* 2003. 33(5-6):621-40.

Dalton JP. Helminths at mucosal barriers-interaction with the immune system. *Adv Drug Deliv Rev.* 2004. 19;56(6):853-68.

Dea-Ayuela M, Bolas-Fernández F. Trichinella antigens: a review. *Vet Res.* 1999. 30(6):559-71.

Dea-Ayuela M, Rama-Iñiguez S, Bolas-Fernández F. Vaccination of mice against intestinal *Trichinella spiralis* infections by oral administration of antigens microencapsulated in methacrylic acid copolymers. *Vaccine.* 2006. 24(15):2772-80.

Dennis DT, Despommier DD, Davis N. Infectivity of the newborn larva of *Trichinella spiralis* in the rat. *J Parasitol.* 1970. 56(5):974-7.

Despommier DD. How does *Trichinella spiralis* make itself at home? *Parasitol Today.* 1998. 14(8): 318-323.

Despommier DD. *Trichinella spiralis* and the concept of niche. *J Parasitol.* 1993. 79(4):472-82.

Despommier DD. *Trichinella spiralis*: the worm that would be virus. *Parasitol Today.* 1990. 6(6):193-6.

Despommier, D. D. 1983. Biology, p. 75–142. In W. C. Campbell (ed.), *Trichinella* and trichinosis. Plenum Press, New York.

Despommier D. Enzyme immunoassay for swine trichinellosis using antigens purified by immunoaffinity chromatography. *Am J Trop Med Hyg.* 1983. 32(6):1275-84.

Desvaux M, Parham NJ, Henderson IR. The autotransporter secretion system. *Res Microbiol.* 2004. 155(2):53-60.

Dietrich G, Griot-Wenk M, Metcalfe IC, Lang AB, Viret JF. Experience with registered mucosal vaccines. *Vaccine.* 2003. 21(7-8):678-83.

Deville S, De Pooter A, Jérôme Aucouturier, Lainé-Prade V, Cote M, Boireau P, Vallé I. Influence of adjuvant formulation on the induced protection of mice immunized with total soluble antigen of *Trichinella spiralis*. *Vet Parasitol.* 2005. 132(1-2):75-80.

Dougan G, Maskell D. 1989. Live attenuated *Salmonella* vaccines as carriers of antigens to the secretory and systemic immune system. (In: Liew FY. Vaccination strategies of tropical disease. CRC Press. Florida).

- Dunstan SJ, Simmons CP, Strugnell RA. Use of in vivo-regulated promoters to deliver antigens from attenuated *Salmonella enterica* var. Typhimurium. *Infect Immun*. 1999. 67(10):5133-41.
- Dupouy-Camet J. Trichinellosis: a worldwide zoonosis. *Vet Parasitol*. 2000. 93(3-4):191-200.
- Ellis RW. New technologies for making vaccines. *Vaccine*. 1999. 17(13-14):1596-604.
- Evans, D. T., L. M. Chen, J. Gillis, K. C. Lin, B. Harty, G. P. Mazzara, R. O. Donis, K. G. Mansfield, J. D. Lifson, R. C. Desrosiers, J. E. Galan, and R. P. Johnson. Mucosal priming of simian immunodeficiency virus-specific cytotoxic T-lymphocyte responses in rhesus macaques by the *Salmonella* type III secretion antigen delivery system. *J. Virol*. 2003. 77:2400-2409.
- Everest P, Griffiths P, Dougan G. Live *Salmonella* vaccines as a route towards oral immunisation. *Biologicals*. 1995. 23(2):119-24.
- Fernandez RC, Weiss AA. Cloning and sequencing of a *Bordetella pertussis* serum resistance locus. *Infect Immun*. 1994. 62(11):4727-38.
- Finkelman FD, Shea-Donohue T, Sullivan CA, Morris SC, Madden KD, Gause WC, Urban JF Jr. Cytokine regulation of host defense against parasitic gastrointestinal nematodes: lessons from studies with rodent models. *Annu Rev Immunol*. 1997. 15:505-33.
- Formal SB, Baron LS, Kopencko DJ, Washington O, Powell C, Life CA. Construction of a potential bivalent vaccine strain: introduction of *Shigella sonnei* form I antigen genes into the galE *Salmonella typhi* Ty21a typhoid vaccine strain. *Infect Immun*. 1981. 34(3):746-50.
- Galen JE, Gómez-Duarte OG, Losonsky GA, Halpern JL, Lauderbaugh CS, Kaintuck CS, Reyman MK, A murine model of intranasal immunization to assess the immunogenicity of attenuated *Salmonella typhi* live vector vaccines in stimulating serum antibody responses to expressed foreign antigens. *Vaccine*. 1997. 15(6-7):700-8.
- Galen JE, Levine MM. Can a 'flawless' live vector vaccine strain be engineered? *Trends Microbiol*. 2001. 9(8):372-6.
- Garmory HS, Brown KA, Titball RW. *Salmonella* vaccines for use in humans: present and future perspectives. *FEMS Microbiol Rev*. 2002. 26(4):339-53.
- Garside P, Grecis RK, Mowat AM. T lymphocyte dependent enteropathy in murine *Trichinella spiralis* infection. *Parasite Immunol*. 1992 Mar; 14(2):217-25.
- Garside P, Kennedy MW, Wakelin D, Lawrence CE. Immunopathology of intestinal helminth infection. *Parasite Immunol*. 2000.22(12):605-12.
- Geary TG & Thompson DC. Development of antiparasitic drugs in the 21st century. *Vet Parasitol*. 2003. 115(2):167-84.
- Gentschev, I., G. Dietrich, and W. Goebel. The *Escherichia coli* alpha-hemolysin secretion system and its use in vaccine development. *Trends Microbiol*. 2002.10:39-45.
- Gentschev I, Glaser I, Goebel W, McKeever DJ, Musoke A, Heussler VT. Delivery of the p67 sporozoite antigen of *Theileria parva* by using recombinant *Salmonella dublin*: secretion of the product enhances specific antibody responses in cattle. *Infect. Immun*. 1998. 66:2060-2064.
- Germanier R, Fuer E. 1975 Isolation and characterization of Gal E mutant Ty 21a of *Salmonella typhi*: a candidate strain for a live, oral typhoid vaccine. *J Infect Dis*. 1975 May;131(5):553-8.

Gonzalez C, Hone D, Noriega FR, Tacket CO, Davis JR, Losonsky G, Nataro JP, Hoffman S, Malik A, Nardin E. Salmonella typhi vaccine strain CVD 908 expressing the circumsporozoite protein of Plasmodium falciparum: strain construction and safety and immunogenicity in humans. *J Infect Dis.* 1994. 169(4):927-31.

Goyal PK, Wheatcroft J, Wakelin D. Tyvelose and protective responses to the intestinal stages of Trichinella spiralis. *Parasitol Int.* 2002. 51(1):91-8.

Green EA, Botting C, Webb HM, Hirts TR, Randall RE. Construction, purification and immunogenicity of antigen-antibody-LTB complexes. *Vaccine.* 1996. 14(10):949-58

Gundel, I, Weidinger G, ter Meulen V, Heesemann J, Russmann H, Niewiesk S. Oral immunization with recombinant *Yersinia enterocolitica* expressing a measles virus CD4 T cell epitope protects against measles virus-induced encephalitis. *J. Gen. Virol.* 2003. 84:775-779

Gurish MF, Bryce PJ, Tao H, Kisselgof AB, Thornton EM, Miller HR, Firend DS, Oettgen HC. IgE enhances parasite clearance and regulates mast cell responses in mice infected with Trichinella spiralis. *J Immunol.* 2004. 15;172(2):1139-45.

Hayes LJ, Conlan JW, Everson JS, Ward ME, Clarke I N. *Chlamydia trachomatis* major outer membrane protein epitopes expressed as fusions with Lamb in an attenuated *aroA* strain of *Salmonella typhimurium*; their application as potential immunogens. *J. Gen. Microbiol.* 1991. 137(Pt. 7):1557-1564.

Helmbj H, Grecis RK. IL-18 regulates intestinal mastocytosis and Th2 cytokine production independently of IFN-gamma during Trichinella spiralis infection. *J Immunol.* 2002. 169(5):2553-60.

Henderson IR, Nataro JP, Kaper TF, Meyer SK, Farrand DL, Burns BB, Finlay JW, St. Geme 3rd. Renaming protein secretion in the gram-negative bacteria. *Trends Microbiol.* 2000. 8(8):352.

Henderson IR, Nataro JP. Virulence functions of autotransporter proteins. *Infect Immun.* 2001 a. 69(3):1231-43.

Henderson IR, Lam AC. Polymorphic proteins of Chlamydia spp. autotransporters beyond the Proteobacteria. *Trends Microbiol.* 2001 b. 9(12):573-8.

Henderson IR, Navarro-García F, Desvaux M, Fernández RC, Ala'Aldeen A. Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2004. 68(4):692-744.

Henderson IR, Navarro-García F, Nataro JP. The great escape: structure and function of the autotransporter proteins. *Trends Microbiol.* 1998. 6(9):370-8.

Hess, J, Gentschev I, Miko D, Welzel M, Ladel C, Goebel W, Kaufmann SH. Superior efficacy of secreted over somatic antigen display in recombinant *Salmonella* vaccine induced protection against listeriosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996. 93:1458-1463

Higginns DE, Shastri N, Portnoy DA. Delivery of protein to the cytosol of macrophages using *Escherichia coli* K-12. *Mol Microbiol.* 1999. 31(6):1631-41.

Hohmann EL, Oletta, Miller SI. Evaluation of a phoP/phoQ-deleted, *aroA*-deleted live oral *Salmonella typhi* vaccine strain in human volunteers. *Vaccine.* 1996. 14:19-24.

Hoiseth SK, Stocker BA. Aromatic-dependent *Salmonella typhimurium* are non-virulent and effective as live vaccines. *Nature*. 1981. 291(5812):238-9.

Hone DM, Harris AM, Chatfield S, Dougan G, Levine MM. Construction of genetically defined double aro mutants of *Salmonella typhi*. *Vaccine*. 1991. 9(11):810-6.

Igarashi I, Asaba U, Xuan X, Omata Y, Saito A, Nawasawa H, Fujisaki K, Suzuki N, Iwakura Y, Mikami T. Immunization with recombinant surface antigens p26 with Freund's adjuvants against *Babesia rodhaini* infection. *J Vet Med Sci*. 2000. 62(7):717-23.

International Human Genome Sequencing Consortium. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature*. 2004. 431: 931-945.

Jagusztyn-Krynicka EK, Clark-Curtiss JE, Curtiss III R. *Escherichia coli* heat-labile toxin subunit B fusions with *Streptococcus sobrinus* antigens expressed by *Salmonella typhimurium* oral vaccine strains: importance of the linker for antigenicity and biological activities of the hybrid proteins. *Infect. Immun*. 1993. 61:1004-1015.

Janssen R, Tommassen J. PhoE protein as a carrier for foreign epitopes. *Int. Rev. Immunol*. 1994. 11:113-121.

Jarvis LM, Pritchard DL. An evaluation of the role of carbohydrate epitopes in immunity to *Trichinella spiralis*. *Parasite Immunol*. 1992. 14(5):489-501.

Jasmer DP, Vassilatis DK, Despommier D, Neary SM. Failure to detect *Trichinella spiralis* p43 in isolated host nuclei and in irradiated larvae of infected muscle cells which express the infected cell phenotype. *Mol Biochem Parasitol*. 1994. 67(2):225-34.

Jean-Claude S, Niedergang F, Kranehenbhl JP. Live attenuated *Salmonella*: a paradigm of mucosal vaccines. *Immunol Rev*. 1999. 171:5-26.

Johansson EL, Wassen L, Holmgren J, Jertborn M, Rudin A. Nasal and vaginal vaccinations have differential effects on antibody responses in vaginal and cervical secretions in humans. *Infect Immun*. 2001. 69(12):7481-6.

Jones HP, Hodge LM, Fujihashi K, Kiyono H, McGhee JR, Simecka JW. The pulmonary environment promotes Th2 cell responses after nasal-pulmonary immunization with antigen alone, but Th1 responses are induced during instances of intense immune stimulation. *J Immunol*. 2001. 167(8):4518-26.

Jose J, Bernhardt Hannemann F. Cellular surface display of dimeric Adx and whole cell P450-mediated steroid synthesis on *E. coli*. *J Biotechnol*. 2002. 23;95(3):257-68.

Kamal M, Wakelin D, Mahida Y. Mucosal responses to infection with *Trichinella spiralis* in mice. *Parasite*. 2001. 8(2 Suppl):S110-3.

Kang HY, Curtiss III R. Immune responses dependent on antigen location in recombinant attenuated *Salmonella typhimurium* vaccines following oral immunization. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2003. 15;37(2-3):99-104.

Kang HY, Srinivasan J, Curtiss R 3rd. Immune responses dependent on antigen location in recombinant attenuated *Salmonella typhimurium* vaccines following oral immunization. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2003. 15;37(2-3):99-104.

- Kaul D, Ogra PL. Mucosal responses to parenteral and mucosal vaccines. *Dev Biol Stand.* 1998. 95:141-6.
- Kehayov IR, Kyurkchiev SD, Tankov CV, Komandarev SK. *Trichinella spiralis*: a 76-kDa excretory/secretory larval antigen identified by a monoclonal antibody. *Exp Parasitol.* 1991. 73(2):150-60.
- Khan WI, Richard M, Akiho H, Blennerhasset PA, Humphreys NE, Grecis RK, Van Snick J, Collins SM. Modulation of intestinal muscle contraction by interleukin-9 (IL-9) or IL-9 neutralization: correlation with worm expulsion in murine nematode infections. *Infect Immun.* 2003. 71(5):2430-8.
- Khan WI, Vallance BA, Blennerhasset PA, Deng Y, Verdu EF, Matthaei KI, Collins SM. Critical role for signal transducer and activator of transcription factor 6 in mediating intestinal muscle hypercontractility and worm expulsion in *Trichinella spiralis*-infected mice. *Infect Immun.* 2001. 69(2):838-44.
- Kingsley RA, Van Amsterdam K, Kramer N, Bäumlner AJ. The *shdA* gene is restricted to serotypes of *Salmonella enterica* subspecies I and contributes to efficient and prolonged fecal shedding. *Infect Immun.* 2000. 68(5):2720-7.
- Kingsley RA, Santos RL, Keestra AM, Adams LG, Baumler AJ. 2002. *Salmonella enterica* serotype Typhimurium ShdA is an outer membrane fibronectin-binding protein that is expressed in the intestine. *Mol Microbiol.* 2002. 43(4):895-905.
- Kingsley RA, Humphries AD, Weening EH, De Zoete MR, Winter S, Papaconstantinopoulou A, Dougan G, Baumler AJ. Molecular and phenotypic analysis of the CS54 island of *Salmonella enterica* serotype typhimurium: identification of intestinal colonization and persistence determinants. *Infect Immun.* 2003. 71(2):629-40. 2003
- Kingsley RA, Ghanem DA, Puebla-Osorio N, Keestra AM, Berghman L, Bäumlner AJ. Fibronectin binding to the *Salmonella enterica* serotype Typhimurium ShdA autotransporter protein is inhibited by a monoclonal antibody recognizing the A3 repeat. *J Bacteriol.* 2004. 186(15):4931-9.
- Kingsley RA, Keestra AM, de Zoete MR, Bäumlner AJ. The ShdA adhesin binds to the cationic cradle of the fibronectin 13FnIII repeat module: evidence for molecular mimicry of heparin binding. *Mol Microbiol.* 2004. 52(2):345-55.
- Kirschmann DA, De Ciechi PA, Bono C P, Zacheis ML, Schwartz BD, Woulfe SL. Utilization of soluble fusion proteins for induction of T-cell proliferation. *Cell. Immunol.* 1995. 160:193-198.
- Kiyono H, Fukuyama S. NALT-versus Peyer's-patch-mediated mucosal immunity. *Nature Reviews Immunology.* 2004. 4: 699-710
- Klauser T, Pohlner J, Meyer TF. Extracellular transport of cholera toxin B subunit using *Neisseria* IgA protease beta-domain: conformation-dependent outer membrane translocation. *EMBO J.* 1990. 9(6):1991-9.
- Klauser T, Pohlner J, Meyer TF. Selective extracellular release of cholera toxin B subunit by *Escherichia coli*: dissection of *Neisseria* Iga beta-mediated outer membrane transport. *EMBO J.* 1992. 11(6):2327-35.

- Klauser T, Kramer J, Otzelberger K, Pohlner J, Meyer TF. Characterization of the *Neisseria* Iga beta-core. The essential unit for outer membrane targeting and extracellular protein secretion. *J Mol Biol.* 1993a. 234(3):579-93.
- Klauser T, Pohlner J, Meyer TF. The secretion pathway of IgA protease-type proteins in gram-negative bacteria. *Bioessays.* 1993b. 15(12):799-805.
- Kociecka W. Trichinellosis: human disease, diagnosis and treatment. *Vet Parasitol.* 2000. 1;93(3-4):365-83.
- Knox DP. Development of vaccines against gastrointestinal nematodes. *Parasitology.* 2000;120 Suppl:S43-61.
- Konieczny MP, Suhr M, Noll A, Autenrieth IB, Schmidt MA. Cell surface presentation of recombinant (poly-) peptides including functional T-cell epitopes by the AIDA autotransporter system. *FEMS Immunol Med Microbid.* 2000. 27(4):321-32.
- Kotton CN, Hohmann EL. Enteric pathogens as vaccine vectors for foreign antigen delivery. *Infect Immun.* 2004. 72(10):5535-47.
- Kramer U, Rizos K, Apfel H, Autenrieth I B, Lattemann CT. Autodisplay: development of an efficacious system for surface display of antigenic determinants in *Salmonella* vaccine strains. *Infect. Immun.* 2003. 71:1944-1952
- Kramer U, Rizos K, Apfel H, Autenrieth IB, Lattemann CT. Autodisplay: development of an efficacious system for surface display of antigenic determinants in *Salmonella* vaccine strains. *Infect Immun.* 2003. 71(4):1944-52
- Kutteh W, Kantele A, Moldovenau PA, Crwley-Nowick, Mestecky J. Induction of specific immune responses in the genital tract of women after oral or rectal immunization and rectal boosting with *Salmonella typhi* Ty21a vaccine. *J Reprod Immunol.* 2001. 52(1-2):61-75.
- Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970. 227: 680-685
- Lanusse CE, Prichard RK. Relationship between pharmacological properties and clinical efficacy of ruminant anthelmintics. *Vet Parasitol.* 1993. 49(2-4):123-58.
- Larsh JE. Cell-mediated immunity against certain parasitic worms. *Adv Parasitol.* 1975. 13:183-222.
- Lee E, Platt R, Kang S, Roth JA, Phillips GJ. Chromosomal integration and expression of the *Escherichia coli* K88 gene cluster in *Salmonella enterica* ser. Choleraesuis strain 54 (SC54). *Vet Microbiol.* 2001. 83(2):177-83.
- Lett M C, Sasakawa C, Okada N, Sakai T, Makino S, Yamada M, Komatsu K, and Yoshikawa M. virG, a plasmid-coded virulence gene of *Shigella flexneri*: identification of the virG protein and determination of the complete coding sequence. *J Bacteriol.* 1989. 171(1):353-9.
- Lawrence CE, Peterson JC, Higgins LM, MacDonald TT, Kennedy MW, Garside P. IL-4-regulated enteropathy in an intestinal nematode infection. *Eur J Immunol.* 1998. 28(9):2672-84.
- Levine MM, Sztein MB. Vaccine development strategies for improving immunization: the role of modern immunology. *Nat Immunol.* 2004. 5(5):460-4.

- Li CK, Chung YY, Ko RC. The distribution of excretory/secretory antigens during the muscle phase of *Trichinella spiralis* and *T. pseudospiralis* infections. *Parasitol Res.* 1999. 85(12):993-8.
- Link AJ, Robinson K, Church GM. Comparing the predicted and observed properties of proteins encoded in the genome of *Escherichia coli* K-12. *Electrophoresis.* 1997. 18(8):1259-313.
- Loveless BJ, Saier MH Jr. A novel family of channel-forming, autotransporting, bacterial virulence factors. *Mol Membr Biol.* 1997. 14(3):113-23.
- Maizels RM, Bundy DA, Selkirk ME, Smith DF, Anderson MR. Immunological modulation and evasion by helminth parasites in human populations. *Nature.* 1993 28;365(6449):797-805.
- ManWarren T, Gangliardo L, Geyer J, McVay C, Pearce-Kelling S, Appleton J. Invasion of intestinal epithelia in vitro by the parasitic nematode *Trichinella spiralis*. *Infect Immun.* 1997. 65(11):4806-12.
- Marti HP, Murrell KD, Gamble HR. *Trichinella spiralis*: immunization of pigs with newborn larval antigens. *Exp Parasitol.* 1987. 63(1):68-73.
- Maurer J, Jose J, Meyer TF. Characterization of the essential transport function of the AIDA-I autotransporter and evidence supporting structural predictions. *J Bacteriol.* 1999. 181(22):7014-20.
- Mazanec MB, Nedud JG, Kaetzel CS, Lamm ME. A three-tiered view of the role of IgA in mucosal defense. *Immunol Today.* 1993. 14(9):430-5.
- McClelland M, Sanderson KE, Spieth J, Clifton SW, Latreille P, Courtney L, Porwollik S, Allt J. Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. *Nature.* 2001. 413(6858):852-6.
- McDonald V. Parasites in the gastrointestinal tract. *Parasite Immunol.* 2003. 25(5):231-4.
- McGuire C, Weng C Ch, Wakelin D. Nasal immunization with homogenate and peptide antigens induces protective immunity against *Trichinella spiralis*. *Infect Immun.* 2002. 70(12):7149-52.
- McSorley S J, Xu D, Liew F Y. Vaccine efficacy of Salmonella strains expressing glycoprotein 63 with different promoters. *Infect Immun.* 1997. 65(1):171-8.
- McVay CS, Bracken P, Gagliardo LF, Appleton J. Antibodies to tyvelose exhibit multiple modes of interference with the epithelial niche of *Trichinella spiralis*. *Infect Immun.* 2000. 68(4):1912-8.
- McVay CS, Tsung A, Appleton J. Participation of parasite surface glycoproteins in antibody-mediated protection of epithelial cells against *Trichinella spiralis*. *Infect Immun.* 1998. 66(5):1941-5.
- Medina E, Guzmán CA. Modulation of immune responses following antigen administration by mucosal route. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2000. 27(4):305-11.
- Medina E, Guzmán CA. Use of live bacterial vaccine vectors for antigen delivery: potential and limitations. *Vaccine.* 2001. 19(13-14):1573-80.

- Moldoveanu Z, Rusell MW, Wu HY, Huang WQ, Compans W, Mestecky J. Compartmentalisation within the common mucosal immune system. *Adv Exp Med Biol.* 1995; 371:97-101.
- Murre C, McCae PS, Baltimore D. A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding, daughterless, MyoD, and myc proteins. *Cell.* 1989. 10;56(5):777-83.
- Nagano I, Wu Z, Boonmars T, Takahashi Y. Molecular cloning and characterisation of two kinds of proteins in excretory-secretory products of *Trichinella pseudospiralis*. *Int J Parasitol.* 2004. 29;34(4):491-500.
- Negrao-Correa D. Importance of immunoglobulin E (IgE) in the protective mechanism against gastrointestinal nematode infection: looking at the intestinal mucosae. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2001. 43(5):291-9.
- Neutra MR, Frey A, Kraehenbulh JP. Epithelial M cells: gateways for mucosal infection and immunization. *Cell.* 1996. 86(3):345-8.
- Newton S M, Jacob CO, Stocker BA. Immune response to cholera toxin epitope inserted in *Salmonella* flagellin. *Science.* 1989. 244:70-72
- Newton SE, Meeusen ENT. Progress and new technologies for developing vaccines against gastrointestinal nematode parasites of sheep. *Parasite Immunol.* 2003. 25(5):283-96
- O' Hagan DT, MacKichan ML, Singh M. Recent developments in adjuvants for vaccines against infectious diseases. *Biomol Eng.* 2001. 18(3):69-85.
- Oliver DC, Huang G, Fernandez RC. Identification of secretion determinants of the *Bordetella pertussis* BrkA autotransporter. *J Bacteriol.* 2003; 185(2):489-95.
- Olson ME, Ceri H, Morck DW. Giardia vaccination. *Parasitol Today.* 2000. 16(5):213-7.
- Ortega-Pierres G, Muniz E, Coral-Vázquez R, Parkhouse RM. Protection against *Trichinella spiralis* induced by purified stage-specific surface antigens of infective larvae. *Parasitol Res.* 1989; 75(7):563-7.
- Ortega-Pierres G, Yépez-Mulia L, Homan W, Gamble HR, Takahashi Y, Wassom DI, Appleton J. Workshop on a detailed characterization of *Trichinella spiralis* antigens: a platform for future studies on antigens and antibodies to this parasite. *Parasite Immunol.* 1996. 18(6):273-84.
- Osorio-León JF. *Identificación de la unidad mínima translocadora del autotransportador ShdA*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. Universidad Simón Bolívar. 2004.
- Otubu OE, Carlisie-Nowak DD, McGregor RH, Jakobson, Appleton JA. *Trichinella spiralis*: the effect of specific antibody on muscle larvae in the small intestines of weaned rats. *Exp Parasitol.* 1993. 76(4):394-400.
- Parkhouse RM, Ortega-Pierres G. Stage-specific antigens of *Trichinella spiralis*. *Parasitology.* 1984. 88 (Pt 4):623-30.
- Parkhouse RM, Harrison LJ. Antigens of parasitic helminths in diagnosis, protection and pathology. *Parasitology.* 1989;99 Suppl:S5-19.

- Parkinson J, Mitreva M, Hall N, Blaxter M, McCarter JP. 400000 nematode ESTs on the Net. *Trends Parasitol.* 2003. 19(7):283-6.
- Pasetti MF, Pickett TE, Levine M, Szein MB. A comparison of immunogenicity and in vivo distribution of *Salmonella enterica* serovar Typhi and Typhimurium live vector vaccines delivered by mucosal routes in the murine model. *Vaccine.* 2000. 18(28):3208-13.
- Peregrín-Alvarez JM, Yam A, Sivakumar G, Parkinson J. PartiGeneDB--collating partial genomes. *Nucleic Acids Res.* 2005.1;33 (Database issue):D303-7.
- Phillipp M, Taylor PM, Parkhouse RM, Ogilvie BM. Immune response to stage-specific surface antigens of the parasitic nematode *Trichinella spiralis*. *J Exp Med.* 1981. 154(1):210-5.
- Pohnler J, Halter R, Beyreuther K, Meyer TF. Gene structure and extracellular secretion of *Neisseria gonorrhoeae* IgA protease. *Nature.* 1987. 325(6103):458-62.
- Pompa-Mera EN. *ShdA es un autotransportador de Salmonella typhimurium*. Tesis de licenciatura. Facultad de Química. UNAM. 2002.
- Pompa-Mera EN, Santiago-machuca A, Ruiz-Pérez F, Osorio-León JF, Ocaña-Mondragón A, González-Bonilla CR. Use of ShdA autotransporter to express NANP and CSP from *P. falciparum* on the surface of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* SL3261. *Manuscrito en preparación*.
- Pozio G. New patterns of *Trichinella infection*. *Vet Parasitol.* 2001. 12;98(1-3):133-48
- Raeafa AD, Magda MS, Soad MY. Immunization against *Trichinella spiralis* using antigens from different life cycle stages. Experimental study in mice. *J Egypt Soc Parasitol.* 1996. 26: 19-26
- Raupach B & Kaufmann SH. Bacterial virulence, proinflammatory cytokines and host immunity: how to choose the appropriate *Salmonella* vaccine strain? *Microbes Infect.* 2001. 3(14-15):1261-9.
- Renauild-Mongenie G, Cornette J, Mielcarek N, Menozzi FD, and LochtDistinct C roles of the N-terminal and C-terminal precursor domains in the biogenesis of the Bordetella pertussis filamentous hemagglutinin. *J Bacteriol.* 1996. 178(4):1053-60.
- Robinson K, Bellaby T, Wakelin D. High levels of protection induced by a 40-mer synthetic peptide vaccine against the intestinal nematode parasite *Trichinella spiralis*. *Immunology.* 1995a. 86(4):495-8.
- Robinson K, Bellaby T, Wakelin D. Immune response profiles in vaccinated and non-vaccinated high- and low-responder mice during infection with the intestinal nematode *Trichinella spiralis*. *Parasitology.* 1995b. 110 (Pt 1):71-8.
- Robinson K, Bellaby T, Wakelin D. Oral and parenteral vaccination against *Trichinella spiralis* infections in high- and low-responder mice. *Int J Parasitol.* 1995c 25(8):989-92.
- Romaris F, Appleton J. Invasion of epithelial cells by *Trichinella spiralis*: in vitro observations. *Parasite.* 2001. 8(2 Suppl):S48-50.
- Romaris F, Escalante M, Lorenzo S, Bonay P, Gàrate T, Leiro J, Ubeira FM. Monoclonal antibodies raised in Btk(xid) mice reveal new antigenic relationships and molecular interactions among gp53 and other *Trichinella* glycoproteins. *Mol Biochem Parasitol.* 2002. 125(1-2):173-83.

- Ruíz-Olvera P, Ruiz-Perez F, Villegas Sepúlveda N, Santiago-Machuca A, Maldonado-Rodríguez R, García-Elorriaga G, Gonzalez-Bonilla C. Display and release of the circumsporozoite protein using the autotransporter MisL of *Salmonella enterica*. *Plasmid*. 2003. 50(1):12-27.
- Ruiz-Perez F, Leon-Kempis R, Santiago-Machuca A, Ortega-Pierres G, Barry E, Levine M, Gonzalez-Bonilla C. Expression of the Plasmodium falciparum immunodominant epitope (NANP)(4) on the surface of Salmonella enterica using the autotransporter MisL. *Infect Immun*. 2002. 70(7):3611-20.
- Ruíz-Pérez F. Construcción de una cepa vacunal de *Salmonella enterica* como vehículo eficiente en la inmunización con proteínas y DNA heterólogos. TESIS DE DOCTORADO. CINVESTAV. IPN. 2002.
- Russmann H, Shams H, Pobleto F, Fu Y, Galan JE, Donis RO. Delivery of epitopes by the *Salmonella* type III secretion system for vaccine development. *Science*. 1998. 281:565-568.
- Ryan, E. T., J. R. Butters, R. N. Smith, P. A. Carroll, T. I. Crean, and S. B. Calderwood. Protective immunity against *Clostridium difficile* toxin A induced by oral immunization with a live, attenuated *Vibrio cholerae* vector strain. *Infect. Immun*. 1997. 65:2941-2949
- Salas Rojas M. Respuesta inmune de una vacuna génica contra el virus de la rabia empleando *Salmonella typhimurium* SL3261 como vector y con ayuda de la pneumolisina de *Streptococcus pneumoniae*. Tesis de Maestría. 2005. Facultad de Medicina. UNAM.
- Salmond GP, Reeves PJ. Membrane traffic wardens and protein secretion in gram-negative bacteria. *Trends Biochem Sci*. 1993. 18(1):7-12.
- Schettters T. Vaccination against canine babesiosis. *Trends Parasitol*. 2005. 21(4):179-84.
- Schettters TP. Proceedings from the bovine neosporosis session. *Vet Parasitol. en prensa*.
- Schodel F, Curtiss III R. Salmonellae as oral vaccine carriers. *Dev Biol Stand*. 1995; 84:245-53.1995).
- Shulz GE. The structure of bacterial outer membrane proteins. *Biochim Biophys Acta*. 2002; 1565(2):308-17.
- Spreng S, Dietrich G, Goebel W, and Gentschev I. Protection against murine listeriosis by oral vaccination with recombinant *Salmonella* expressing protective listerial epitopes within a surface-exposed loop of the TolC-protein. *Vaccine* 2003; 21:746-752.
- Stocker BA. Auxotrophic Salmonella typhi as live vaccine. *Vaccine*. 1988; 6(2):141-5.
- Su XZ, Prestwood AK, McGraw RA. Cloning and expression of complementary DNA encoding an antigen of Trichinella spiralis. *Mol Biochem Parasitol*. 1991; 45(2):331-6.
- Sun S, Xu W, He N, Sugane K. An antigenic recombinant fusion protein from *Trichinella spiralis* induces a protective response in BALB/c mice. *J Helminthol*. 1994; 68(1):89-91.
- Tacket CO, Hone DM, Curtiss R 3rd, Kelly SM, Losonsky G, Guers L, Harris AM, Edelman R, and Levine MM. Comparison of the safety and immunogenicity of delta aroC delta aroD and delta cya delta crp *Salmonella typhi* strains in adult volunteers. *Infect Immun*. 1992; 60(2):536-41.

- Tacket CO, Kelly SM, Schödel F, Losonsky G, Nataro JP, Edelman R, Levine MM, and Curtiss R. Safety and immunogenicity in humans of an attenuated *Salmonella typhi* vaccine vector strain expressing plasmid-encoded hepatitis B antigens stabilized by the Asd-balanced lethal vector system. *Infect Immun.* 1997; 65(8):3381-5.1997
- Takahashi Y, Mizuno N, Araki T, Okuda H, Nakashima T. Immunocytochemical localization of antigens in adult worms of *Trichinella spiralis* recognized by Fischer rats. *Parasitol Res.* 1994; 80(4):291-6.
- Tettelin H, et al. Complete genome sequence of a virulent isolate of *Streptococcus pneumoniae*. *Science.* 2001; 293(5529):498-506.
- Ubeira FM, Leiro J, Santamarina MT, Villa TG, Sanmartín-Durán ML. Immune response to *Trichinella* epitopes: the antiphosphorylcholine plaque-forming cell response during the biological cycle. *Parasitology.* 1987; 94 (Pt 3):543-53.
- Valls M, Atrian S, De Lorenzo V, Fernández LA. Engineering a mouse metallothionein on the cell surface of *Ralstonia eutropha* CH34 for immobilization of heavy metals in soil. *Nat Biotechnol.* 2000;18(6):661-5.
- Vassilatis DK, Despommier D, Misek DE, Polvedere RI, Gold AM, Van der Ploeg L. Analysis of a 43-kDa glycoprotein from the intracellular parasitic nematode *Trichinella spiralis*. *J Biol Chem.* 1992;267(26):18459-65.
- Vassilatis DK, Despommier DD, Polvedere RI, Gold AM, Van der Ploeg HT. *Trichinella pseudospiralis* secretes a protein related to the *Trichinella spiralis* 43-kDa glycoprotein. *Mol Biochem Parasitol.* 1996;78(1-2):25-31.
- Veiga E, De Lorenzo V, Fernández LA. Probing secretion and translocation of a beta-autotransporter using a reporter single-chain Fv as a cognate passenger domain. *Mol Microbiol.* 1999; 33(6):1232-43.
- Veiga E, Sugawara E, Nikaido, de Lorenzo V, Fernández LA. Export of autotransported proteins proceeds through an oligomeric ring shaped by C-terminal domains. *EMBO J.* 2002; 21(9):2122-31.
- Vercruysse J, Knox DP, Schetters TP, Willadsen P. Veterinary parasitic vaccines: pitfalls and future directions. *Trends Parasitol.* 2004. 20(10):488-92.
- Vermeulen AN. Characterization of phenotype related responsiveness of peripheral blood lymphocytes from *Eimeria tenella* infected chickens. *Parasite Immunol.* 1997; 19(12):563-9.
- Vermeulen AN. Progress in recombinant vaccine development against coccidiosis. A review and prospects into the next millennium. *Int J Parasitol.* 1998; 28(7):1121-30.
- Viney M. How do host immune responses affect nematode infections? *Trends Parasitol.* 2002; 18(2):63-6.
- Wakelin D. Helminths. *Curr Opin Infect Dis.* 2000;13(5):465-469.
- Wakelin, D., and D. A. Denham. 1983. The immune response, p. 265–308. In W. C. Campbell (ed.), *Trichinella* and trichinosis. Plenum Press, New York.

- Wang ZQ, Cui J, Wei HY, Han HM, Zhang HW, Li YL. Vaccination of mice with DNA vaccine induces the immune response and partial protection against *T. spiralis* infection. *Vaccine*. 2006;24(8):1205-12.
- Watanabe N, Bruschi F, Korenaga M. IgE: a question of protective immunity in *Trichinella spiralis* infection. *Trends Parasitol*. 2005; 21(4):175-8.
- Weill-Halle B. Oral vaccination. In Rosenthal SR, editor. BCG vaccination against tuberculosis. Boston: Little, Brown, 1957.
- Wisniewski N, McNeil M, Grieve RB, Wassom DL. Characterization of novel fucosyl- and tyvelosyl-containing glycoconjugates from *Trichinella spiralis* muscle stage larvae. *Mol Biochem Parasitol*. 1993; 61(1):25-35.
- Wu Z ., Nagano I., Nakada T., Takahashi Y. Expression of excretory and secretory protein genes of *Trichinella* at muscle stage differs before and after cyst formation. *Parasitology International*. 2002; 51: 155–161.
- Yamamoto M, McGhee JR, Hagiwara Y, Otake S, Kiyono H. Genetically manipulated bacterial toxin as a new generation mucosal adjuvant. *Scand J Immunol*. 2001; 53(3):211-7.
- Yen MR, Peabody CR, Partovi SM, Zhai Y, Tseng YH, Saier MH. Protein-translocating outer membrane porins of Gram-negative bacteria. *Biochim Biophys Acta*. 2002; 1562(1-2):6-31
- Zarlenga DS, Gamble HR. Molecular cloning and expression of an immunodominant 53-kDa excretory-secretory antigen from *Trichinella spiralis* muscle larvae. *Mol Biochem Parasitol*. 1990. 42(2):165-74.
- Zarlenga DS. Vaccinating against zoonotic parasitic diseases: myth or reality? *Anim Health Res Rev*. 2004. 5(2):219-22.