



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**  
**FACULTAD DE MEDICINA**

**“EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE INDUCIDA CONTRA *T. spiralis*,  
EMPLEANDO UN ACARREADOR BACTERIANO QUE EXPRESA ANTÍGENOS  
DERIVADOS DE LA p43 DEL PARÁSITO, FUSIONADOS AL ADYUVANTE  
MOLECULAR C3d”**

**T E S I S**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO ACADÉMICO DE  
**DOCTORA EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**ERICKA NELLY POMPA MERA**

TUTORA PRINCIPAL:

**DRA. LILIÁN YÉPEZ MULIA**  
Facultad de Medicina. UNAM.

COMITÉ TUTOR:

**DR. CÉSAR RAÚL GONZÁLEZ BONILLA.**  
Facultad de Medicina. UNAM.

**DR. ENRIQUE ORTEGA SOTO.**  
Instituto de Investigaciones Biomédicas. UNAM.

MÉXICO, D.F., NOVIEMBRE 2014.



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.



#### JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE:	DRA. PATRICIA TATO ZALDIVAR
SECRETARIO:	DRA. LILIÁN YÉPEZ MULIA
VOCAL:	DR. JULIO CÉSAR CARRERO SÁNCHEZ
VOCAL:	DRA. YOLANDA LÓPEZ VIDAL
VOCAL:	DRA. MARÍA IMELDA LÓPEZ VILLASEÑOR

#### **DIRECCIÓN DE TESIS: DRA. LILIÁN YÉPEZ MULIA**

El presente trabajo se realizó 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 de la Dra. Lilián Yépez Mulia, así como en la Unidad de Investigación Médica en Inmunología del Hospital de Infectología del CMN “La Raza” del IMSS; en colaboración con el Dr. César Raúl González Bonilla. El proyecto fue apoyado por el Instituto Mexicano del Seguro Social, a través del financiamiento IMSS–FIS (FIS/IMSS/PROT/534).

Durante sus estudios de Doctorado, la sustentante recibió apoyo del Consejo Nacional para la Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través de la beca: 49342.

El Comité Tutoral que evaluó periódicamente los avances del presente trabajo estuvo conformado por la Dra. Lilián Yépez Mulia, el Dr. César Raúl González y el Dr. Enrique Ortega Soto.

A mi familia:  
Gracias por todo su amor, apoyo y dulce compañía.  
Sin ustedes, nada sería posible.

.....a Korina†

....a mis grandes amistades  
Gracias por seguir aquí.

## AGRADECIMIENTOS

A la UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

Al Programa de Doctorado de Ciencias Biomédicas.

Al personal que conforma la Coordinación del Programa de Doctorado de Ciencias Biomédicas, especialmente a la Dra. Yolanda López Vidal (Responsable de la Facultad de Medicina, como entidad participante), a la Srita. Evangelina Vargas (Auxiliar de Servicios Escolares) y a la Srita. Zenaida Martínez (Responsable de Servicios Escolares).

Al Consejo Nacional para la Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo otorgado a través de la beca 49342.

Al Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) por todos los apoyos recibidos.

A mi tutora, la Dra. Lilián Yépez Mulia, distinguida Investigadora y maravillosa persona. Le agradezco su invaluable apoyo, consejos, paciencia, guía y enseñanzas recibidas en estos años, en los cuales dirigió de mi trabajo; siempre en un ambiente de gran constructivismo, objetividad y respeto.

Al Dr. Javier Torres, Jefe de la Unidad de Investigación en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias (UIMElyP), del Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional s. XXI. IMSS., por todo el apoyo brindado para que culminara con este trabajo.

A todo el personal de la UIMElyP, del Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional s. XXI. IMSS.

Al personal y compañeros estudiantes de laboratorio que conforman el Laboratorio de Parasitología de la UIMElyP, por todo su apoyo y compañerismo.

Al Dr. César R. González Bonilla, Investigador distinguido del IMSS y miembro de mi comité tutor, por brindarme el apoyo y todas las facilidades para llevar a cabo una parte importante del presente estudio. Le agradezco sus enseñanzas académicas en los seminarios, así como la oportunidad de incorporarme a una institución importante como lo es el IMSS.

Al Dr. Enrique Ortega Soto, Investigador distinguido del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM y miembro de mi comité tutor, por la paciencia, el gran interés y el tiempo otorgados para la evaluación periódica del presente trabajo, así como las enseñanzas y bases en materia de inmunología, durante los cursos impartidos durante mi estancia en el Posgrado.

A todo el personal de la Unidad de Investigación en Inmunología e Infectología, del Hospital de Infectología, Centro Médico Nacional "La Raza". IMSS.

A la M. en C. Alicia Ocaña Mondragón por todo el apoyo durante la realización experimental de este trabajo, su amistad, sus enseñanzas que de muchas formas han trascendido en vida. Gracias por continuar con nosotros.

Al Q.F.B. Pablo Arroyo Matus, por su apoyo, interés y tiempo en la realización de diversos y numerosos experimentos del presente trabajo.

A mis compañeros estudiantes que alguna vez estuvieron en la UIMII, Centro Médico Nacional “La Raza” del IMSS y que compartieron conmigo horas, experiencias y responsabilidades, en tiempos buenos y adversos.

A Beatriz Nieto, por esa ayuda imprescindible de todos los días.

A mis colegas y amigos del Posgrado, por su valioso apoyo: Dra. Mónica Salas, M. en C. Guillermo Gálvez, Dra. Wendy García Suástegui, Dr. Rosendo Luria, Biol. Daniel Pardavé, Dra. Abigail Morales.

A los compañeros que tuve en los cursos del Posgrado en Ciencias Biomédicas de la UNAM.

Al Dr. Yonathan Garfías, a la Dra. María del Carmen Jiménez, ambos Investigadores de la Unidad de Investigación del Instituto de Oftalmología “Fundación Conde de Valenciana”, por el apoyo durante los experimentos de citometría de flujo y de inmunofluorescencia indirecta.

Al Dr. Juan Carlos Zenteno, Investigador de la Unidad de Investigación del Instituto de Oftalmología “Fundación Conde de Valenciana”, por el apoyo recibido durante la secuenciación nucleotídica automatizada de los plásmidos.

A la Dra. Aída Jiménez Corona del Servicio de Epidemiología del Instituto de Oftalmología “Fundación Conde de Valenciana”, así como al Dr. Flavio Terán Rosales de la ESM-IPN por el apoyo durante el análisis estadístico de resultados del presente trabajo.

A los Investigadores que impartieron ó coordinaron los Cursos Fundamentales y Tópicos del Posgrado que cursé y que me permitieron tener bases para continuar con mis estudios de Doctorado: Dr. Rafael Saavedra Durán, Dr. Enrique Ortega Soto, Dra. Ana Flisser, Dr. Eduardo García Zepeda, Dr. Edmundo Lamoyi y la Dra. Agnes Fleury.

A los Investigadores, miembros del Jurado examinador, por el valioso tiempo que proporcionaron para enriquecer con sus observaciones, sugerencias, conocimiento y experiencia, el presente trabajo escrito.

## INDICE GENERAL

ABREVIATURAS	1
RESUMEN	3
ABSTRACT	4
INTRODUCCIÓN	5
Triquinelosis	5
Aspectos epidemiológicos de la triquinelosis	5
<i>Trichinella spp.</i>	8
<i>Trichinella spiralis</i>	10
Ciclo de vida de <i>Trichinella spp.</i>	11
Cambios durante la formación de la célula nodriza	12
Aspectos clínicos de la triquinelosis	13
Medidas de control y tratamiento de la triquinelosis	15
Antígenos de <i>Trichinella</i>	17
Antígenos TSL-1	18
La glicoproteína de 43 kDa.	19
Respuesta inmune contra <i>T. spiralis</i>	20
Respuesta inmune a nivel intestinal	20
Respuesta inmune durante la fase sistémica	23
Las vacunas como medida de control	24
Modelos de vacunas contra <i>Trichinella spiralis</i>	26
<i>Salmonella</i> como acarreador de antígenos	31
Otros factores que influyen en la inmunogenicidad de una vacuna	35
Adyuvantes	36
C3d como adyuvante molecular	37
P28: El dominio mínimo de unión del C3d a su receptor CR2 (CD21)	39
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	41
JUSTIFICACIÓN	42
HIPÓTESIS	42
OBJETIVO GENERAL	43
OBJETIVOS PARTICULARES	43
MATERIAL Y MÉTODOS	44
I. Tecnología de DNA recombinante	44
Construcción de la secuencia p28 <sub>3</sub>	47
Construcción de la secuencia SCOT	49

Construcción de los plásmidos pAg30-SCOT, pAg30-p28 <sub>3</sub> y pAg30-p28 <sub>3</sub> -SCOT	49
Secuenciación nucleotídica automatizada	51
Preparación y electroporación de bacterias electrocompetentes de <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium SL3261	51
<b>II. Caracterización y análisis de la expresión de proteínas</b>	52
Cultivo, condiciones de inducción, curvas de crecimiento y preparación de cepas con fines de inmunización	52
Extracción de proteínas totales de las cepas recombinantes de <i>Salmonella</i>	52
SDS-PAGE y Western-blot	53
Recuperación de proteínas de sobrenadantes de cultivos	53
Dot-blot para detección de proteínas en sobrenadantes	54
Inmunofluorescencia indirecta (IFI) y citometría de flujo de <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium SL3261.	54
<b>III. Mantenimiento del ciclo de vida de <i>T. spiralis</i></b>	55
Preservación del ciclo de vida de <i>T. spiralis</i>	55
<b>IV. Animales</b>	56
<b>V. Esquema de inmunización con las cepas vacunales de <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium, colecta de suero y lavados intestinales</b>	56
Esquema de inmunización y desafío con el parásito	56
Ensayos de persistencia <i>in vivo</i> post-vacunación y estabilidad del plásmido.	57
Sangría y obtención de sueros	57
Lavados intestinales	57
Preparación de suspensiones celulares de esplenocitos y de placas de Peyer (PP)	58
<b>VI. Desafío de los animales inmunizados y determinación de la protección</b>	58
Recuperación de parásitos adultos	58
<b>VII. Evaluación de la respuesta inmune humoral y celular</b>	59
Preparación de extracto total (ET) de LM de <i>T. spiralis</i>	59
Determinación de anticuerpos de las clases IgG e IgG1 antígeno-específicos, mediante ensayo inmunoenzimático (ELISA).	59
Determinación de anticuerpos de la clase IgA antígeno-específicos, presentes en lavados intestinales, mediante ensayo inmunoenzimático (ELISA).	60
Reconocimiento de la p43 nativa de <i>T. spiralis</i> por IgA presente en lavados intestinales de los animales vacunados mediante inmunofluorescencia.	61
Ensayos de estimulación <i>in vitro</i> y cuantificación de citocinas IFN- $\gamma$ e IL-5	61
Análisis estadístico	61
<b>RESULTADOS</b>	62
Construcción del templado que codifica para el adyuvante P28	62
Construcción de los plásmidos intermediarios con el vector de tránsito pRL-null.	63
Construcción de la secuencia SCOT	65
Construcción de los plásmidos pAg30-SCOT, pAg30-p28 <sub>3</sub> y pAg30-p28 <sub>3</sub> -	65



SCOT	
Evaluación de la expresión de las proteínas de fusión heterólogas en la superficie de <i>E. coli</i> DH5α.	71
Evaluación de la funcionalidad del sitio de corte de la OmpT proteasa (SCOT)	71
Análisis de la expresión de las proteínas de fusión en la superficie de <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium SL3261.	74
Efecto del plásmido y de la expresión de proteínas heterólogas, sobre la cinética de crecimiento del acarreador	77
Colonización de <i>Salmonella</i> recombinante en el bazo de los animales inmunizados	78
Estabilidad genética del plásmido <i>in vivo</i>	78
Protección inducida por las diferentes cepas de <i>Salmonella</i>	81
Caracterización de la respuesta inmune humoral evocada por las diferentes cepas de <i>Salmonella</i>	82
Caracterización de la respuesta inmune celular inducida por las diferentes cepas de <i>Salmonella</i> .	86
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>89</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>100</b>
<b>PERSPECTIVAS</b>	<b>101</b>
<b>APÉNDICE</b>	<b>102</b>
<b>REFERENCIAS</b>	<b>104</b>
<b>PUBLICACIONES</b>	<b>130</b>

## FIGURAS

Figura 1	Localización geográfica de los brotes de triquinosis entre 1998-2013	7
Figura 2	Cladograma del género <i>Trichinella spp</i>	9
Figura 3	Ciclo de vida de <i>T. spiralis</i>	12
Figura 4	Secuencia primaria de la glicoproteína de 43 kDa (p43) de <i>T. spiralis</i>	20
Figura 5	Papel del complemento en la activación de la célula B	39
Figura 6	Diseño experimental del presente estudio	44
Figura 7	Proteína de fusión codificada por el plásmido pAg30	46
Figura 8	Estrategia general de clonación	50
Figura 9	Esquema de inmunización	56
Figura 10	Análisis electroforético en agarosa al 1.5% del templado p28	62
Figura 11	Análisis electroforético en agarosa al 1.5% de la copia p28 <sub>A</sub> cortado con las enzimas <i>XhoI</i> y <i>HindIII</i> .	63
Figura 12	Análisis electroforético en agarosa al 1% de los plásmidos derivados de pRL-null que contienen hasta tres copias del fragmento p28	63
Figura 13	Análisis electroforético en agarosa al 1.5% de las múltiples copias en tándem clonadas en el vector de tránsito pRL-null	64
Figura 14	Análisis electroforético en agarosa al 1% correspondiente al fragmento de <i>shdA</i> de 942 pb	64
Figura 15	Análisis electroforético en agarosa al 1.5% de la secuencia que codifica para el sitio de corte de la OmpT proteasa (SCOT)	65
Figura 16	Análisis electroforético en agarosa al 0.9%, de los plásmidos	66
Figura 17	Análisis electroforético en agarosa al 1.0%, de los plásmidos cortados con la enzima <i>BamHI</i> .	67
Figura 18	Análisis del plásmido pAg30-SCOT.	68
Figura 19	Análisis del plásmido pAg30-p28 <sub>3</sub> .	69
Figura 20	Análisis del plásmido pAg30-p28 <sub>3</sub> -SCOT	70

Figura 21	Análisis de la expresión de las proteínas de fusión que contienen al péptido heterólogo Ag30, en la superficie de <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	73
Figura 22	Análisis de la funcionalidad del sitio de corte de OmpT proteasa (SCOT) en las cepas <i>Escherichia coli</i> BL21-DE3 (OmpT <sup>-</sup> proteasa) y XL-10 GOLD (OmpT <sup>+</sup> proteasa).	74
Figura 23	Análisis de la expresión de péptidos heterólogos en la superficie de <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium SL3261.	76
Figura 24	Efecto de la expresión de proteínas heterólogas codificadas por distintos plásmidos, sobre la cinética de crecimiento de <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium SL3261	78
Figura 25	Recuperación de <i>Salmonella</i> recombinante a partir de esplenocitos de ratones BALB/c inmunizados	80
Figura 26	Amplificación por PCR, de la región comprendida entre la bandera molecular FLAG y el autotransportador ShdA, a partir de plásmidos de <i>Salmonella</i> recuperada del bazo de animales inmunizados.	81
Figura 27	Protección a nivel local inducida por las diferentes cepas de <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium SL3261, contra la infección por <i>T. spiralis</i> .	82
Figura 28	Reconocimiento del ET de la LM de <i>T. spiralis</i> por anticuerpos intestinales de la clase IgA de los animales inmunizados.	83
Figura 29	Reconocimiento de la superficie de LM de <i>T. spiralis</i> por anticuerpos intestinales de la clase IgA de los animales inmunizados	85
Figura 30	Respuesta de anticuerpos de la clase IgG (total) e IgG1 inducidos por la inmunización con diferentes cepas de <i>Salmonella</i> recombinante.	87
Figura 31	Niveles de IFN- $\gamma$ (A) e IL-5 (B) producidos por esplenocitos y placas de Peyer (PP) de ratones inmunizados con las diferentes cepas de <i>Salmonella</i> recombinante.	88

## TABLAS

Tabla 1	Relaciones entre <i>Trichinella spp.</i> y sus hospederos	10
Tabla 2	Diferentes formulaciones con fines de vacuna, que han evocado protección contra <i>Trichinella spiralis</i> en diversos modelos experimentales	30
Tabla 3	Antígenos heterólogos expresados en <i>Salmonella</i> que evocan diversos tipos de respuesta inmune.	32
Tabla 4	Clases de adyuvantes clínicamente probados	38
Tabla 5	Uso del adyuvante C3d ó su dominio mínimo de unión (p28) al CD21	40
Tabla 6	Cepas bacterianas empleadas en el presente trabajo	45
Tabla 7	Características de los plásmidos	46
Tabla 8	Oligonucleótidos empleados en el presente trabajo	48

## ABREVIATURAS

ag30	Secuencia de nucleótidos (DNA) que codifica para el p43 <sup>(210-239)</sup> .
Ag30 (p43 <sup>(210-239)</sup> )	Péptido de 30 residuos derivado de la glicoproteína de 43 kDa de <i>T. spiralis</i> , y cuya secuencia de aminoácidos es: RLEMYGSFLAKVMVNMRIWAVTDNTLQTT
AT	Autotransportador
C3d	Fragmento del componente C3 del complemento
CD21	Receptor 2 del complemento (CR2)
CD35	Receptor 1 del complemento (CR1)
CFA	Adyuvante completo de Freund
CHA	Crude homogenate antigen ó extracto total de <i>T. spiralis</i>
CN	Célula nodriza
CR2	Receptor 2 del complemento (CD21)
°C	Grados Celsius
c.b.p.	Cuanto baste para
DHB	Ácido dihidroxibenzoico
dNTP's	Didesoxinucleótidos trifosfatados
D.O.	Densidad óptica
DOC	Deoxicolato de Sodio
d.p.i.	Días post-infección
ET	Extracto total de la LM de <i>T. spiralis</i>
FLAG	Péptido bandera para detectar la expresión de la proteína de fusión
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GI	Gastrointestinal
ICT	Comisión Internacional de Triquinelosis
IFI	Inmunofluorescencia indirecta
Ig	Inmunoglobulina
IFN- $\gamma$	Interferón gamma
IL	Interleucina
IL-5	Interleucina 5
i.m.	Intramuscular
i.n.	Intranasal
Kb	Kilobases (equivalentes a 1000 pb)
kDa	Kilodaltones
LA	Larva ó parásito adulto de <i>T. spiralis</i>
LM	Larva muscular ó infectiva
LRN	Larva recién nacida
LTB	Secuencia señal de tráfico de la subunidad B de la toxina termolábil de <i>E. coli</i> .
$\mu$ g	Microgramo
$\mu$ L	Microlitro
$\mu$ M	Micromolar
mA	Miliamperes
Min	Minutos
mL	Mililitro
mM	Milimolar
nirB	Promotor nirB de la nitrato reductasa
Ng	Nanogramos
Nm	Nanómetros
Omp T proteasa	Proteasa de la proteína de membrana externa T
p43	Glicoproteína de 43 kDa de <i>T. spiralis</i>
PBS	Solución amortiguadora ó buffer salino de fosfatos
p.i.	Post-infección

PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PMSF	fenil metil sulfonil fluoruro
Pg	picogramos
PI3K	Fosfoinosítido 3-cinasa
Pmol	Picomoles
p28	Secuencia de ADN codificante para el dominio mínimo de unión del C3d a su receptor CD21
P28	Secuencia de aminoácidos correspondiente al Dominio mínimo de unión del C3d a su receptor CD21
PP	Placas de Peyer
r.p.m.	Revoluciones por minuto
S	Segundos
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS
ShdA	Autotransportador ShdA, su nombre proviene de <i>Shedding</i> , que significa eliminar
SCOT	Sitio de corte proteolítico para la OmpT proteasa
T.A.	Temperatura ambiente
<i>Taq</i> pol	Enzima <i>Taq</i> polimerasa termoestable
TBS	Solución amortiguadora ó buffer Tris salino
TLCK	N- $\alpha$ -tosil-L-lisina clorhidrato de cloro-metil cetona
TMB	3,3',5,5'-tetrametilbenzidina
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa
TPCK	L-1-tosilamida-2-fenil etil clorometil cetona
TsES	Productos de Excreción/Secreción de <i>T. spiralis</i>
U	Unidades
UFC	Unidades formadoras de colonias
V	Volts

## RESUMEN

La triquinelosis es una zoonosis de amplia distribución mundial producida por nemátodos del género *Trichinella spp.*, cuyo ciclo de vida comprende una fase intestinal y una fase sistémica (muscular). Esta parasitosis puede afectar al humano y a especies animales domésticas y silvestres, produciendo complicaciones intestinales, musculares, cardiológicas y del sistema nervioso central. Su principal mecanismo de transmisión es a través del consumo de carne de cerdo infectada con el parásito. El tratamiento de la triquinelosis a nivel veterinario se basa en el uso efectivo y seguro de compuestos bencimidazólicos. Sin embargo, los casos de reinfección y de falla terapéutica debida a la farmacorresistencia de los parásitos, han llevado a cuestionar sobre la factibilidad de su uso a nivel veterinario, como parte de las estrategias de control; por lo que las vacunas podrían proponerse como medidas de control alternativas. La selección de antígenos protectores, de los sistemas de entrega de antígeno, de la vía de inmunización, así como de los adyuvantes a emplear en los esquemas de inmunización, son factores de suma importancia que determinan la eficacia de una vacuna.

Considerando estos aspectos, en un modelo de triquinelosis experimental, nuestro grupo de investigación evaluó en estudios previos la protección contra la infección por *T. spiralis*, inmunizando a ratones por vía intranasal con el vector *Salmonella enterica* serovar Typhimurium SL3261 que expresa en su superficie al péptido de 30 aminoácidos (Ag30) proveniente de la p43 de la larva muscular de *T. spiralis* (*Salmonella* pAg30). En este estudio se indujo una protección parcial (62.8%) contra la infección. Con la finalidad de incrementar la protección conferida por *Salmonella* pAg30, en el presente estudio, se exploró el uso de tres copias del dominio mínimo de unión (P28) de C3d como adyuvante molecular, fusionado a Ag30 (Ag30p28<sub>3</sub>), además se evaluó la inmunogenicidad de la proteína fusión Ag30p28<sub>3</sub> expresada en la superficie de *Salmonella* o en su forma secretada. Para esto, ratones BALB/c se inmunizaron por vía intranasal con las diferentes vacunas recombinantes y se desafiaron por vía oral con 300 larvas musculares, recuperándose los organismos adultos del intestino de los animales al día 8 post-infección (p.i). Los resultados mostraron que la inmunización con *Salmonella* que secreta *in vivo* la fusión Ag30-p28<sub>3</sub> contribuyó a reducir la carga parasitaria a nivel intestinal en un 92.8%, mientras que la proteína de fusión Ag30-p28<sub>3</sub> que solo es expresada en la superficie del acarreador bacteriano, redujo 42% la carga parasitaria de adultos. La respuesta inmune inducida por las vacunas estuvo compuesta por un perfil de citocinas Th1/Th2 con predominancia de la respuesta Th2, la cual se caracterizó por la presencia de IgG1, producción de IgA intestinal y secreción de IL-5. El enfoque del presente estudio puede contribuir al desarrollo de plataformas tecnológicas eficientes para el desarrollo de estrategias de vacunación, en contra de parásitos intestinales.

## ABSTRACT

Trichinosis is a worldwide distributed zoonosis caused by nematodes of the genus *Trichinella*. Parasite life cycle includes intestinal and systemic (muscle) stages and affects humans and domestic and wild species. This parasitosis produces intestinal, muscle, cardiac and central nervous system complications. Although trichinosis treatment with benzimidazole compounds is effective and safe, reinfection and treatment failure raise concerns over the feasibility of its use for long-term control at veterinary field. Vaccines represent an alternative strategy to control trichinellosis. Factors as delivery of antigen, route of immunization and the type of adjuvant used in the schedule of immunization are essential to determine the efficacy of a vaccine. In an effort to develop an efficient vaccine against enteral stages of *T. spiralis*, in the present study, BALB/c mice were immunized with recombinant attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium SL3261 that produce a 30-mer peptide (Ag30) derived from the gp43 of *T. spiralis* muscle larvae, fused to three copies of the molecular adjuvant P28 (Ag30-P28<sub>3</sub>) and it was either display on the bacterial surface or secreted *in vivo* by recombinant *Salmonella* strains. *Salmonella* strain secreting Ag30-P28<sub>3</sub>, reduced 92.8% the adult worm burden following a challenge with *T. spiralis* muscle larvae compared to 42% achieved by recombinant *Salmonella* displaying Ag30-P28<sub>3</sub> on the bacterial surface. The protection induced in mice by secreted Ag30-P28<sub>3</sub> was associated with a mixed Th1/Th2 response with predominance of Th2 phenotype, which was characterized by the production of IgG1, intestinal IgA antibodies as well as IL-5 secretion. This approach could provide an efficient platform technology for the design of novel vaccination strategies against enteral parasites.



## INTRODUCCIÓN

Los helmintos son algunos de los agentes infecciosos más extendidos en todo el mundo y que siguen afectando a aproximadamente 2 mil millones de personas en todo el mundo, especialmente en regiones marginadas, de bajos ingresos y recursos limitados (Harris, 2011; WHO, 2012). Se estima que más de mil millones de personas en las regiones en vías de desarrollo de África subsahariana, Asia y América, se infectan con una o más especies de helmintos (Hotez et al., 2006). Aunque causan una mortalidad relativamente baja, los altos niveles de morbilidad tienen un estrecho vínculo con la pobreza, ejerciendo un impacto negativo en el desarrollo físico y cognitivo, especialmente en niños (Crompton y Nesheim, 2002), obstaculizando el desarrollo socioeconómico. Por otra parte, las infecciones por helmintos pueden acentuar el efecto de otros agentes patógenos importantes, tales como los causantes de malaria y el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), así como atenuar la respuesta a una serie de vacunas (Hotez et al., 2008; Lustigman et al., 2012) y causar importantes pérdidas económicas a nivel veterinario (Cooper et al., 1992; Lanusse y Prichard, 1993; Wakelin, 2000).

La mayoría de las helmintiasis en humanos son causadas por parásitos helmintos gastrointestinales (GI) (Hotez et al., 2008). Los parásitos gastrointestinales (GI), protozoarios y helmintos tienen un fuerte impacto en la salud humana, aunque estas infecciones generalmente no son fatales, si tienen un alto grado de morbilidad, en los países en desarrollo. En particular, los nemátodos gastrointestinales (GI) pueden ocupar una variedad de nichos dentro del intestino, tales como el lumen (i.e. *Ascaris spp*, *Nippostrongylus brasiliensis*, *Necator americanus*); superficie de las mucosas (*Ancylostoma spp.* and *Necator spp.*); tejido intraepitelial (*Trichinella spiralis*, *Trichuris spp.*) o penetrar tejido (*Heligmosomoides polygyrus*, *Trichinella spiralis*, *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 (Garside, 2000).

Dentro de las helmintiasis, la triquinelosis es una zoonosis con impacto en la salud pública humana, considerada emergente y re-emergente que ha sido documentada en 55 países del mundo (Murrell y Pozio, 2011; Thompson, 2013).

## Triquinelosis

La triquinelosis es una enfermedad producida por nemátodos del género *Trichinella*. Esta parasitosis se manifiesta como un síndrome con signos y síntomas clínicos de intensidad variable, dependiendo de ciertos factores, tales como el grado de invasión, la carga parasitaria, la especie de *Trichinella* implicada y la respuesta inmune del huésped (Kociecka, 2000). El humano se puede infectar a través de la ingestión de carne cruda o insuficientemente cocida de un animal infectado y que contiene larvas musculares (LM) viables de *Trichinella* (Capó y Despommier, 1996). La triquinelosis, puede volverse una grave enfermedad, particularmente en personas de edad avanzada, donde las complicaciones más intensas, tales como miocarditis y encefalitis, pueden conducir a la muerte (Bruschi y Dupouy-Camet, 2014).

Esta parasitosis está fuertemente ligada al consumo de carne cruda ó mal cocida, por lo que los factores culturales que influyen en la preparación de platillos preparados con carne cruda (carne tártara) ó cocida inadecuadamente, juegan un papel importante en la epidemiología de esta zoonosis. En general el cerdo doméstico y sus derivados cárnicos, siguen siendo la principal fuente de infección en humanos, especialmente los cerdos que son criados en condiciones sub-óptimas ó deficientes de controles sanitarios, como ocurre en la cría de traspatio (Gottstein et al., 2009). El humano es un huésped accidental, en el cual el parásito no encuentra salida (Capó y Despommier, 1996).

### Aspectos epidemiológicos de la triquinelosis

La triquinelosis humana ha sido reportada en 55 países, por lo que sigue siendo una importante enfermedad zoonótica a nivel mundial (Fig. 1) (Pozio, 2007; Bruschi y Dupouy-Camet, 2014). En la década de 1990, la prevalencia mundial de la triquinelosis fue de aproximadamente 11 millones de personas infectadas (Dupouy-Camet, 2000). Aunque los aspectos epidemiológicos de esta zoonosis no han sido completamente estudiados, recientemente se ha estimado una incidencia anual a nivel mundial de 10,000 infecciones, dato estimado a partir de las más altas incidencias en diversos países a lo largo de 10 años (Pozio, 2007).

Diversos factores tales como la recolección insuficiente de datos de algunas regiones, los problemas en la selección de criterios de diagnóstico, así como el hecho de que gran parte de la atención se ha centrado en el control de la infección por *T. spiralis* en entornos domésticos (involucrando principalmente cerdos y especies sinantrópicas como la rata), han dificultado la precisión de datos epidemiológicos (Pozio y Zarlenga, 2013). En nuestro país, existen lugares en donde los cadáveres de animales (caballos, cerdos) destinados a la

producción de alimentos, no son inspeccionados antes de su consumo humano y por consiguiente estos son responsables de los brotes de triquinelosis humana (Arriaga et al., 1995; Ortega-Pierres et al., 2000).



**Figura 1. Localización geográfica de brotes de triquinelosis entre 1998-2013.** Tomado de: Bruschi y Dupoy-Camet, 2014.

Por otra parte, Murrell y Pozio (2011) analizaron los datos de reportes correspondientes a 1986-2009 y encontraron que en 41 países hubieron 65,818 casos y 42 muertes en ese periodo (Murrell y Pozio, 2011). La distribución global de *Trichinella* junto con los diferentes hábitos alimenticios de cada cultura representan los principales factores que favorecen las infecciones en el humano en países industrializados y en desarrollo. El cerdo constituye la principal fuente de infección (64% de los casos), aunque también lo ha sido el consumo de carne de caballo cruda (16%) en ciertas regiones, al igual que el consumo de carne de especies obtenidas por caza deportiva, tales como osos (12%) y otras especies silvestres (8%) (Pozio, 2001; Liciardi et al., 2009; Murrell and Pozio, 2011).

En países como China, se registraron de 2004 a 2009, 15 brotes de triquinelosis humana, un total de 1387 casos y 4 muertes (Cui et al., 2011). Lo anterior coloca a la triquinelosis no solo en el interés de la salud pública, sino también como un problema económico que puede afectar e incidir en la producción animal porcina y en la seguridad alimentaria (Cui y Wang, 2011; Wang et al., 2013a).

Sin embargo, en nuestro país la triquinelosis es considerada una enfermedad rara o casi inexistente (Secretaría de Salud, 2000; Cervera-Castillo et al., 2009). Desde el punto de vista epidemiológico, llama la atención el contraste entre las cifras documentadas en Europa y algunos países sudamericanos, cuyos reportes son numerosos y pueden

considerarse zonas endémicas, mientras que en México en 2004 se dejó de registrar la morbilidad de esta parasitosis, aun cuando se han detectado casos en zonas urbanas y suburbanas de la ciudad de México (Cervera-Castillo et al., 2009). De hecho, en México, la mayor parte de los reportes corresponde a brotes epidémicos, principalmente por consumo de cerdo y sus derivados; se han detectado caballos infectados, lo cual constituye un factor de riesgo, ya que su carne se consume debido a factores económicos. También se han identificado infecciones en perros, gatos, ratas y algunos animales exóticos en zoológicos. Los estados de mayor endemidad son Zacatecas, Durango, Puebla, Estado de México y Distrito Federal. Jalisco, Chihuahua y Michoacán reportan una incidencia media. El menor número de casos se ha encontrado en Querétaro, Guerrero, Guanajuato, Colima, San Luis Potosí, Aguascalientes, Nuevo León, Oaxaca, Veracruz y Sonora (Ortega-Pierres et al., 2000).

En la actualidad se cuenta con datos suficientes acerca del mantenimiento de *Trichinella spp.*, en una variedad de ciclos de transmisión de la fauna y por consiguiente, también se ha estudiado el impacto de los seres humanos en estos ciclos, el cual es central para la transmisión zoonótica del parásito (Reiteová et al., 2009). De hecho, la NORMA Oficial Mexicana NOM-017-SSA2-2012, para la vigilancia epidemiológica, en su última actualización del 19 de febrero de 2013, establece que la triquinelosis en nuestro país es objeto de vigilancia epidemiológica y la notificación de casos por esta infección en humano debe ser semanal (Norma Oficial Mexicana NOM-017-SSA2-2012).

### ***Trichinella spp.***

Los nemátodos del género *Trichinella* son parásitos zoonóticos con una distribución cosmopolita (Murrell y Pozio; 2011). A la fecha, se reconocen 9 especies y 3 genotipos (Tabla 1), divididos en 2 clados (Fig. 2). El primero clado agrupa especies encapsuladas en el tejido muscular del huésped, seguido de la reprogramación de la célula muscular y que exclusivamente infecta a especies de mamíferos. Por su parte, el segundo clado agrupa especies que no se encapsulan (Zarlenga et al., 2006; Pozio et al., 2009). Cabe mencionar que estas definiciones están dadas con base en la presencia de cápsula de colágeno que rodea a la larva muscular del parásito, característica que tiene implicaciones filogenéticas para el parásito (Mitreva y Jasmer, 2005). Entre las tres especies del segundo clado solo *T. pseudospiralis* infecta aves y mamíferos y las otras 2 (*T. papuae* y *T. zimbabwensis* parasitan aves y reptiles (Pozio et al., 2009).

Todas las especies son potencialmente zoonóticas y solo 6 de ellas se han detectado en humanos. Además del interés económico y sanitario, el género *Trichinella* representa un modelo interesante para el estudio de los mecanismos biológicos de transmisión zoonótica entre el amplio espectro de huéspedes, el cual incluye a más de 100 especies de mamíferos, aves y reptiles (Pozio y Zarlenga, 2005).

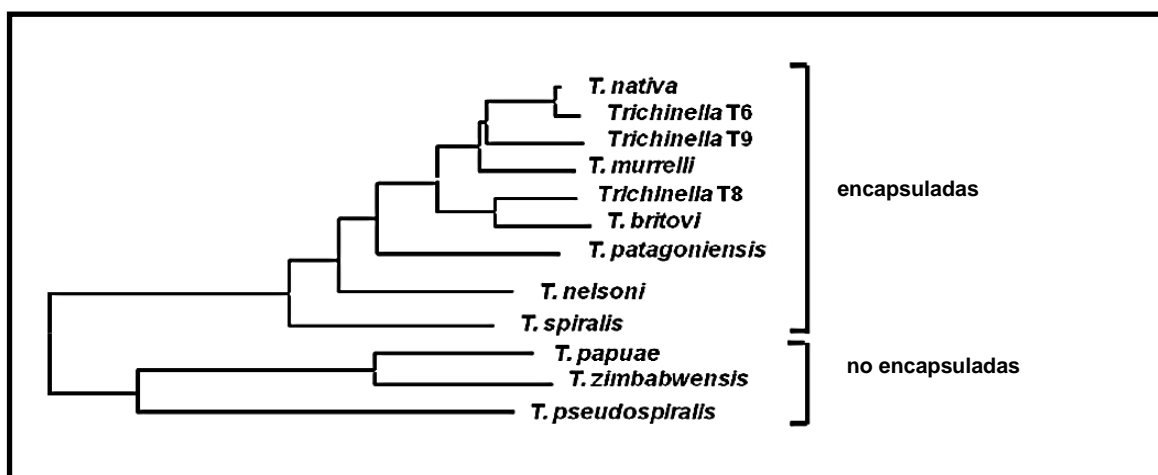


Figura 2. Cladograma del género *Trichinella spp.* El cladograma se generó a partir de datos analizados de DNA mitocondrial y de la subunidad grande ribosomal, así como del gen Cox 1. Modificado de: Pozio y Zarlenga, 2013.

Tabla 1. Relaciones entre *Trichinella spp.* y sus hospederos.

Genotipo	Distribución	Ciclo	Hospederos	Resistencia a la congelación
<i>T. spiralis</i> (T1)	Cosmopolita	Doméstico y silvestre	Cerdos, roedores, caballos	Sí, en músculo de caballo
<i>T. nativa</i> (T2)	Regiones del Ártico de Asia, América y Europa	Silvestre	Carnívoros silvestres: osos, morsas	Sí, en músculo de animales carnívoros
<i>T. britovi</i> (T3)	Europa, Asia, Norteamérica, Oeste de África	Silvestre y Doméstico	Mamíferos silvestres (osos, zorros, chacales) y domésticos (caballos, cerdos)	Sí, en músculo de animales carnívoros y de caballo
<i>T. pseudospiralis</i> (T4)	Cosmopolita	Silvestre y Doméstico	Mamíferos silvestres (aves) y domésticos (cerdos)	No
<i>T. murrelli</i> (T5)	EUA, Sur de Canadá	Silvestre	Carnívoros silvestres (osos) y caballos	No
<i>Trichinella</i> (T6)	Canadá, Alaska	Silvestre	Carnívoros silvestres	Sí, en músculo de animales carnívoros
<i>T. nelsoni</i> (T7)	Sureste de África	Silvestre	Mamíferos silvestres (jabalí, potamóquero de río)	No
<i>Trichinella</i> (T8)	Sur de África, Namibia	Silvestre	Carnívoros silvestres	No
<i>Trichinella</i> (T9)	Japón	Silvestre	Carnívoros silvestres	No
<i>T. papue</i> (T10)	Papua, Nueva Guinea, Tailandia	Silvestre	Cocodrilos de agua salada, cerdos silvestres	No
<i>T. zimbabwensis</i> (T11)	Zimbabwe, Mozambique, Etiopía, Sur de África	Silvestre	Cocodrilos del Nilo, reptiles, iguanas.	No
<i>T. patagoniensis</i> (T12)	Argentina	Silvestre	Pumas	Desconocido

Modificado de: Gottstein et al., 2009.

### *Trichinella spiralis*

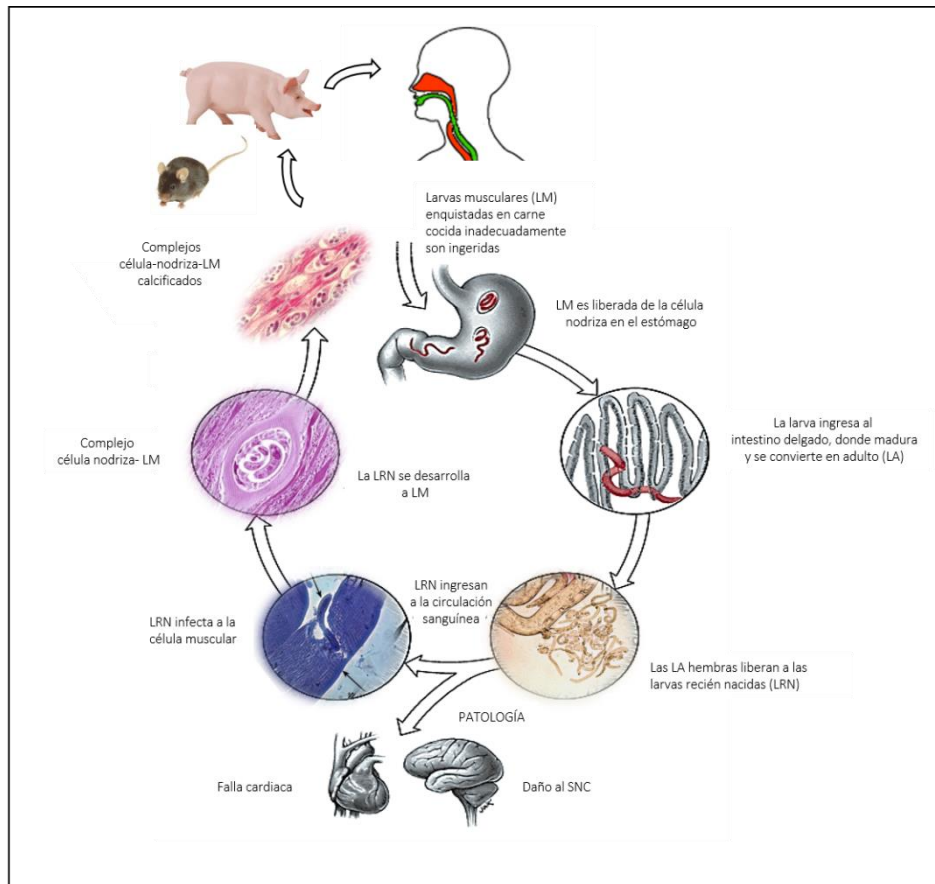
*Trichinella spiralis* (*T. spiralis*) fue la primera en descubrirse y ha sido la mejor caracterizada debido a la gran importancia como agente causal de triquinelosis ó triquinosis humana. Aunque la infección por este parásito muestra una prevalencia relativamente alta en especies domésticas y silvestres; posee una alta infectividad en modelos animales de laboratorio (ratón). Por otra parte, es una especie perfectamente adaptada al cerdo doméstico y silvestre (*Sus scrofa*), el cual representa el más importante reservorio para este

parásito (Pozio y Murrell, 2006; Pozio y Zarlenga, 2013). En México, se tienen evidencias de la presencia de *T. spiralis* en cerdo y caballo, a través de estudios de seroprevalencia y triquinoscopía de muestras de diafragma de cerdos mantenidos en cría de traspatio (seroprevalencia del 12%) y de caballos mantenidos en rastros (Martínez-Marañón, 1983; Cabral-Soto et al., 1990; Arriaga et al., 1995; Monroy et al., 2001). La seroprevalencia encontrada en estos estudios es del 12%, mientras que la prevalencia por triquinoscopía/digestión artificial encontrada fue del 1.25% (Vega-Alarcón y Romero, 1992).

### **Ciclo de vida de *Trichinella* spp.**

*Trichinella* es un nemátodo intracelular que lleva a cabo todos sus estadíos de desarrollo en un solo huésped (Fig. 3); ocupando compartimentos intestinales (fase intestinal) y extraintestinales (fase sistémica o parenteral) durante su ciclo de vida (Fabre et al., 2009a).

Después de la ingestión de carne que contiene larvas musculares (LM) o L1 viables del parásito, por acción de los jugos gástricos (pepsina y el ácido clorhídrico), las LM son liberadas en el intestino delgado, donde invaden el epitelio columnar (Mitreva y Jasmer, 2005). Posteriormente, las LM permanecen en el tejido epitelial y sufren 4 mudas antes de madurar a larvas ó parásitos adultos (A). Una vez alcanzada la madurez sexual (2 días p.i), los parásitos adultos hembras y machos se reproducen. La embriogénesis de nuevas larvas dura alrededor de 90 horas y una vez completada, las hembras pueden producir de manera continua y liberar entre 500 y 1500 larvas recién nacidas (LRN) en la mucosa intestinal (4-5 d.p.i.), antes de que sean expulsadas a la luz intestinal (Liu et al., 2001), aunque este número puede variar, dependiendo del estado inmunológico del huésped y la especie infectante de parásito (Despommier, 1983). Posteriormente, las LRN atraviesan la mucosa intestinal, entran a las vénulas mesentéricas y mediante la circulación arterial y linfática llegan a diversos tejidos: hígado, páncreas, corazón, nódulos linfáticos, cerebro, retina, pulmones y de aquí a su tejido blanco: el músculo esquelético. De hecho, solo las LRN que alcanzan el músculo esquelético, logran sobrevivir (Bruschi y Murrell, 2002). Los músculos de predilección para este parásito, tienen la característica de ser pobres en glucógeno, pero con gran actividad, tales como: diafragma, músculos intercostales, cuádriceps, lengua maceteros etc., en donde se puede localizar LM a partir del séptimo día. Las LM pueden ser infectivas de nuevo para un segundo huésped, a partir del día 13 (Despommier et al., 1990). Una vez que el parásito completa su desarrollo en el músculo (21-30 días), éste puede seguir siendo infeccioso durante meses o años, de hecho, en el humano se sabe que *T. spiralis* puede permanecer viable en músculo hasta por 30 años (Fröscher et al., 1988).



**Figura 3. Ciclo de vida de *T. spiralis*.** El ciclo consta de 2 fases: una entérica (intestinal) y una sistémica. Modificado de: Capo et al., 1996.

### Cambios durante la formación de la célula nodriza

Posterior a la penetración a la célula muscular, la larva comienza un período prolongado de crecimiento sin cambio de muda. De manera paralela a este desarrollo, una serie de cambios se inducen en la célula muscular invadida, a fin de asegurar la supervivencia del parásito, resultando en la formación de un complejo llamado *célula nodriza* (CN), cuyo desarrollo culmina en un periodo de 20 d.p.i. y representa una nueva interacción huésped-parásito (Boireau, 1997). Estos cambios también correlacionan con profundas alteraciones en la expresión génica de la célula muscular huésped. La transcripción de los genes específicos de músculo se abate drásticamente (Jasmer, 1993), mientras que la síntesis de sindecano-1 es inducida (Beiting et al., 2006). Por otra parte, muchos de estos cambios fenotípicos en las células musculares son permanentes e incluyen, alineamiento de núcleos celulares satélites en el eje mayor de la célula muscular, sobreexpresión de factores de regulación miogénica (MyoD y miogenina) (como parte de la regeneración muscular) (Wu et al., 2013).



Por su parte, la célula infectada re-ingresa al ciclo celular (Jasmer, 1993), remodela la matriz del citoplasma celular (Despommier, 1975), sintetiza una cápsula de colágeno (IV y VI) que rodeará al complejo CN, ambos sintetizados por la célula nodriza (Ock et al., 2013). De hecho el nivel de transcripción de los genes de colágeno se incrementan (Polvere et al., 1997). La angiogénesis *de novo* en la CN también es otro de los cambios fenotípicos durante la fase muscular de la infección. La transcripción del gen del factor de crecimiento endotelio-vascular (VEGF, por sus siglas en inglés) se incrementa (Capó et al., 1998) y 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 (Capó et al., 1998; Dupouy-Camet et al., 2001). La timosina  $\beta_4$ , es una proteína considerada un potente inductor de VEGF y que se expresa en las primeras etapas de la infección muscular de *T. spiralis* (Ock et al., 2013). En respuesta al daño tisular, las células musculares inician un programa de regeneración similar al sistema de la reparación del músculo antes mencionado. La observación por microscopía electrónica ha mostrado un alineación lineal de núcleos de células de satélite en la periferia de células musculares infectadas a lo largo del eje largo de sus células musculares (Matsuo et al., 2000; Wu et al. 2008; Wu et al., 2013).

Poco se sabe sobre los mecanismos moleculares que conducen a la des-diferenciación de células musculares después de la infección por *Trichinella*, aunque estudios basados en microarreglos de cDNA han proporcionado genes candidatos que pudieran estar implicados (Wu et al., 2005, Wu et al., 2008; Dabrowska et al., 2008). A este respecto, entre los genes sobrerregulados están: MyoD, miogenina, Myf5, M-cadherina, Numb, Pax7 y NFAT, todos relacionados con la miogénesis y la diferenciación de células satélite, así como los genes MEF2, galectina 1, galectina 3 y Nanog, los cuales inducen la producción de factores miogénica y promueven la diferenciación terminal de células del músculo y MSX1 y Pbx1, que están implicados en la regulación de la proliferación y la diferenciación mediante la regulación la expresión de factores reguladores miogénicos (Dabrowska et al, 2008).

Otro aspecto relevante en el ciclo de vida de *T. spiralis*, es que a diferencia de la mayoría de los parásitos intracelulares, *T. spiralis* invade a la célula huésped sin matarla y de ésta manera asegura su supervivencia a largo plazo, lo que le permite distribuirse por todo el mundo y así extenderse a una gran variedad de hospederos (Despommier, 1998).

### **Aspectos clínicos de la triquinelosis**

Durante la fase entérica, bajas dosis infectivas del parásito pueden producir una infección asintomática, pero una carga parasitaria elevada puede iniciar un cuadro de gastroenteritis asociado con vómito, náusea, diarrea, dolor abdominal y fiebre a los 2 días post-infección (d.p.i) (fase aguda intestinal). Después de la digestión gástrica de la carne infectada, las

larvas musculares son liberadas en el estómago y estas arriban al intestino delgado, y maduran hasta el estadio adulto (5 dpi). La infección intestinal induce cambios patológicos en el intestino, los cuales se asocian con la eventual expulsión (Knight et al., 2004). Entre estos cambios que ocurren durante la invasión intestinal de *T. spiralis* se encuentran las modificaciones en el epitelio intestinal, un proceso inflamatorio a nivel de intestino delgado e infiltración de células cebadas de mucosas, atrofia de las microvellosidades, la hiperplasia de las criptas intestinales y de las células de goblet, así como hiperplasia de las células de Paneth (ManWarren et al., 1997; Garside et al., 2000; Knight et al., 2008; Blum et al., 2013). Por otra parte, también ocurre apoptosis de células epiteliales durante la infección por *T. spiralis* (Piekarska et al., 2009; Yu et al., 2014b).

La fase sistémica ó muscular se caracteriza por un proceso inflamatorio y una respuesta alérgica a la invasión del músculo esquelético por la LRN (estadio migratorio). Las LRN pueden producir daño a las células musculares ó inducir de manera indirecta la infiltración de células inflamatorias (células cebadas, eosinófilos, monocitos y linfocitos) que contribuyen a una respuesta de tipo Th2 (Bruschi y Dupoy-Camet, 2014). Durante esta fase, se producen mialgias, malestar general, edema facial y palpebral, dolor de cabeza, hemorragias subungueales o conjuntivales, erupción cutánea y edema periférico, así como eosinofilia e incremento sérico de las enzimas musculares tales como la creatinín fosfoquinasa (CPK), la deshidrogenasa láctica (LDH), (Capó y Despommier, 1996; Dupoy-Camet y Bruschi, 2007; Gottstein et al., 2009; Bruschi y Dupoy-Camet, 2014). Por otra parte, la liberación de productos como histamina, bradicininas, prostaglandinas (PGE<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub> y PGD<sub>2</sub>) y serotonina, pueden producir cambios en la permeabilidad capilar. La fiebre es de los síntomas que pueden persistir de 8-10 días ó prolongarse hasta por 3 semanas. Los eosinófilos pueden contribuir a la inmunopatología debido a que estos liberan histaminasa y aril-sulfatasa. La erupción cutánea y el edema periférico también son síntomas de la fase sistémica y que forman parte del síndrome clásico de la triquinelosis (Capó y Despommier, 1996; Dupoy-Camet y Bruschi, 2007; Gottstein et al., 2009; Bruschi y Dupoy-Camet, 2014).

Con menor frecuencia, se pueden producir complicaciones cardiológicas y del sistema nervioso central (Dupoy-Camet et al., 2002). La miocarditis es producida por la invasión de la larva migrante y por la activación de los eosinófilos y la degranulación de células cebadas, según hallazgos experimentales en ratas (Paolucci et al., 1998) y observaciones histopatológicas (Bruschi et al., 2008). Por su parte, la neurotriquinelosis representa la mayor complicación de esta parasitosis y es causada principalmente por la vasculitis y la reacción granulomatosa inflamatoria; especialmente por la degranulación de los eosinófilos, los cuales liberan la neurotoxina derivada de eosinófilo (EDN) (Bruschi y Dupoy-Camet, 2014). Las lesiones inflamatorias y múltiples infartos en la zona del

parénquima cerebral también han sido reportados (Gelal et al., 2004). Por otra parte, es frecuente la dificultad para establecer el diagnóstico diferencial de esta parasitosis, ya que sus manifestaciones clínicas se confunden con los de otras enfermedades, como el síndrome de fatiga crónica (Dupoy-Camet y Bruschi, 2007) poliomiocitis, edema angio-neurótico, septicemia, vasculitis, enfermedades autoinmunes y otras infecciones parasitarias (Cervera-Castillo et al., 2009).

### **Medidas de control y tratamiento de la triquinelosis**

El control de la triquinelosis en humanos se basa principalmente en medidas sanitarias de inspección en rastros, así como prácticas de consumo seguro (ingesta de carne completamente cocida) (Gamble et al., 2000; Gamble et al., 2007; Nöckler y Kapler, 2007). La prevención de triquinelosis en humanos está basada en tres enfoques. 1) Educación al consumidor, acerca del riesgo de consumir carne cruda ó semicocida no inspeccionada y procedente de animales domésticos (e.g. cerdos, caballos y perros) y de animales de la vida silvestre (osos, zorros, armadillos, cocodrilos, etc.) que pueden ser hospederos intermediarios de parásitos del género *Trichinella*; 2) Supervisión en granjas de producción porcina (ya que esta especie animal es representa la principal fuente de infección para los humanos); 3) Control y vigilancia epidemiológica de animales susceptibles (tanto de vida doméstica y de vida silvestre) mediante digestión artificial en los rastros (Gottstein et al., 2009). La acreditación y los controles de calidad deben implementarse en los laboratorios veterinarios a fin de detectar carga parasitaria de larvas de *Trichinella*, especialmente en carne derivada de cerdos, caballos y de animales de caza deportiva (Forbes et al., 2005).

La quimioterapia es el método de control más eficaz de la triquinelosis en el campo veterinario. Está basada principalmente en el uso de compuestos bencimidazólicos y sus derivados (albendazol, mebendazol y sulfóxido de albendazol). Estos fármacos también se usan en el control de la triquinelosis humana, en conjunto con el uso de glucocorticoides para tratar la vasculitis y la miositis (Pozio et al., 2003; Fourestie et al., 1993). El tratamiento con compuestos bencimidazólicos es efectivo durante la fase intestinal, sin embargo, la baja hidrosolubilidad de estos compuestos disminuye la biodisponibilidad del fármaco a nivel de músculo. Los bencimidazoles tienen como blanco la inhibición de la polimerización de  $\beta$ -tubulina de los microtúbulos del parásito (Rodríguez et al., 2009). Entre otras medidas de control de esta parasitosis a nivel veterinario, también destaca el uso de productos farmacéuticos aprobados por la SAGARPA, que contienen compuestos anti-helmínticos como levamisol, el cual también va dirigido a cepas de helmintos gastrointestinales resistentes a los bencimidazoles, tales como albendazol (SAGARPA, 2014). De hecho, la Comisión Internacional de Triquinelosis (ICT) recomienda que los casos

de triquinelosis animal y humana sean informados a las organizaciones de salud pública federal/nacional de cada país (ICT, 2014).

En nuestro país, a través de la NOM-064-ZOO-2000, “Lineamientos para la Clasificación y Prescripción de Productos Farmacéuticos Veterinarios por el nivel de Riesgo de sus Ingredientes Activos” y del “Acuerdo por el que se establece la clasificación y prescripción de los productos farmacéuticos veterinarios por el nivel de riesgo de sus ingredientes activos”, publicado el 12 de julio de 2004 en el Diario Oficial de la Federación; se establecen programas de control que incluyen: la evaluación de fármacos antihelmínticos más efectivos y la selección del fármaco antiparasitario más adecuado, a fin de evitar las resistencias.

Si bien los bencimidazoles son fármacos económicos, eficaces y seguros contra una amplia variedad de parásitos, también existen problemas en la actualidad que han llevado a cuestionar su uso sostenido, como parte de las estrategias de control a nivel veterinario. De hecho, el uso indiscriminado de los bencimidazoles ha resultado en la emergencia de farmacorresistencias, casos de reinfección, así como problemas asociados con los residuos (metabolitos secundarios) en la cadena alimenticia y en el medio ambiente (Kaplan, 2002; Wolstenholme et al., 2004; Bethony et al., 2006; Vercruysse et al., 2007; Jacob et al., 2013). Por otra parte, la falla terapéutica por el uso de bencimidazoles en el tratamiento de triquinelosis también ha sido documentada. Por ejemplo, en febrero de 1998, un brote de triquinelosis humana tuvo lugar en Piacenza, Italia; en el cual 92 individuos que consumieron carne de caballo, recibieron tratamiento con mebendazol, fármacos antiinflamatorios y anti-alérgicos (metilprednisolona ó prednisona). 10–16 meses después de la infección, se obtuvo biopsia del músculo deltoides de 4 individuos y se recuperaron las LM, las cuales no sufrieron cambios morfológicos ni alteraciones y solo se rodearon de una delgada cápsula de tejido conectivo. De manera interesante, estas larvas resultaron infectivas para ratones de la cepa CD1, corroborando que una vez iniciado el proceso de encapsulación de *T. spiralis*, las LM se vuelven resistentes al tratamiento con bencimidazoles (López-García et al., 1997; Pozio et al., 2001; Matadamas-Martínez et al., 2013).

De hecho, la resistencia a bencimidazoles es altamente prevalente a nivel mundial y ha sido reportada en más de 21 países (Kaplan, 2002; Diawara et al., 2013). Es por ello que ante la evidencia de inmunidad adquirida de manera natural contra *T. spiralis* y otras helmintiasis, la vacunación representa una alternativa viable para el control a largo plazo de esta parasitosis, con aplicación a nivel veterinario (Harris y Gause, 2011; Vercruysse et al., 2007). Sin embargo, para el desarrollo de una vacuna es necesario en primera instancia,

conocer los antígenos del parásito que confieren protección contra la infección, así como las características de la respuesta inmune protectora.

A continuación se describen los antígenos de *T. spiralis* de interés en la producción de una vacuna.

### **Antígenos de *Trichinella***

Durante todo el ciclo de vida de *Trichinella spiralis*, el parásito produce antígenos estadio-específicos que promueven activamente las interacciones huésped-parásito. Si bien estos antígenos juegan un importante papel en la protección del parásito contra el microambiente proporcionado por el huésped; también son potenciales inmunógenos, pero sobretodo pueden tener efectos inmunomodulatorios en el huésped (Dea-Ayuela y Bolas-Fernández, 1999).

Los antígenos de *T. spiralis* pueden dividirse en tres grupos, dependiendo de su localización: 1) de superficie, 2) de excreción/secreción (ES) y 3) componentes somáticos residuales (Dea-Ayuela y Bolas-Fernández, 1999). 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). Los antígenos de superficie representan el blanco principal del sistema inmune, ya que proporcionan la interfase huésped-parásito, sin embargo también ha sido demostrado que antígenos internos pueden ser expresados en la cutícula. Los  $\alpha$ -esticocitos, componentes celulares del esticosoma, órgano secretor del parásito, son la principal fuente de los antígenos de superficie. Entre los antígenos de superficie identificados, se encuentran proteínas cuyos tamaños moleculares son 43-, 47-, 55-, 90- y 105-kDa para la LM; 20-, 58- y 64 kDa para LRN y 20-, 33-, 40- 56-kDa para el parásito adulto (Dea-Ayuela y Bolas-Fernández, 1999). A este grupo también pertenece la paramiosina (Ts-Pmy), una proteína miofibrilar expresada en la membrana externa de la LRN y el A, el cual juega un importante papel en la evasión del sistema del complemento del huésped, ya que se une fuertemente a los componentes C8 y C9 del complemento, inhibiendo la polimeración de C9 durante la formación del complejo de ataque a membrana (MAC) (Zhang et al., 2011).

Por su parte, los antígenos ó productos de Excreción/Secreción de *T. spiralis* (TsES), son producidos por los esticocitos del esticosoma y parecen favorecer la sobrevivencia del parásito, bloqueando el sistema inmune del hospedero. En la célula nodriza, éstos se localizan en el citoplasma y núcleo hipertrófico de la célula. Entre algunas de las proteínas funcionales que se agrupan dentro de los TsES de la LM de *T. spiralis* se encuentran

proteínas de choque térmico, endonucleasas, proteasas de serina, proteínas de unión a DNA, inhibidores de proteasas de serina y otras proteínas, cuyo tamaño es 43-, 49-, 53-, 48-, 52-, 50-55-, 97-, 105 kDa (Nagano et al., 2009). El antígeno Ts-87 es una proteína de 38 kDa que se encuentra en la cutícula del parásito adulto que también forma parte de este grupo (Gu et al., 2013).

Finalmente, los componentes somáticos residuales son moléculas ampliamente distribuidas y conservadas que juegan un importante papel después de la muerte y destrucción del parásito, particularmente en algunas reacciones patológicas (Parkhouse y Harrison, 1989). Existen algunos antígenos somáticos compartidos con los TsES, tales como las proteínas de 49-, 52-,54-,60- y 62 kDa, las cuales parecen ser similares a aquellas cuyos pesos fueron 45-, 49- y 53 kDa y a 48- y 50-55 kDa de los TsES (Boireau et al., 1997; Dea-Ayuela y Bolas-Fernandez, 1999). A esta lista se suma la aminopeptidasa de *T. spiralis* (TsAP) una proteína de 54.7 kDa, localizada de manera primaria en el citoplasma y otros órganos internos de la LM (Zhang et al., 2013).

### **Antígenos TSL-1**

Diversos estudios han permitido la caracterización de los antígenos de *Trichinella* producidos durante las fases entérica y muscular. Muchos de estos estudios, se han basado en el análisis de patrones de reconocimiento por anticuerpos monoclonales y policlonales, permitiendo la identificación de ocho familias de antígenos de la LM denominados TSL1 a TSL-8 (Appleton et al., 1991; Ortega-Pierres et al., 1996; Bolás-Fernández y Corral Bezara, 2006; Yépez-Mulia et al., 2007). Otros estudios han clasificado a los antígenos de la familia TSL, en 11 grupos antigénicos con base en su localización, tamaño, inmunoreactividad con los TsES y otros productos solubles estadio-específicos (Boireau et al., 1997).

La característica principal de los TSL-1, es la de poseer residuos de tivelosa (3,6-dideoxy-D-arabinohexosa), un carbohidrato inusual (Wisnewski et al., 1993) (Appleton et al., 1991; Ortega-Pierres et al., 1996). En particular, los antígenos TSL-1, son abundantes en los TsES. Son producidos y almacenados en gránulos contenidos en células llamadas  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ -esticocitos en el esticosoma del parásito. Estos antígenos son estadio-específicos y suelen perderse durante el proceso acelerado de muda que caracteriza a cada estadio de desarrollo del parásito. También son moléculas inmunomoduladoras y blancos del sistema inmune. Aunque aún no se sabe la función exacta de la tivelosa, se sabe que este carbohidrato confiere la inmunodominancia a los TSL-1 (Denkers et al., 1990; Bolás-Fernández y Corral Bezara, 2006; Yépez-Mulia et al., 2007). Otros estudios sugieren que la

tivelosa tiene un papel en el proceso de invasión de la célula intestinal, ya que anticuerpos anti-tivelosa, no solo protegen de la invasión *in vitro* de la LM, sino también contribuyen a la exclusión de la larva e inhiben el proceso de muda del parásito (McVay et al., 2000; Gagliardo et al., 2002) y de manera importante, pueden conferir protección contra la infección por *Trichinella* en ratas neonatas (Carlisle et al., 1991). Entre los TSL-1 que predominan, se encuentran las glicoproteínas de 43 kDa (p43), 45-kDa, 52 kDa y el antígeno TsSP-1 proteasa de serina (Yépez-Mulia et al., 2007). De éstas, la gp43, es la que principalmente se ha caracterizado.

### La glicoproteína de 43 kDa

La glicoproteína de 43 kDa (p43) es un antígeno de superficie y un TsES estadio específico, producido y almacenado por los  $\alpha$ -esticocitos de la LM de *T. spiralis* (Vassilatis 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). Tiene localización a nivel de superficie de parásito, constituida por 344 aminoácidos con una secuencia señal típica y 2 sitios de N-glicosilación (Fig. 4) (Vassilatis et al., 1992). Así mismo, posee 2 residuos de tivelosa (3,6-dideoxi arabino-hexosa) cuya configuración es conferida por los  $\alpha$ -esticocitos de la LM, ya que ninguna de las proteínas secretadas por el estadio adulto se encuentra tivelosilada (Ortega-Pierres et al., 1996). Tiene un motivo de dimerización de hélice-asa-hélice (HLH), una característica común de las proteínas reguladoras a nivel transcripcional de músculo y que se asemeja al factor de diferenciación muscular MyoD (Vassilatis et al., 1992), aunque su efecto sobre la diferenciación del mioblasto aún no ha sido demostrado. Por otra parte, la p43 parece ser responsable de la formación de la cápsula que se produce inmediatamente después de la entrada a las células musculares por las LRN, debido a que el gen de la p43 y diversas isoformas de la misma, parecen expresarse en LM inmaduras (Mitreva et al., 2004).

De manera interesante, la secuencia de aminoácidos de la p43 de *T. spiralis* guarda una homología del 84% con una glicoproteína de 38 kDa de *T. pseudospiralis* (Nagano et al., 2004). 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., 1993) que pueden estar implicadas en la des-diferenciación de la célula muscular/formación de la célula nodriza (Vassilatis et al., 1996). Por otra parte, los estudios realizados por Jasmer y Kwak (2006) sugieren que la p43 podría tener funciones de una DNAasa II $\alpha$  (una endonucleasa ácida) (Jasmer y Kwak, 2006; MacLea et al., 2003), aunque esta función no está aún demostrada.

**MRIYIFLSAFWVILHNCLQIHAANCTCRTATDDTEWFLLFKPVG**  
**LLKAKIISPANAGWANDGANMNTDSGHALVQTLAEWMGPILDDMTALGYSNTPPKSTI**  
**TSQTTSSKGI LMFNETDGFWLLHTFERAFPNVAVSWPSKFTSEGHMALCLSI SED**  
**NVPLIVPALQYQEVVIYFGQVSSEKATEFADLTSLIDGSLPTITPPLWNQQTITTLNS**  
**ALSTVVYSKTSSSRLEMYGSFLAKVMVNMRIWAVTDNTLQTT CGGKIGFVKVVKSPV**  
**TIDGTQNDRSKDKSQWAVIDDKPVFCFTTNGYSTKQRTVAGSATCITQQVVSNFLFATS**  
**AANFI PCPYS**

**Figura 4. Secuencia primaria de la p43 de *T. spiralis*.** Se muestran los 344 aminoácidos que constituyen la p43, así como cada de los epitopos evaluados en estudios de protección contra la fase intestinal del parásito. Los 2 sitios de N-glicosilación son señalados en color rojo. Los péptidos de 40 aminoácidos señalados en color azul y amarillo no confirieron protección. Los péptidos de 40 (verde) y de 30 aminoácidos (rosa) son los únicos epitopos protectores derivados de esta glicoproteína, hasta ahora descritos. Esquema elaborado a partir de los datos disponibles en el GenBank M95499.1 y los datos reportados por Vassilatis et al., 1992; Robinson et al., 1995a, Robinson et al., 1995b, McGuire et al., 2002.

### Respuesta inmune contra *T. spiralis*

*T. spiralis* es un parásito único que puede colonizar el intestino delgado (estadio de A) (Blum et al., 2013), estar en circulación (LRN) y posteriormente alojarse en los músculos del mismo huésped (en estadio de LM). Por lo tanto, la infección por *T. spiralis* representa un gran reto para el sistema inmune del hospedero, por la presencia de diversos componentes y antígenos del parásito en cada uno de estos estadios de desarrollo (Gruden-Movsesijan et al., 2011).

**Respuesta inmune a nivel intestinal.** La respuesta inmune durante la fase intestinal ante la invasión y colonización de *T. spiralis* representa una compleja interacción entre mecanismos inflamatorios inespecíficos y adaptativos (Ishikawa et al., 1998). Inicialmente, existe una respuesta celular de tipo celular T-colaboradora tipo 1 ó Th1 (con presencia de IFN- $\gamma$ , IL-2 y TNF- $\alpha$ ) con posterior predominio de la respuesta Th2 (Wakelin, 1993; Ilic et al., 2012; Ashour, 2013), lo cual parece ser un mecanismo que el hospedero adopta para atenuar la respuesta inflamatoria (Khan et al., 2002; Liu et al., 2009). Esta respuesta Th2, es protectora y se caracteriza por la presencia de producción de citocinas IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13 (Grencis, 1997). Existe además, un reclutamiento de basófilos, eosinófilos, activación de células cebadas de mucosa (MMC), así como la hiperplasia de las células de goblet (Koyasu y Moro, 2011), siendo estas dos últimas células importantes en el proceso de expulsión del parásito (entre el día 8 y 14, dependiendo de la cepa del hospedero) (Knight et al., 2008). A este respecto, el proceso de expulsión es un mecanismo eficiente para



eliminar al parásito de la luz intestinal y dependiente de la respuesta Th2, mediada por IL-4 e IL-13 (Garside et al., 2000; Finkelman et al., 2004; Helmbly y Grencis, 2002). Además, IL-4 e IL-13 también pueden incrementar la contractibilidad del músculo del intestino delgado (Finkelman et al., 2004). El proceso de expulsión también requiere de TNF- $\alpha$  transmembranal, ya que contribuye a la secreción de IL-4 y a la producción de IgE (Ierna et al., 2009). Por otra parte, las células de goblet sufren hiperplasia y se les ha asociado con la sobreproducción de moco que puede proveer de un medio de atrapamiento de parásitos, aunque no es esencial durante el proceso de expulsión rápida en ratas (Bell et al., 1984).

Por otra parte, citocinas y quimiocinas relacionadas al perfil Th2, tales como la linfopoyetina estromal de timo (TSLP) y la IL-25 (también llamada IL-17E), así como la IL-33, son producidas por células epiteliales del intestino y pueden contribuir en la inducción de la respuesta tipo Th2 a nivel intestinal y a la inflamación en la superficie de las mucosas, seguida de la infección por helmintos. Más aún, células de la respuesta inmune innata, tales como las células colaboradoras naturales (NHC, por sus siglas en inglés), células progenitoras multipotentes tipo 2 (MPP<sup>type2</sup>), nucleos (nuocytes) y las células innatas colaboradoras tipo 2 (Ih2), son cruciales para el desarrollo de la respuesta Th2 en el contexto de infecciones por helmintos, independientemente de la respuesta inmune adaptativa (Saenz et al., 2010a; Saenz et al., 2010b; Koyasu y Moro, 2011).

Recientemente, la respuesta mediada por la IL-17 durante la fase intestinal de la infección por *T. spiralis*, ha recibido atención. Estudios realizados por Fu y cols., (2009) demostraron que la IL-17 influye en la contractibilidad del intestino durante la fase intestinal pero no en la sistémica (Fu et al., 2009). Otra citocina con efectos similares a nivel intestinal es la IL-9 (Khan et al., 2003). De hecho, la IL-25 intestinal promueve la inmunidad protectora contra la infección de *T. spiralis* a través de la producción de IL-9 antígeno-específica (Angkasekwina et al., 2013).

Otro aspecto importante en la respuesta intestinal, tiene relación con el intestino delgado y el grueso, los cuales son sitios anatómicos, en donde el parásito adulto de *T. spiralis* coloniza y que difieren en sus mecanismos de inmunidad. El intestino delgado representa un microambiente inhóspito para el parásito adulto, el cual se ve obligado a migrar hacia el intestino grueso ó hacia el colon, los cuales representan un ambiente inmunológicamente *virgen*. Por su parte, las citocinas IL-4, IL-5 e IFN- $\gamma$  parecen producirse de manera más temprana en el intestino grueso, pero las citocinas responsables de la expulsión (IL-9, IL-10 e IL-13) se retrasan ó están ausentes en ese compartimento (Blum et al., 2013). La mastocitosis a nivel de mucosas, es una característica histológica de la infección por *T. spiralis* y cuyo nivel máximo, coincide con el proceso de expulsión (Lawrence et al., 1998). Las células cebadas de las mucosas (MMC) son fuente de IL-4 y de TNF- $\alpha$ , citocinas

requeridas para regular la inducción de la respuesta protectora Th2 y la inflamación intestinal asociada con el proceso de expulsión (Ierna et al., 2008). Sin embargo, la mastocitosis solo está presente en el intestino delgado, recientemente se demostró que coincide con la producción máxima de IL-9 durante el proceso de expulsión (Blum et al., 2013).

Un número reducido de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) presentes en los TsES, se les ha identificado como responsables de dirigir la respuesta Th1 y Th2, cuando estos se unen a sus respectivos receptores de reconocimiento de patrón (PRRs) presentes en células de la respuesta inmune. En este contexto, el receptor de manosa (MR) de macrófagos, parece estar involucrado durante la estimulación *in vitro* con antígenos ricos en oligomanosa y de esta manera resultar en la producción de óxido nítrico (NO) y de IL-6 (Gruden-Movsesijan y Milosavljevic, 2006). Por otra parte, dado que los TSL-1 son N-glicanos, estos pueden ser reconocidos vía los receptores tipo *Toll* (TLR) y de esta manera, activar a las células cebadas (Dawicki y Marshall, 2007). En este contexto, un estudio reciente realizado por Scalfone y cols. (2013), encontró que la molécula MyD88, la cual sirve de molécula adaptadora para una gran variedad de miembros de TLR y otros receptores de la familia de la IL-1, juega un importante papel en la generación de una respuesta Th2. De manera contraria, la deficiencia de MyD88 parece debilitar la respuesta Th2 a través de la disminución de la producción de citocinas IL-5, IL-4, IL-10 e IL-13, además de retrasar el proceso de expulsión (Scalfone et al., 2013).

Los anticuerpos también participan en la respuesta inmune contra *T. spiralis*, particularmente en la reducción de la carga parasitaria en modelo murino. Generalmente la presencia de IgG1 e IgE acompaña las infecciones intestinales por nemátodos, incluyendo la de *T. spiralis*. De hecho, es posible detectar anticuerpos de la clase IgG desde el día 30 p.i. cuando la dosis infectiva de *T. spiralis* es baja (Reiterová et al., 2009) y desde el día 14 a dosis elevadas. Durante la infección por *T. spiralis* en ratas, existe una rápida respuesta de células B en el intestino delgado (en placas de Peyer), ya que es posible detectar desde el día 3 p.i. células B productoras de anticuerpos IgA, IgE, IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG2c. Estas células pueden seguir proliferando, hasta 7-10 días p.i. (Wagner et al., 2004). En ratas, la IgE tiene participación en el proceso de expulsión, bloqueando la invasión de las células epiteliales por parte de los organismo adultos de *T. spiralis*. Elevados niveles de IgE se asocian con la resistencia a la re-infección en el ratón (Gurish et al., 2004). La IgE también es necesaria para el reclutamiento de MMC y de basófilos, los cuales requieren de IgE unido a través del receptor FcεRI. El entrecruzamiento de la IgE en las células cebadas por el antígeno, activa la degranulación de las células cebadas, resultando en la liberación de mediadores preformados, tales como histamina, heparina, citocinas y proteasas (Negrao-Correa, 2001).

Por otra parte, estudios *in vivo* han demostrado que anticuerpos anti-tavelosa de la clase IgG, pueden proteger al epitelio de la invasión y causar que la larva establecida de *T. spiralis* abandone el nicho, además de interferir con la quimiorrecepción sensorial del parásito (McVay et al., 1998). Por su parte, los anticuerpos intestinales de clase IgA reducen la fecundidad en las larvas hembras, el tamaño de la LA, además de impedir el establecimiento de la larva infectiva en el intestino de ratón (Inaba et al., 2003a; Inaba et al., 2003b). Es importante destacar que la IL-4 regula la producción y el cambio de isotipo a IgE (Gurish et al., 2004), mientras que la IL-5 parece tener más participación en el cambio de isotipo a IgA (Koyasu y Moro, 2011).

**Respuesta inmune durante la fase sistémica.** El arribo de la LRN al músculo esquelético es un proceso que coincide con la respuesta inmune celular Th2, la cual es responsable del proceso de expulsión de los parásitos adultos e inductora de eosinofilia tisular y sanguínea (Fabre et al., 2009a). La fase intestinal de la infección puede influir en la fase muscular, ya que la ruta natural de infección puede determinar el grado de eosinofilia en el músculo. A este respecto, ratones infectados por vía intravenosa con LRN (donde la etapa intestinal de la infección está ausente) mostraron niveles disminuidos de eosinofilia, en comparación con los ratones infectados por vía oral y que experimentaron la fase intestinal de la infección (Fabre et al., 2009b). Como en muchos casos, al huésped le resulta extraño la infección por *T. spiralis* generándose una reacción inflamatoria, además de una alteración del sarcolema muscular, afluencia de macrófagos y eosinófilos, hipertrofia de fibras musculares, hiperplasia histocitaria y del tejido conjuntivo intersticial. También se forma una cápsula, la cual es una cubierta elipsoidal con el eje mayor en sentido de las fibras musculares que mide hasta 400  $\mu\text{m}$  de largo por 250  $\mu\text{m}$  de ancho y en su interior la larva viva en continuo crecimiento, hasta llegar a alcanzar hasta 900  $\mu\text{m}$  de longitud. En el quiste hay tejido conectivo, tejido fibroso y en los polos, glóbulos de grasa que aparecen tardíamente e indican 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). Los eosinófilos si bien contribuyen a la inflamación en músculo, ya que degranulan productos que pueden dañar al parásito *in vitro*, también pueden dañar al huésped (Lee, 1991; Fabre et al., 2009a) y se cree que están involucrados en el proceso de miocarditis en ratas infectadas con *T. spiralis*. En humanos, niveles elevados de eosinofilia generalmente están asociados con complicaciones neurológicas (i.e. neurotriquinelosis), con daño en músculo y miocardio (Bruschi et al., 2008).

*T. spiralis* induce a nivel de músculo, miopatía ó *miositis*, caracterizada por inflamación del músculo y tejido asociado (vasos sanguíneos). El proceso crónico de la miopatía se ve

sostenido por la presencia de un infiltrado celular que incluye neutrófilos, macrófagos activados y células T que destruyen el músculo. Cuando las células fagocíticas eliminan el tejido muscular necrótico, el huésped experimenta debilidad y dolor muscular. A medida que la inflamación se hace crónica, puede haber atrofia muscular. El daño no solo es causado por el parásito, sino por la presencia de células inflamatorias (macrófagos activados) capaces de producir elevados niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) y radicales libres. El proceso de estrés oxidativo, es revelado por la presencia del marcador glutatión-S-transferasa I y hemo-oxigenasa. Es importante mencionar también que, el grado de infiltrado celular inflamatorio depende de la cepa de ratón usado. También los macrófagos pueden producir la enzima Oxido-nítrico sintasa 2 (NOS 2), la cual transforma la L-arginina a óxido nítrico, este último responsable del daño al parásito, en el contexto de una respuesta Th1 (Bruschi y Chiumiento, 2011). Por otra parte, la respuesta inmune a *T. spiralis*, a nivel sistémico (nódulos linfáticos cervicales) se caracteriza principalmente por un fenotipo Th2 (IL-5, IL-10 e IL-13), aunque también se ha detectado la presencia de IFN- $\gamma$  después de la estimulación con antígenos somáticos del parásito (Beiting et al., 2007). Es posible detectar IgG1 e IgE durante la infección crónica (Beiting et al., 2004). Es raro encontrar células T CD4+, T CD8+ T y células B como parte del infiltrado celular alrededor de la célula nodriza (Bruschi y Dupoy-Camet, 2014).

### **Las vacunas como medida de control**

La vacunación representa una de las herramientas efectivas para la profilaxis y control de diversas enfermedades infecciosas con aplicación a nivel veterinario (Medina y Guzmán, 2001; Harris y Gause, 2011; Vercruysse et al., 2007).

Generalmente una vacuna dirigida en contra de parásitos helmintos, busca activar mecanismos inmunes efectores que puedan inducir daño en el parásito, exclusión del nicho intestinal o tisular, reducción de la tasa de fecundidad y por lo tanto afectación en la sobrevivencia del parásito (Viney, 2002). Sin embargo aún existen problemas asociados con el desarrollo de vacunas con actividad anti-helmíntica (Geldhof et al., 2007). La complejidad de los parásitos helmintos (en comparación con parásitos de vida libre, virus y bacterias), dada por su capacidad de poseer diferentes estadios de desarrollo, así como su capacidad de evocar distintos mecanismos inmunes, puede representar también un obstáculo en el desarrollo de vacunas (Maizels et al., 1999; Dalton et al., 2003; Meeusen y Piedrafita, 2003; Meeusen, 2011; Hewitson y Maizels, 2014). Es por ello que es indispensable el conocimiento acerca de los cambios en los patrones de migración de los parásitos helmintos y su capacidad para evadir la respuesta inmune del huésped, así como el conocimiento acerca de los mecanismos inmunes aún no definidos, inmunomodulación, variación en el tipo de respuesta inmune, y el tipo de interacciones que se establecen entre

el huésped y el parásito (Vercruysse et al., 2004). Si bien, la mayoría de los antígenos seleccionados con fines de vacuna en contra de parásitos helmintos, son seleccionados con base en su reactividad frente a anticuerpos (Maizels et al., 1999), el advenimiento de nuevas tecnologías en biología molecular y en vacunología reversa ha permitido conocer de manera más extensa el genoma de muchos parásitos y la identificación de nuevos antígenos como potenciales candidatos a vacuna (Geldhof et al., 2007, Vercruysse et al., 2007; Sette y Rappuoli, 2010; Schussek et al., 2014).

En el caso de las vacunas contra parásitos helmintos, existen ciertos factores que han dificultado su desarrollo. La complejidad de los helmintos en comparación con otros microorganismos (virus, bacterias), dificulta la búsqueda de nuevos antígenos potenciales que puedan usarse con fines de vacuna. Las características propias de cada parásito (ciclo de vida, reproducción sexual/asexual, variación antigénica, tropismo tisular) restringen el éxito de muchas vacunas, las cuales solo pueden tener una estrecha ventana de protección (Vercruysse et al., 2004). Por otra parte, aún existe un conocimiento escaso acerca de los mediadores que participan en el proceso de expulsión y de eliminación de los nemátodos intestinales (Harris, 2011).

La expresión de proteínas funcionales en células huéspedes heterólogas es una piedra angular de la moderna biotecnología (Gustafsson et al., 2004). *E. coli* es uno de los organismos de primera elección para la producción de proteínas recombinantes, por su fácil cultivo/crecimiento con alto rendimiento (Baneyx, 1999; Rosano y Ceccarelli, 2014). Si bien este sistema procarote es uno de los más caracterizados, existen algunos problemas asociados a su uso, tales como producción de proteínas insolubles (cuerpos de inclusión), con plegamiento inapropiado y ausencia de modificaciones postraduccionales (Geldhof et al., 2007).

El uso preferencial de codón también puede afectar la eficiencia de traducción y/o síntesis de proteínas a partir de una secuencia foránea. De hecho, este fenómeno surge como una consecuencia de las diferencias en la frecuencia de uso de codones sinónimos presentes en el DNA foráneo y la célula huésped (*E. coli*, *Salmonella*, etc.). En la actualidad existen diversos abordajes para minimizar la incorporación inadecuada de aminoácidos (consecuencia del uso preferencial de codón), entre las cuales se recurre a la mutagénesis silente sitio-dirigida ó la resíntesis de un gen (ó partes de éste) para lograr la optimización de codones. En todas estas estrategias, la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada por el DNA foráneo, no se altera, preservando sus propiedades antigénicas (Gustafsson et al., 2004).

## Modelos de vacunas contra *Trichinella spiralis*

Diversas estrategias se han empleado en el desarrollo de vacunas con la finalidad de obtener un alto nivel de protección contra los diferentes estadios de desarrollo, empleando en su gran mayoría modelos de rata y de ratón, debido a la intensa inmunidad que desarrollan a nivel intestinal (Murrell et al., 1985). En el cerdo se ha evaluado la inmunización con antígenos derivados del esticosoma, obteniéndose niveles de protección del 43-55% contra los estadios de LRN y LA (con tasa de fecundidad reducida) (Murrell y Despommier, 1984; Marti et al., 1987). Muchos de estos candidatos a vacuna (Tabla 2), se han basado en el uso de diferentes preparaciones antigénicas ó moléculas que participan en la interfase huésped-parásito.

La inmunización con LM irradiada (atenuada) también ha sido explorada, resultando en niveles de protección superiores al 80% en modelo de ratón (Agyei-Frempong y Catty, 1983), aunque en otros huéspedes este nivel de protección no ha sido observado (Nakayama et al., 1998). Si esta estrategia permitió un elevado grado de protección, tiene el inconveniente de que se requieren elevadas cantidades de material nativo.

Por otra parte, el conocimiento de las propiedades antigénicas de diversas proteínas de *T. spiralis*, ha sido posible gracias al uso de técnicas de inmunotamizaje, usando librerías de cDNA de diversos estadios del parásito (Zhu et al., 2005; Gu et al., 2008). El antígeno Ts87 de *T. spiralis*, el cual posee 24% de identidad con la p43 y la p49 del parásito ha sido empleado con fines de vacuna. Para ello, el antígeno Ts87 se expresó en sistema procarionte, resultando en una forma recombinante de la proteína (rTs87) de 40 kDa, la cual se empleó para inmunizar vía subcutánea con adyuvante completo de Freund a ratones BALB/c, generando niveles de protección de 28.7% de la carga parasitaria muscular. Sin embargo, en este estudio no se determinó el tipo de respuesta inmune asociada a este nivel de protección (Gu et al., 2008). Por otra parte, la inmunización de ratones BALB/c con la forma recombinante de la paramiosina de *T. spiralis* (rTs-Pmy) también mostró una reducción del 36.2% de la carga parasitaria de músculo. En este estudio, se detectaron elevados niveles de anticuerpos de la clase IgG anti-Ts-Pmy acompañados de una respuesta mixta Th1/Th2, con predominio de respuesta Th2 (Yang et al., 2008). La proteasa de serina del estadio adulto de *T. spiralis* (Ts-Adsp) redujo en un 46.5% la carga parasitaria muscular, con la presencia de una respuesta mixta de citocinas Th1/Th2 (IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-10 e IL-13), además de niveles detectables de IgG e IgE (Feng et al., 2013).

El uso de extracto antigénico total de LM, así como de TsES combinados con adyuvantes induce la producción de anticuerpos de las clases IgG1 e IgA, asociadas con una respuesta

mixta Th1/Th2 a nivel sistémico y de mucosas (Robinson et al., 1995a; Dea-Ayuela et al., 2006).

De manera interesante, estudios realizados por MacVay y cols., (1998) mostraron que los anticuerpos anti-tivelosa impedían la invasión del parásito a nivel de células epiteliales, sugiriendo que este carbohidrato inusual e inmunodominante (Wisnewski et al., 1993) podría jugar un papel importante en el establecimiento del parásito a nivel intestinal del ratón (Appleton y Romaris, 2001), además de conferir inmunogenicidad a los antígenos de la LM de *T spiralis* (Bolás-Fernandez y Corral Bezara, 2006; Yépez-Mulia et al., 2007).

Por otra parte, anticuerpos anti-tivelosa aceleran el proceso de expulsión en ratas (Ellis et al., 1994). Sin embargo, cuando ratones de la cepa NIH (altos respondedores) se inmunizaron con tivelosa, empleando albúmina sérica bovina (BSA) como acarreador y adyuvante completo de Freund, si bien produjeron altos niveles de IgG1, no protegieron contra el desafío con el parásito (Goyal et al., 2002). Estos datos contradictorios, pueden ser explicados por el hecho de que los anticuerpos anti-tivelosa usados *in vitro*, reconocieron una estructura N-ligada en su conformación tri- y tetra-antenaria con diferentes especificidades y afinidades, aunado al hecho de que también está fucosilada (McVay et al., 2000; Yépez-Mulia et al., 2007).

Por otra parte, la inmunización con péptidos sintéticos derivados de la p43, también ha sido explorada con fines de vacuna. A este respecto, la inmunización por vía oral con el péptido sintético que contiene los aminoácidos 40-80, en combinación con adyuvante completo de Freund, redujo el número de parásitos adultos hasta en un 64.3%, en comparación con el número de parásitos adultos recuperados en los grupos inmunizados con péptidos que contenían a los aminoácidos 81-120 y 121 a 160 (Robinson et al., 1995b). Otro péptido derivado de la p43 empleado con fines de vacuna, está conformado por los aminoácidos 219-239 (RLEMYGSFLAKVMVNMRIWAVTDNTLQTT), el cual co-administrado con la subunidad B de toxina del cólera (CTB) por vía intranasal, indujo una protección aproximada del 40% respecto de los grupos que recibieron solo CTB, a los 8 días p.i., acompañado de una respuesta mixta Th1/Th2, con predominio de respuesta Th2, con la producción de IgG1 e IgA (McGuire et al., 2002). Si bien estos niveles de protección son elevados, tienen el inconveniente de que el esquema de inmunización requiere de numerosos refuerzos, elevando su costo. Por otra parte, las proteínas recombinantes y los péptidos sintéticos son menos inmunogénicos que las vacunas inactivadas, por lo que el uso de un adyuvante generalmente se incluye en estas estrategias a fin de incrementar la inmunogenicidad del antígeno.

Las vacunas de tercera generación ó vacunas de DNA, que codifican para diferentes antígenos de la LM, empleando plásmidos para la expresión eucariote, también han sido materia de investigación. El antígeno de 31 kDa codificado por el gen de *T. spiralis* fue usado para inmunizar empleando biobalística ó *gene-gun* y el plásmido pcDNA-TspE1, vía intramuscular en ratones BALB/c, obteniendo una protección del 37.67% a nivel de músculo (Wang et al., 2006). La inmunización con una vacuna de DNA empleando el plásmido con fines de vacuna pVax, el cual permite la co-expresión del factor inhibitorio de migración de macrófagos (Ts-MIF) y el dominio proteico semejante a la cistatina (Ts-MCD-1); indujo una respuesta Th1 (IFN- $\gamma$ ), con la producción de anticuerpos IgG2a e IgG2b, dando una respuesta protectora parcial del 23.17% en ratones BALB/C (Tang et al., 2012).

Yang y cols., (2010b), demostraron que el uso de *Salmonella* como vehículo de inmunización para la entrega de plásmido con fines vacunales (pVax-Ts87), resultó en una reducción del 29.8% en el número de organismos adultos y en un 34.2% en la carga parasitaria muscular. Esta protección se caracterizó por la producción de IgA a nivel de mucosas y una respuesta mixta TH1/Th2 a nivel sistémico (IFN- $\gamma$ , IL-5, IL-6, IL-10). Sin embargo, en estos modelos de vacunas de DNA es posible apreciar que el nivel de protección es parcial y menor al 50%.

Recientemente, nuevas tecnologías como el empleo de fagos (T7-Tsp10) que expresan antígenos derivados del parásito, ha resultado en una reducción del 62.8% en el número de organismos adultos y en un 78.6% de la carga parasitaria de músculo, después del desafío con el parásito. Esta protección se asocia a una elevada producción de IL-4, IL-10 e IgG1 (Cui et al., 2013).

Todas estas estrategias solo han resultado en niveles variables de protección contra los diferentes estadios de desarrollo de *Trichinella*, induciendo respuestas inmunes de anticuerpos (IgG, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgA) y predominantemente de citocinas Th2 (IL-4, IL-5, IL-9, IL-13). No obstante, estas formulaciones evaluadas de manera experimental, aún no pueden garantizar la disponibilidad de una vacuna segura (Bruschi y Dupoy-Camet, 2014).

Al igual que en otros modelos experimentales de vacunas contra parásitos helmintos, la dificultad para obtener material antigénico nativo en suficiente cantidad, parece ser frecuente. En este sentido, se han desarrollado sistemas procariotes recombinantes que han permitido la producción y expresión de antígeno heterólogo (Gelhof et al., 2007). Por lo que el uso de sistemas procariotes basados en el uso de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium como acarreador bacteriano de antígenos ó péptidos heterólogos también ha resultado en significativos niveles de protección. La inmunización intranasal de ratones BALB/c, con *Salmonella enterica* serovar Typhimurium SL3261, que expresa en su superficie



(a través del Autotransportador ShdA) el péptido de 30 aminoácidos (Ag30) derivado de la p43 de *T. spiralis*, permitió la reducción del número de parásitos adultos a los 8 d.p.i., alrededor del 62%, superando el 40% logrado con la inmunización del péptido reportada por McGuire y cols., (2002). Esta protección se acompañó de una respuesta mixta de citocinas Th1/Th2 (IFN- $\gamma$ /IL-5), además de la producción de anticuerpos IgG, IgG1 que reconocieron a la proteína nativa en la superficie del parásito (Pompa-Mera et al., 2011). Otro modelo de vacunación *prime-boost*, empleando el mismo péptido pero expresado en la superficie bacteriana a través del autotransportador MisL de *Salmonella*, resultó en una reducción del 76% en el número de organismos adultos y en la producción de anticuerpos IgG antígeno-específicos (Castillo-Álvarez et al., 2013). Estos estudios, demostraron la utilidad de *Salmonella entérica* serovar Typhimurium SL3261 como sistema recombinante para la producción de antígenos heterólogos y como vehículo de inmunización; ya que permite obtener proteína de una manera sencilla y relativamente económica, conservando sus propiedades antigénicas. De esta manera, el uso de *Salmonella*, no solo proporcionó mayor inmunogenicidad al antígeno Ag30 de *T. spiralis*, sino también indujo inmunidad a nivel sistémico y local (intestinal), permitiendo la expulsión del parásito.

Tabla 2. Diferentes formulaciones con fines de vacuna, que han inducido protección contra *Trichinella spiralis* en diversos modelos experimentales.

Antígeno	Adyuvante	Hospedero	Vía de inmunización	Nivel de protección a nivel intestinal (%)	Nivel de protección a nivel muscular (%)	Referencia
Extracto crudo de LRN	CFA	cerdo	i.p.	n.d.	78	Marti et al., 1987.
Proteína de fusión Ts39	CFA	ratón BALB/c	i.p.	n.d.	78	Sun et al., 1994.
Extracto crudo de LA, LRN y LM	CFA	ratón BALB/c	i.p.	89	80	Darwish et al., 1996.
Péptido sintético de 30 a.a. de la p43	CTB	ratón NIH	i.n.	40	n.d.	McGuire et al., 2002.
DNA codificante de Ts31	Ninguno	ratón BALB/c	i.m.	n.d.	36.5-37.67	Wang Z.Q. et al., 2006.
Extracto total de LM	Eudragit L-100	ratón NIH	Oral	45.58	53.33	Dea-Ayuela et al., 2006.
Ts87 (phagedisplay system)	Ninguno	ratón BALB/c	s.c.	n.d.	28.7	Gu et al., 2008.
Ts-HSP-70	CFA	ratón BALB/c	s.c.	n.d.	37	Wang S et al., 2009.
Ninguno	<i>Lactobacillus casei</i> Shirota	ratón NIH y CD1	i.p.	78.6 (4 d.p.i.) 98.3 (12 d.p.i.)	80.9	Martínez-Gómez et al., 2009, 2011.
Ts-paramiosina (Pmy)	CFA y Montanide ISA 206	ratón BALB/c	s.c.	n.d.	33-36	Yang et al., 2010a
DNA codificante de Ts87	<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium	ratón BALB/c	oral	29.8 (4.d.p.i)	34.2	Yang et al., 2010b
Péptido recombinante de 30 a.a. de la p43 de la LM	<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium	ratón BALB/c	i.n.	61.8% (8 d.p.i.)	n.d.	Pompa-Mera et al., 2011.
DNA – MIF y MDF	plásmido pVax	ratón BALB/c	i.m.	n.d.	23-38	Tang et al., 2012, 2013.
Péptido de 30 a.a. de la p43 de la LM	<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium	ratón BALB/c	oral con refuerzo i.p.	76	56-62	Castillo-Álvarez et al., 2013.
Tsp-10 (phage display)	Fago T7	ratón BALB/c	i.p. e i.d.	62.8	78.6	Cui et al., 2013.
Ts-87 y Ts-Pmy (multi-epitope system)	KLH	ratón BALB/c	s.c.	18.7 – 26.3	35	Gu et al., 2013.
rTs-Adsp	Hidróxido de Aluminio	ratón BALB/c	s.c.	n.d.	46.5	Feng et al., 2013.
rTs-HPS-70	CFA	ratón BALB/c	s.c.	n.d.	38.4	Fang et al., 2014.

Modificado de: Bruschi y Dupoy-Camet, 2014.

Abreviaturas: Adyuvante completo de Freund (CFA), subunidad B de la toxina colérica (CTB), Hemocianina del molusco marino *Megathura crenulata* (KLH), intraperitoneal (i.p.), intranasal (i.n.), intradérmica (i.d.), subcutánea (s.c.), intramuscular (i.m), días post-infección (d.p.i.), no determinado (n.d).

## ***Salmonella* como acarreador de antígenos**

Las cepas atenuadas de diversas bacterias patógenas (*Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Yersinia spp.*, entre otros) han sido explotadas con fines de vacuna para la expresión y entrega de antígenos ó péptidos heterólogos a través de las mucosas (O'Gaora et al., 1990; Garmory et al., 2003; Medina y Guzmán, 2001; Barry et al., 2003; Spreng et al., 2006; Cheminay y Hensel, 2008; Galen y Curtiss, 2014). En este sentido, un sistema de entrega ó liberación de antígeno en el contexto de las vacunas, es aquel sistema micro ó nanoparticulado que promueve y optimiza la presentación del antígeno vacunal, moléculas inmunomoduladoras o ambas a las células de la respuesta inmune (Reed et al., 2013). Entre las ventajas que ofrecen estas bacterias es que sus componentes de la pared celular y de la membrana externa (OM) de *Salmonella* pueden funcionar como adyuvantes, gracias a sus propiedades inmunomoduladoras que les permiten ser reconocidas como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) (Barat et al., 2012; Roland y Breeemen, 2013 Daleke-Schermerhorn et al., 2014).

Inicialmente, las vacunas recombinantes basadas en *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ó Typhi, se modificaron genéticamente con la finalidad de prevenir la fiebre tifoidea en humanos (Pasetti et al., 2010). Posteriormente estas cepas se modificaron genéticamente para la generación de vehículos de inmunización atenuados para la entrega de diversos antígenos protectores, en niveles apropiados en una sola vía (oral, intranasal o por inhalación de dosis) en el sitio linfoide inductor apropiado (mucosas gastrointestinal, nasal, genito-urinaria) (Pathangey et al., 2009).

Una de las ventajas que ofrece *Salmonella*, es su capacidad de inducir respuestas humorales y celulares, tanto a nivel local (mucosas) como a nivel sistémico y una inmunidad protectora y de memoria a largo plazo en contra de diversos antígenos derivados de tumores (Guo et al., 2003; Zhu et al., 2010), virus (Jazayeri et al., 2012; Yu et al., 2012; Ault et al., 2013), bacterias (Bumann et al., 2010), parásitos protozoarios (Schorr et al., 1991; Konjufca et al., 2006; Yin et al., 2013), helmintos patógenos intestinales (Rosenkranz et al., 2003; Pacheco et al., 2005; Petavy et al., 2008; Yang et al., 2010b, Galen et al., 2010; Pompa-Mera et al., 2011; Ding et al., 2013) (Tabla 3).

La atenuación de una cepa de *Salmonella* con fines vacunales, mediante ingeniería genética, tiene el propósito de conferir propiedades al acarreador que lo habiliten para mimetizar una infección natural con el mínimo ó nulo grado de patogenicidad. Cabe destacar que esta atenuación se logra mediante mutaciones definidas (que no se revierten), que afectan las funciones metabólicas ó los factores de virulencia que son críticos para la sobrevivencia de *Salmonella* (Cárdenas et al., 1992; Chatfield y Dougan, 1997).

Esta atenuación además, debe estar balanceada con su inmunogenicidad a fin de prevenir la sobreactivación de la respuesta inflamatoria, la cual resulta en reactividad considerable (Tacket et al., 1997; Henderson et al., 1998; Bumann, 2000; Galen y Curtiss, 2014).

Tabla 3. Antígenos heterólogos expresados en *Salmonella* que evocan diversos tipos de respuesta inmune.

Cepa de <i>Salmonella</i>	Antígeno ó proteína heteróloga / patógeno	Localización del antígeno en el acarreador	Tipo de respuesta	Referencia
<i>S. typhi</i> CVD 908 $\chi$ <sup>4632</sup>	Proteína pre-S del virus de hepatitis B	Citoplasma	Humoral (IgG) y CTL	Nardelli-Haefliger et al., 1996.
<i>S. typhimurium</i> pnirBLTBMisL	TGEV del virus de gastroenteritis transmisible	Fimbria y membrana externa (MisL) (superficie)	Humoral (IgG)	Chen y Schifferli, 2007. Ruiz-Pérez et al., 2002.
<i>S. typhi</i> MO1ZH09	LTB de <i>E. coli</i>	Periplasma	Humoral (IgG)	Khan et al., 2007.
<i>S. typhimurium</i> $\chi$ <sup>9281</sup>	PspA de <i>Streptococcus pneumoniae</i>	Vesículas de membrana externa	Humoral (IgA en mucosas)	Muralinath et al., 2011.
<i>S. typhi</i> CVD 908 $\Delta$ AroC	CSP de <i>Plasmodium falciparum</i>	Citoplasma	Humoral (sIgA, IgG) y CTL	González et al., 1994.
<i>S. typhimurium</i> SR-11	Antígenos SERP de <i>Plasmodium falciparum</i>	Superficie (OmpA)	Humoral (IgG e IgM)	Schorr et al., 1991
<i>S. typhimurium</i> $\chi$ <sup>8879</sup>	Antígenos EASZ240 (esporozoíto) y EAMZ250 (merozoíto) de <i>Eimeria acervulina</i>	Forma extracelular secretada	Inmunidad celular	Konjufca et al., 2006.
<i>S. typhimurium</i> $\chi$ <sup>4558</sup>	TSOL18 de <i>Taenia solium</i>	Superficie	Humoral	Ding et al., 2013.
<i>S. typhimurium</i> LVR01	Tropomiosina (EgTrp) y proteína fibrilar similar a la paramiosina (EgA31), de <i>Echinococcus granulosus</i>	Periplasma y forma extracelular soluble	Humoral	Petavy et al., 2008

El diseño de las vacunas basadas en el uso de *Salmonella* como acarreador, debe considerar la adecuada selección del sistema de expresión para la producción del antígeno ó proteína heteróloga. En este sentido, los genes que codifican para las proteínas heterólogas (derivadas del patógeno) pueden insertarse en el cromosoma bacteriano ó en elementos episomales como los plásmidos recombinantes; siendo estos últimos una plataforma muy atractiva que ha permitido la expresión de proteínas recombinantes heterólogas e inmunogénicas con fines de vacuna, de manera sencilla y relativamente

económica. De manera general, estos plásmidos incluyen genes de resistencia a antibióticos, los cuales son usados como marcadores de selección para el mantenimiento y propagación de un plásmido, durante la construcción de la vacuna y su evaluación experimental (Cheminay y Hensel, 2008).

La síntesis de un antígeno recombinante codificado por un plásmido, supone una carga metabólica impuesta para el acarreador bacteriano que puede incidir en su velocidad de crecimiento, resultar en una sobreatenuación bacteriana y en una disminución en la capacidad de colonización y por lo tanto en su inmunogenicidad (Cheminay y Hensel, 2008).

Por el contrario, la pérdida espontánea de plásmido, si bien modifica alguna carga metabólica, también contribuye a que la bacteria sin plásmido tenga un sobre-crecimiento rápido sobre las bacterias que contienen plásmido, llevando a reducir su inmunogenicidad (Galen et al., 2009; Wang et al., 2013b; Galen y Curtiss, 2014).

La síntesis de la proteína heteróloga debe ser un proceso estrictamente regulado (Galen y Curtiss, 2014), lo cual no es sencillo de obtener, si se considera que la carga metabólica de la hiperexpresión antígeno a menudo resulta en la pérdida de virulencia y la viabilidad. Los sistemas ó plásmidos de expresión inducibles han sido desarrollados con la finalidad de minimizar *in vitro* e *in vivo*, la carga metabólica impuesta (Loessner et al., 2008).

El uso de plásmidos de bajo número de copia que incluyen promotores inducibles *in vivo* e *in vitro*, ha permitido la expresión del antígeno en niveles deseables sin comprometer la viabilidad y el metabolismo bacteriano del acarreador (Bumman, 2001; Ruiz-Pérez et al., 2002; Ruiz-Olvera et al., 2003; Spreng et al., 2006; Galen et al., 2010; Wang et al., 2011). Una elevada expresión constitutiva del antígeno en el acarreador, puede resultar en una carga metabólica para la cepa atenuada de *Salmonella* y reducir su estabilidad para interactuar con los tejidos linfoides y finalmente comprometer de manera negativa la respuesta inmune. Una solución a esta situación, es el uso de sistemas de expresión que contienen promotores inducibles *in vivo*, los cuales permiten la síntesis de elevados niveles de antígeno, pero solo cuando el acarreador bacteriano ha alcanzado su tejido blanco (Henderson et al., 1998; Wang et al., 2011). De esta manera, se puede evocar tanto inmunidad local, como sistémica contra el antígeno heterólogo y en contra del propio acarreador (Medina et al., 1999; Hopkins et al., 2000; Curtiss et al., 2010) y funcionar como vacuna multivalente (Galen et al., 2010). De hecho, *Salmonella* es un patógeno facultativo que ha evolucionado para residir y replicar en células dendríticas y macrófagos en las placas de Peyer (PP) y en otros órganos linfoides, en donde puede activar la respuesta inmune (Medina et al., 1999; Hopkins et al., 2000, Spreng et al., 2006), gracias a su

capacidad para ganar acceso a las células de la respuesta inmune (células profesionales presentadoras de antígeno; APC) y así contribuir a la eventual presentación de antígeno (Galen et al., 2009; Pasetti et al., 2010).

La localización del antígeno heterólogo en el acarreador de *Salmonella*, es otro factor importante que puede determinar el tipo y la calidad de la respuesta inmune (Henderson et al., 1998; Cheminay y Hensel, 2008; Galen et al., 2010; Chen et al., 2011). De esta manera, antígenos que son expresados en los compartimentos celulares más externos del acarreador bacteriano (espacio periplásmico, membrana externa) ó que son secretados, no solo son más inmunogénicos (Lee et al., 2000; Gómez-Duarte et al., 2001), sino también favorecen la respuesta inmune de tipo humoral. Por el contrario, antígenos heterólogos expresados en el citoplasma favorecen más una respuesta de tipo celular citotóxico (Gentschev et al., 1995; Hess et al., 1996; Hess et al., 2000; Kang et al., 2002). Además de la expresión de proteínas heterólogas antigénicas, la detección por parte de las células TCD4+ requiere del procesamiento y presentación de antígenos en el contexto de moléculas de histocompatibilidad clase II (MHC-II) (Barat et al., 2012).

Existen diversos sistemas que permiten la expresión de péptidos y proteínas heterólogas en la superficie bacteriana del acarreador (*autodisplay*, auto-mostramiento); entre los cuales destacan los autotransportadores, las proteínas de membrana externa (OMP) y las proteínas asociadas a fimbria (Chen y Schifferli, 2007; Jose y Meyer, 2007, Pore y Chakrabarti, 2013).

Por su parte, la secreción ó exportación de proteínas ó péptidos heterólogos, puede lograrse mediante el uso de diversos sistemas de secreción que de manera natural existen en la bacteria. Estos sistemas incluyen al sistema de secreción tipo I (cassette de unión a ATP, hemolisina, *Hly*) (Gómez-Duarte et al., 2001; Hahn y Specht, 2003), vesículas de membrana externa (OMVs) (Muralinath et al., 2011; Bonnington y Kuehn, 2014; Daleke-Schermerhorn et al., 2014) y el uso de secuencias señales de tráfico como la  $\beta$ -lactamasa (Kang y Curtiss, 2003; Choi y Lee, 2004) y secuencias de reconocimiento para proteasas (sitio para la Omp T proteasa) (Ruiz-Olvera et al., 2002; Luria-Pérez et al., 2007). La eliminación de dominios transmembranales de proteínas heterólogas, también es una estrategia para secretar la proteína heteróloga hacia el espacio extracelular (Green et al., 2002).

Todos estos aspectos colocan a los acarreadores de *Salmonella* como una estrategia de vacunación relativamente económica y prometedora para inducir inmunidad a nivel de mucosas y a nivel sistémico (Curtiss et al., 2010; Pasetti et al., 2010).

## Otros factores que influyen en la inmunogenicidad de una vacuna

Además de las propiedades antigénicas de una proteína, la memoria inmunológica constituye la base de la vacunación y se define como la capacidad del sistema inmune para responder con mayor vigor al re-encuentro con el mismo patógeno ó inmunógeno de manera persistente aún en ausencia de antígeno homólogo (Sallusto et al., 2010). De hecho, esta respuesta puede ser mantenida por un prolongado período de tiempo después de la eliminación del material vacunal. La inducción de memoria inmunológica es un aspecto central deseable para todos los esquemas de vacunación. La memoria inmunológica está constituida por un sistema homeostático altamente complejo que involucra a clonas de células B y T, capacitadas para responder al encuentro secundario de un patógeno ó un derivado de este (ó encuentro primario en individuos vacunados), de manera más robusta y acelerada (Kaufmann, 2007).

Las células B de memoria son la principal fuente pre-existente de anticuerpos neutralizantes (Pulendran y Ahmed, 2006; Kaufmann, 2007). Es por ello que uno de los principales intereses del desarrollo de las vacunas clásicas con fines profilácticos, es la optimización de la respuesta de células B, las cuales se desarrollan en células plasmáticas productoras y secretoras de anticuerpos con distintas actividades (Kaufmann, 2007). Una vez que las células B son activadas por la unión del antígeno (T-dependiente) al receptor (BCR) en los centros germinales, una parte de estas células (B220+, CD19, CD11B-) adquiere la capacidad de sobrevivir por un largo período de tiempo sin un estímulo antigénico continuo, gracias a que expresan la proteína antiapoptótica Bcl-2. Si bien una parte de las células B vírgenes pueden ser retenidas en el órgano linfoide donde se generan, las células B de memoria salen de los centros germinales y recirculan en la periferia listas para un encuentro secundario con el antígeno. Estas células B de memoria, se caracterizan por mostrar receptores de antígeno de alta afinidad y varios isotipos de inmunoglobulinas, cuya producción se acelera después de un encuentro secundario con el antígeno. La maduración de la afinidad de los anticuerpos se incrementa con la estimulación antigénica repetitiva y es consecuencia de de la activación de las células B inducida por las células T y por la hipermutación somática. Una vez que estos anticuerpos de alta afinidad se producen, son capaces de neutralizar la infectividad de una amplia variedad de patógenos (Kaufmann, 2007).

En el caso de las células B de memoria para antígenos T-independientes (B-1, CD19+, CD11b+, B220<sup>low</sup>) han sido identificadas en la respuesta contra los carbohidratos presentes en la cápsula de *Streptococcus pneumoniae* y *Neisseria meningitidis* (McHeyzer-Williams et al., 2000).

Con respecto a las células T de memoria, estas expresan L-selectina (CD62L) y el receptor 7 para quimiocinas (CCR7), los cuales son marcadores importantes para el *homming* hacia los ganglios linfáticos, ya que interactúan con las vénulas endoteliales superiores (HEV, por sus siglas en inglés). Existen de 2 tipos: de memoria central y de memoria efectora. Las primeras residen en los ganglios linfáticos y se replican eficientemente. Expresan en gran medida CD62L y CCR7. De hecho, durante un segundo encuentro con el antígeno, se desarrollarán a células T efectoras totalmente diferenciadas y sufrirán apoptosis, una vez que hayan realizado sus funciones (Sallusto et al., 2004). Por su parte, las células de memoria efectoras, residen en los tejidos, se replican de manera menos eficiente y expresan pocos niveles de CD62L y CCR7. De tal manera que, la respuesta inmune protectora inducida por una vacuna (antígeno más adyuvante ó acarreador vivo), inducirán células T de memoria de ambos tipos, con una preponderancia hacia la memoria central de célula T a largo plazo (Kaufmann, 2007).

### **Adyuvantes**

Los adyuvantes (del latín *adjuvare* = ayudar), se definen como compuestos que pueden incrementar y/o modular la inmunogenicidad intrínseca de un antígeno, permitiendo el uso de dosis antigénicas menores y en pocas aplicaciones. Estos compuestos pueden ser sintéticos ó moléculas endógenas naturales con capacidad para inmunomodular, mejorar y/o incrementar la respuesta antígeno-específica, polarizando la respuesta en cierta dirección (inducción de respuestas de células T citotóxicas, Th1 ó Th2) (Guy, 2007). Existe una gran cantidad de adyuvantes disponibles que se encuentran en fase clínica (Tabla 4). Muchos de ellos han mostrado ser efectivos en modelos animales experimentales (Shibaki y Katz, 2002; Reed et al., 2013).

El uso de adyuvantes ha proporcionado una manera de aumentar la inmunogenicidad, ya que además de las propiedades pro-inflamatorias que pueda tener, los adyuvantes pueden incrementar el tiempo de vida media del antígeno, previniendo su degradación *in vivo* y de esta manera incrementan la posibilidad de exponer el antígeno por más tiempo, frente al sistema inmune del hospedero (Perrie et al., 2008).

De manera tradicional, los adyuvantes son clasificados en tres clases: como 1) moléculas inmunoestimulantes (IM) que incluyen ligandos de TLRs, ligandos de NLRs (NOD-like), saponinas etc. De hecho, se considera que la inclusión de estos componentes también inmunomoduladores, puede incrementar de manera adicional la inmunidad (Perrie et al., 2008). 2) sistemas de entrega (sistemas basados en plataforma de partícula) que promueven la entrega del antígeno con fines de vacuna (sales de aluminio) y 3) Sistemas combinados que incluyen moléculas IM y sistemas de entrega de antígeno (Reed et al.,



2013; Egli et al., 2014). También existen moléculas endógenas ó ligandos de receptores clave en el curso de una respuesta inmune, que pueden funcionar como adyuvantes naturales, ya que pueden mimetizan los mecanismos involucrados para generar inmunidad.

### **C3d como adyuvante molecular**

Diversos estudios han aportado evidencias respecto de los beneficios de usar el adyuvante molecular C3d. Las proteínas de fusión que contienen antígenos derivados de patógenos y múltiples copias de C3d, han permitido aumentar la respuesta de anticuerpos antígeno-específicos, en contra de una gran variedad de agentes patógenos (Dempsey et al., 1996; Green et al., 2002; Tong et al., 2006; Kolla et al., 2007; Li et al., 2009; Xu et al., 2010; Musa et al., 2014). Esta molécula es un producto de degradación del componente C3 del complemento, el cual es un sistema de más de 25 proteínas solubles y de membrana que se activan en cascada, mediante 3 vías (la vía clásica, la vía alternativa y la vía de lectinas). Todas estas vías convergen en la C3 convertasa, la cual corta el tercer componente del complemento llamado C3. Este evento conduce a las funciones efectoras del sistema del complemento, las cuales incluyen la formación de anafilotoxinas (e.g. C3a y C5a), la formación del complejo de ataque a membrana (C5b, C6, C7, C8 y C9) y la opsonización de microorganismos por unión covalente de a un residuo de Cisteína (Cys) que queda expuesto tras la hidrólisis proteolítica. Este residuo de Cys está presente en todos los subsecuentes cortes de los fragmentos iC3b, C3dg y C3d (Carroll, 2004; Carroll, 2008; Toapanta et al., 2010).

Una vez que C3d se ha formado, esta molécula puede unirse al antígeno y de manera simultánea, unirse al receptor de complemento 2 (CR2 ó CD21)/CD35 (Weis et al., 1984; lida et al., 1983) presente en las células B y células dendríticas foliculares (FDCs) (Kolla et al., 2007). CD21 es parte del complejo que incluye al receptor de células B (BCR) de membrana, al igual que el CD19 y Tapa-1 (CD81) (Matsumoto et a., 1991). La unión del antígeno acoplado a C3d al CR2 facilita su incorporación por el BCR (IgM de membrana más Igβα e Ig β) y el procesamiento del antígeno y su presentación a células T CD4+ en asociación a moléculas clase II (MHC II). El entrecruzamiento del BCR y el CD21 amplifica la activación simultánea disparada por las moléculas asociadas a estos receptores (Igβα e Ig β y CD19, respectivamente) (Carter y Fearon, 1992; Prechl et al., 2002; Lyubchenko et al., 2005), teniendo como resultado la activación de la vía intracelular fosfoinosítido 3-cinasa (PI3K) (Fig. 5). La vía de transducción de señales de la vía PI3K, es un eje central en el control de la homeostasis de células B, sobrevivida, activación de la inmunidad humoral y diferenciación de células B inmaduras a células B maduras (Pauls et al., 2012). La expresión del CR2 (CD21) y el CR1 (CD35) también es necesaria para la sobrevivida de la célula B

(Carroll, 2004), ya que ratones deficientes en estos marcadores poseen un repertorio de células B alterado (Fleming et al., 2002).

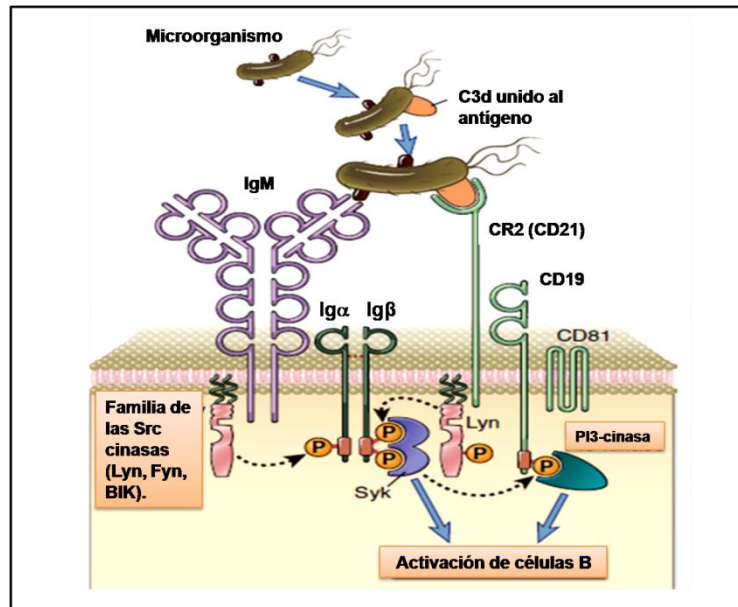
Tabla 4. Clases de adyuvantes clínicamente probados

Nombre del adyuvante	Clase	Mecanismo ó receptor	Tipo de Respuesta inmune	Fase clínica ó nombre del producto autorizado
Análogos de dsRNA, poly (I:C)	IM	TLR3	Ab, Th1, células T CD8+	Fase I
Saponina (QS21)	IM	Desconocido	Ab, Th1, Th2, células T CD8+	Fase III
Flagelina	IM	TLR5	Ab, Th1, Th2	Fase I
CpG ODN	IM	TLR9	Ab, Th1, células T CD8+	Fase III
Sales de aluminio (oxihidróxido de aluminio, fosfato de aluminio)	PF	Nalp3, ITAM, entrega de antígenos	Ab, Th2	Numerosos productos autorizados
Virosomas	PF	Entrega de antígeno	Ab, Th1, Th2	Epaxal, Inflexal V
Emulsiones (MF9, ASO3, AFO3, SE)	PF	Reclutamiento de células inmunes, incorporación de antígeno	Ab, Th1, Th2	Fluad, Pandemrix
ASO4 (MPL, sales de aluminio)	C	TLR4	Ab, Th1	Cervarix
IC31 (CpG, péptidos catiónicos)	C	TLR9	Ab, Th1, células T CD8+	Fase I
ISCOMs	C	Desconocido	Ab, Th1, células T CD8+	Fase 2

Abreviaturas: Respuesta de anticuerpos (Ab), antígeno (Ag), molécula inmunoestimulante (IM), respuesta T colaboradora tipo 1 (Th1), respuesta T colaboradora tipo 2 (Th2), formulación particulada (PF), combinación de IM+PF (C), RNA de doble cadena (dsRNA). Tabla modificada de: Reed et al., 2013.

El acoplamiento entre el complejo CD21/CD19/CD81 y la molécula C3d unido a antígeno, trabaja de manera sinérgica y de esta manera se disminuye el umbral de activación de las células B antígeno-específicas. El efecto es mucho más significativo que el umbral de activación alcanzado solo con el solo antígeno unido al BCR (Carter y Fearon, 1992). Lo anterior, además de permitir el cambio de isotipo, contribuye a la aceleración de la maduración de afinidad de los anticuerpos en los centros germinales, aumentando de manera significativa los títulos de anticuerpos antígeno-específicos. Es probable que la unión de los conjugados C3d-antígeno a los receptores del complemento (CD21 y CD35) conduzca a la retención de antígeno en las FDCs (en el bazo) ó en la superficie de las células B y de esta manera, se prolongue la señalización por el complejo BCR, el cual a su

vez conduce a una activación aumentada en la célula B (Cherukuri et al., 2001; Fang et al., 1998; Carroll, 2004). La retención de antígeno-C3d puede incrementar el tiempo de vida media del antígeno actuando como molécula co-estimuladora (Bergmann-Leitner et al., 2006).



**Figura 5. Papel del complemento en la activación de la célula B.** La célula B expresa un complejo que incluye correceptores CD21 (CR2), CD219 y CD81. C3d puede unirse simultáneamente un antígeno derivado de un microorganismo y a su receptor CR2 (CD21). El entrecruzamiento producido por la unión del antígeno al BCR y el C3d unido a CR2 conduce a la activación de las células B, mediante la cascada de señalización intracelular fosoinositido-3 cinasa (PI3K). Modificado de: Abbas et al., 2012.

De esta manera, el C3d funciona como un adyuvante molecular natural a través del complejo ligando-receptor, C3d-CR2, conectando la inmunidad innata con la respuesta inmune adaptativa, resultando en la activación de células B, procesamiento y presentación de antígeno, así como producción de anticuerpos (Toapanta et al., 2010). CD21 también está involucrado en la activación de células B, generación de memoria inmunológica, cambio de isotipo y tolerancia inmunológica de células B (Matsumoto et al., 1991; Fearon and Carter, 1995).

### P28: El dominio mínimo de unión del C3d a su receptor CR2 (CD21)

La molécula de C3d posee propiedades de adyuvante y ha sido evaluada en diversos estudios. Esta molécula está conformada por aproximadamente 296 aminoácidos. El número de sitios de unión de esta molécula a su receptor el CD21 es controversial. Diversos estudios enfocados a determinar los aminoácidos del dominio mínimo de unión del C3d a su

receptor CD21, han revelado que los aminoácidos 228-239 (1199-1210 del C3) parecen interactuar directamente con el CD21 (Clemenza e Iseman, 2000). Otros estudios han demostrado que los aminoácidos en posiciones 83, 84, 170 y 163 son cruciales para la interacción con el CD21 (Hannan et al., 2005; Toapanta et al., 2010). Sin embargo, un estudio realizado por Lambris y cols., (1985) demostró que los aminoácidos 1205-1214 (KFLTTAKDKNRWEDPGKQLYNVEATSYA) de la secuencia de C3 correspondía al dominio mínimo de unión al CD21. Este dominio contiene 28 aminoácidos (P28) y puede activar a las células B, aunque con menos eficiencia que el C3d completo (Lambris et al., 1985; Servis y Lambris, 1989; Tsokos et al., 1990). No obstante, este dominio mínimo de unión al C3d (P28) ha sido fusionado a diversos antígenos en múltiples copias para inducir inmunidad humoral en elevados niveles en comparación con los niveles inducidos por la vacunación con antígeno solo (Wang et al., 2004; Bower y Ross, 2006; Bergmann-Leitner et al., 2007; Xu et al., 2010; Zhang et al., 2011).

En la Tabla 5, se muestra diversos estudios en los cuales se ha empleado el C3d ó su dominio mínimo de unión al CD21 (p28) como adyuvante en modelos experimentales de vacunas dirigidas contra numerosos patógenos.

Tabla 5. Uso del adyuvante C3d ó su dominio mínimo de unión (p28) al CD21.

Antígeno (patógeno)	Tipo	Adyuvante	Respuesta a la inmunización	Referencia
Hemaglutinina soluble (sHA) (Virus de Influenza)	Vacuna de DNA	C3d <sub>3</sub>	Aceleración de la inducción de anticuerpos neutralizantes y protección	Ross et al., 2000.
Hemaglutinina (HA) (Virus de Influenza)	Vacuna de DNA	C3d <sub>3</sub>	Inmunidad heterosubtípica y elevados títulos de anticuerpos y respuesta Th2	Mitchell et al., 2003.
gp120 (Virus de Inmunodeficiencia humana, VIH)	Vacuna de DNA	P28 <sub>4</sub>	Respuesta humoral (IgG, IgA) Respuesta de citocinas IL-4 e IFN- $\gamma$ .	Bower y Ross, 2006.
Gonadotropina coriónica (hCG $\beta$ ) de humano	Vacuna de DNA	C3d <sub>3</sub>	Respuesta Th2 (IL-4)	Wang XL et al., 2006
Glicoproteína C (sgC) Virus de la pseudorrabia	Vacuna de DNA	C3d <sub>3</sub>	Respuesta de anticuerpos IgG, respuesta celular mixta Th1/Th2.	Tong et al., 2006.
Proteína circunsporozoítica (CSP) <i>Plasmodium berghei</i>	Vacuna de DNA	P28 <sub>3</sub>	IgG2a	Bergmann-Leitner et al., 2007
Fimbria A tipo I (FimA) de <i>Salmonella enterica</i> serovar Enteritidis	Proteína de fusión TF-FimA-mC3d <sub>2</sub>	C3d <sub>2</sub>	IgG elevada y protección 50- 100%	Musa et al., 2014

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La triquinelosis es una enfermedad zoonótica causada por nemátodos del género *Trichinella*. El mecanismo de transmisión de esta parasitosis en humanos es a través del consumo de carne de cerdo o de animales de caza, cruda ó mal cocida, infectados con el parásito. La infección más prevalente es causada por *T. spiralis*, la cual es una especie de amplia distribución mundial. En general, las estrategias actuales para la prevención de la triquinelosis, incluyen el diagnóstico y medidas sanitarias durante la producción de productos alimenticios derivados del cerdo, y administración de fármacos antihelmínticos como la principal medida de control de la triquinelosis. Si bien la mayoría de los fármacos con actividad antiparasitaria son seguros, económicos y efectivos contra un amplio espectro de parásitos, el alarmante incremento en el número de especies de parásitos resistentes a estos fármacos ha propiciado el desarrollo de métodos alternativos para el control de la triquinelosis, entre los cuales se encuentra el desarrollo de vacunas capaces de inducir protección contra la infección por *T. spiralis*. Diversos antígenos de la LM de *T. spiralis* han sido propuestos como candidatos a vacuna; uno de ellos es el péptido de 30 aminoácidos (Ag30) derivado de la p43 del parásito. El uso del péptido sintético (Ag30) en combinación con la subunidad B de la toxina del cólera por vía intranasal, indujo protección parcial (40%) contra el adulto de *T. spiralis* y una respuesta inmune del tipo Th2. Sin embargo, una limitante en el uso de péptidos sintéticos con fines de vacunación, es su reducida inmunogenicidad, requiriéndose su empleo en múltiples dosis y refuerzos, lo que eleva su costo de uso. En nuestro grupo de investigación hemos explorado la utilidad de la inmunización intranasal de ratones BALB/c, con el Ag30 expresado en la superficie del acarreador bacteriano *S. entérica* serovar Typhimurium SL3261, a través del autotransportador ShdA, con la finalidad de inducir protección contra la infección por *T. spiralis* a nivel intestinal. Aunque se obtuvo mayor protección que la conferida con el Ag30 sintético, ésta fue parcial (62 %) y los niveles de IgG1 e IL-5 fueron bajos. Se reconoce que la respuesta de tipo Th2 es requerida para la inmunidad protectora contra *T. spiralis* a nivel intestinal y que hay evidencias de que el adyuvante natural C3d y su dominio mínimo de unión (P28) a su receptor CD21, han sido empleados para inducir respuestas de tipo Th2 y títulos altos de anticuerpos antígeno-específicas; por lo que resulta de gran interés evaluar la protección conferida contra el adulto de *T. spiralis* empleando a *Salmonella* como acarreador del antígeno Ag30 fusionado a P28. También resulta de interés evaluar la protección conferida contra *T. spiralis* por la forma secretada de la proteína de fusión Ag30-P28.

## JUSTIFICACIÓN

A pesar de la eficacia y bioseguridad de los fármacos con actividad antiparasitaria en contra un amplio espectro de parásitos; el alarmante incremento en el número de especies de parásitos farmacorresistentes, ha propiciado el desarrollo de métodos alternativos para el control de la triquinosis, entre los cuales se encuentra el desarrollo de vacunas capaces de inducir protección contra la infección por *T. spiralis*. Considerando el ciclo de vida de este parásito, la producción de una vacuna efectiva contra la fase intestinal podría limitar el desarrollo de la fase sistémica de la infección. Por otra parte, diversos estudios han demostrado la utilidad del uso de *Salmonella enterica* como acarreador de antígenos en la inducción de inmunidad a nivel de mucosas contra una amplia variedad de patógenos intestinales. Las vacunas basadas en las fusiones de un antígeno conocido al adyuvante molecular C3d ó su dominio P28, ofrecen una alternativa viable de incrementar la inmunogenicidad del antígeno, polarizando la respuesta hacia una de tipo Th2; la cual es necesaria para la inmunidad y para el proceso de expulsión del parásito, durante la fase intestinal de la infección. Es por ello que, sería de gran interés para el presente trabajo, evaluar el potencial del adyuvante P28 en la inducción de la respuesta inmune a nivel local y sistémico en contra de la infección por *T. spiralis*, empleando a *Salmonella enterica*, como acarreador bacteriano de antígenos derivados de *T. spiralis*.

## HIPÓTESIS

La cepa atenuada de *Salmonella entérica* serovar Typhimurium SL3261 que expresa en su superficie, el péptido Ag30 de *T. spiralis*, fusionado a 3 copias del dominio mínimo ó del adyuvante molecular P28, inducirá mayor protección contra la infección intestinal por *T. spiralis* que la cepa de *Salmonella* que solo expresa el antígeno de interés sin el adyuvante molecular p28, en un modelo de triquinosis murina.

## OBJETIVO GENERAL

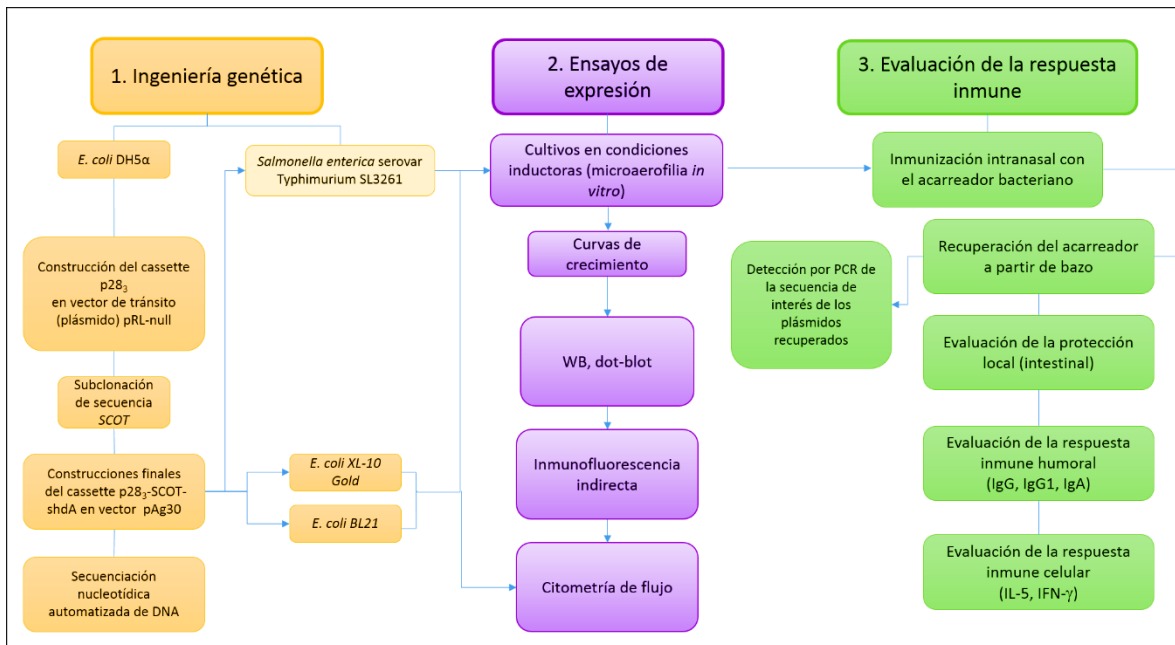
Evaluar la protección conferida contra *T. spiralis* a nivel intestinal por cepas vacunales de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium que acarrean un sistema de expresión basado en plásmidos y que permite expresar en la superficie de la bacteria de y/o secretar al antígeno Ag30 del parásito, fusionado a 3 copias del adyuvante molecular P28, en un modelo de triquinelosis murina.

## OBJETIVOS PARTICULARES

1. Construir un plásmido que permita la expresión en la superficie de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, del antígeno Ag30 de *T. spiralis*, fusionado a 3 copias del adyuvante molecular p28 (pAg30-p28<sub>3</sub>), empleando el sistema AT ShdA.
2. Construir un plásmido que permita expresar en la superficie de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium y eventualmente secretar el antígeno Ag30 de *T. spiralis* fusionado a 3 repetidos de p28 (pAg30-p28<sub>3</sub>-SCOT), empleando el AT ShdA y un sitio de reconocimiento para la Omp T proteasa.
3. Determinar el nivel de protección inducido contra *T. spiralis* a nivel intestinal por la inmunización intranasal con las cepas vacunales *Salmonella* pAg30-p28<sub>3</sub> y *Salmonella* pAg30-p28<sub>3</sub>-SCOT en un modelo murino de triquinelosis.
4. Evaluar la respuesta humoral a nivel intestinal (IgA) y a nivel sistémico (IgG, IgG1), evocado por las diferentes cepas recombinantes de *Salmonella* que expresan el antígeno Ag30 de *T. spiralis*, en un modelo murino de triquinelosis y previo al reto con el parásito.
5. Evaluar la respuesta inmune celular mediada por las citocinas IFN- $\gamma$  e IL-5, inducidas por la inmunización con las diferentes cepas vacunales de *Salmonella* que expresan el antígeno Ag30 de *T. spiralis*.

## MATERIAL Y MÉTODOS

De manera general, el diseño experimental se resume en la figura 6. Tres etapas comprendieron el desarrollo del presente estudio: Ingeniería genética (Tecnología de DNA recombinante), II) Evaluación de la expresión de proteínas recombinantes en el acarreador y III) Evaluación de la respuesta inmune.



**Figura 6. Diseño experimental del presente estudio.** Se muestran las tres etapas del diseño del estudio: I) Ingeniería genética, II) Ensayos de expresión y III) Evaluación de la respuesta inmune.

### I. Tecnología de DNA recombinante

El desarrollo de vacunas basadas en acarreadores bacterianos requiere de llevar a cabo, tecnología de DNA recombinante. Para ello, *E. coli* DH5 $\alpha$  se usó como la cepa huésped para la construcción de plásmidos. Asimismo, las cepas de *E. coli* BL21-D3 y XL-10 Gold se emplearon para la evaluación de la expresión y funcionalidad del sitio de reconocimiento para la Omp T proteasa (secuencia de corte SCOT). Por su parte, la cepa atenuada *Salmonella enterica* serovar Typhimurium SL3261 (Aro A: Tn 10), dependiente de ácidos aromáticos (Hoiseth y Stocker, 1981) se transformó con los plásmidos y se empleó como vehículo vacunal para la entrega de las proteínas recombinantes expresadas por este acarreador bacteriano, en un modelo de triquinosis murino. La tabla 6 resume las características de las cepas empleadas en el presente trabajo. Las preparaciones y manipulaciones de DNA, así como las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) se



llevaron a cabo de acuerdo a las especificaciones y los protocolos del Manual de Laboratorio de Clonación Molecular (Sambrook y Rusell, 2001) y de acuerdo a las instrucciones de los estuches comerciales empleados. Todas las enzimas de restricción y de ligación fueron de la marca *New England Biolabs* NEB®. La purificación de productos de PCR a partir de geles de agarosa se llevó a cabo con el estuche comercial QIAquick Gel Extraction Kit – Qiagen®. El análisis de todos los productos de PCR, así como fragmentos para llevar a cabo las subsecuentes reacciones, se analizaron en un equipo analizador de imágenes Kodak® ID 3.6 adaptado a una cámara digital EDAS 290.

**Tabla 6. Cepas bacterianas empleadas en el presente trabajo.**

Cepa	Genotipo	Referencia
<i>Escherichia coli</i> DH5α	SupE44 √ lac 169Φ 80lac Z√M 15hsd R17 recA1 endA1 gyrA 96 thi-1re1A1	Invitrogen®
<i>Escherichia coli</i> BL21-DE3	Omp T proteasa -	Stratagene®
<i>Escherichia coli</i> XL-10-Gold	Omp T proteasa +	Stratagene®
<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium SL3261	Aro A :: Tn 10	Hoiseh SK, et al. 1981

Todas las construcciones del presente estudio se derivan del plásmido pAg30 (Pompa-Mera et al., 2011), el cual codifica para un péptido de 30 aminoácidos (Ag30) derivado de la gp-43 kDa de *T. spiralis* (McGuire et al., 2002), el cual es expresado en la superficie de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium SL3261. La expresión de las proteínas de fusión de todos los plásmidos derivados se encuentra bajo el control del promotor *nirB* de la nitrato reductasa, el cual es inducible en condiciones de anaerobiosis o microaerófilas *in vitro* (Chatfield, 1992; Huang et al., 2000). Río arriba (hacia el extremo 5') el plásmido contiene parte del gen que codifica para la secuencia señal de la subunidad B de la toxina termolábil de *E. coli* (LTB), la cual asegura el tráfico de la proteína de fusión hacia el periplasma de la bacteria. Río abajo (hacia el extremo 3') se encuentra las secuencias codificantes de Ag30, seguida del péptido bandera FLAG y del autotransportador ShdA. Este sistema de expresión cuenta con el marcador de selección de resistencia a ampicilina. Todas las proteínas de fusión codificadas por los plásmidos contienen el péptido bandera FLAG, por lo que su detección se realizó a través de un anticuerpo dirigido hacia este marcador (Fig. 7). Las características particulares de cada uno de los plásmidos se resumen en la tabla 7.

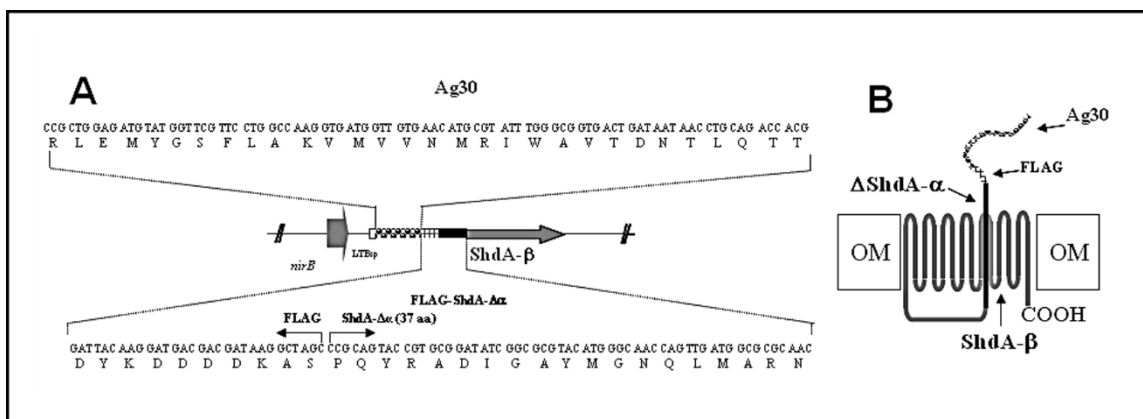


Figura 7. Proteína de fusión codificada por el plásmido pAg30. A) Secuencia de aminoácidos de cada una de los péptidos de interés. B) Modelo hipotético de automostramiento del péptido Ag30.

La estrategia general de clonación se resume en la figura 8. La construcción de los plásmidos comprendió primero la generación de tres copias independientes del dominio mínimo de unión p28 del adyuvante C3d (p28<sub>A</sub>, p28<sub>B</sub> y p28<sub>C</sub>) con distintos adaptadores que permitieron su inserción de manera sitio-dirigida en el vector de tránsito pRLnull (Promega®) (Tabla 7). Una vez clonadas en tándem las tres copias de p28 (p28<sub>3</sub>), este fragmento se obtuvo y se clonó en los plásmidos pAg30 y pAg30-SCOT. Las condiciones de PCR llevadas a cabo se muestran en el Apéndice (Tabla A1). A continuación se describe en detalle la tecnología de DNA recombinante realizada.

Tabla 7. Características de los plásmidos.

Plásmido	Tamaño* (pb)	Proteína de fusión codificada (NH <sub>2</sub> -----COOH)	Tamaño* (kDa)	Localización de la proteína de fusión codificada	Referencia
pnirBLTB <sup>5</sup>	2425	LTB	2.64	Periplasma	Ruiz-Pérez et al., 2002; Ruiz-Olvera et al., 2003.
pENP <sup>55</sup>	3415	LTB-FLAG-ShdA	39	Membrana externa	Pompa-Mera et al., 2011.
pAg30 <sup>555</sup>	3511	LTB-Ag30-FLAG-ShdA	42	Membrana externa	Pompa-Mera et al., 2011.
pAg30-SCOT	3587	LTB-Ag30-FLAG-ShdA	42	Medio extracelular (Ag30-FLAG)	Este trabajo
pRL-null	3320	NA	NA	NA	Promega®
pRL-null-p28 <sub>1</sub>	3464	NA	NA	NA	Este trabajo
pRL-null-p28 <sub>2</sub>	3608	NA	NA	NA	Este trabajo
pRL-null-p28 <sub>3</sub>	3752	NA	NA	NA	Este trabajo
pAg30-p28 <sub>3</sub>	3943	LTB-Ag30-FLAG-p28 <sub>3</sub> -ShdA	61	Membrana externa	Este trabajo
pAg30-p28 <sub>3</sub> -SCOT	4019	LTB-Ag30-FLAG-p28 <sub>3</sub> -ShdA	61	Medio extracelular (Ag30-FLAG-p28 <sub>3</sub> )	Este trabajo

\*Tamaño aproximado, NA = no aplica. <sup>5</sup> Control negativo sin bandera molecular FLAG. <sup>55</sup> Control negativo con bandera molecular FLAG (vector vacío). <sup>555</sup> Control positivo con bandera molecular FLAG.

**Construcción de la secuencia p28<sub>3</sub>.** Se diseñaron dos oligonucleótidos (p28-1 y p28-2) (Tabla 8) para generar mediante PCR (PCR<sub>1</sub>), una copia sencilla de la secuencia codificante de los 28 aminoácidos (1187-1214) (KFLTTAKDKNRWEDPGKQLYNVEATSYA) que comprenden el dominio mínimo de unión (p28) del adyuvante C3d a su receptor CD21 murino. El amplicón resultante (templado p28) también incluyó hacia el extremo 5', un conector (ó secuencia *linker*) compuesto por 2 repetidos de cuatro glicinas y dos serinas (G<sub>4</sub>S<sub>2</sub>) y favorecer el correcto plegamiento de la proteína, de acuerdo a los descrito por Bower y Ross (2006).

Para optimizar la expresión de las proteínas de fusión en *Salmonella*, se consideró el uso preferencial de codón (Miller, 1992) en el diseño de oligonucleótidos. Todos los productos de PCR que involucran secuencias de p28 se analizaron mediante geles de agarosa (Invitrogen-GE) al 1.5% preteñidos con bromuro de etidio 0.001% y se purificaron usando el estuche comercial QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen®). Se incluyó un marcador de tamaños moleculares (TrackIt™ 100 bp DNA Ladder, Invitrogen) en el análisis electroforético. Posteriormente, a partir del templado p28 y mediante tres reacciones independientes (PCR<sub>2</sub>, PCR<sub>3</sub> y PCR<sub>4</sub>) se generaron las secuencias codificantes de los repetidos p28<sub>A</sub>, p28<sub>B</sub>, y p28<sub>C</sub> respectivamente, con los sitios de restricción XhoI, HindIII, NdeI y SpeI que permitieron su clonación de manera sitio-dirigida. En todos los casos, 350 ng de inserto (copia de p28) se cortaron con 20 U de las enzimas de restricción correspondientes y se ligaron con 50 ng de vector de tránsito (plásmido pRL-null) usando 100 U de enzima T4 ligasa (NEB®) a 16°C durante 12 horas.

El producto de ligación (pRL-null-p28<sub>3</sub>) se usó para transformar bacterias *E. coli* DH5α mediante choque térmico (Sambrook et al., 2001). La selección de clonas positivas se realizó seleccionando aquellas clonas, cuyo tamaño de plásmido incrementaron su tamaño en aproximadamente 432 pb. A partir del plásmido pRL-null-p28<sub>3</sub>, se realizó una PCR (PCR<sub>5</sub>) para amplificar tres copias de la secuencia p28 (p28<sub>3</sub>), empleando los oligonucleótidos Null-SEQ-1 y Null-CDS-2. El producto p28<sub>3</sub> se cortó con las enzimas de restricción XbaI y BamH1 (p28<sub>3</sub>/XbaI·BamH1), se purificó y se reservó para las subsecuentes clonaciones.

Tabla 8. Oligonucleótidos empleados en el presente trabajo.

Primer	Sentido*	Secuencia (5' → 3')	Sitios de restricción
p28-1	S	CGAA <u>TCTAGA</u> GGCGGTGGCGGTAGCAGCGCGGTGGCGGCAGCAGCAAATTCCTGACCACCGCGAAAGATAAGAACCGCTGG	XbaI
p28-2	A	CGCG <u>GCTAGCACTAGT</u> CGCATAGCTGGTCGCAACCACGAAATACAGCTGTTCCCGGATCTCCAGCGGTTCTTATCTTTCGCGG	NheI, SpeI
p28-a	S	TATC <u>CTCGAG</u> GGCGGTGGCGGTAGC	XhoI
p28-b	A	GGCC <u>AAGCTT</u> CGCATAGCTGGTCG	HindIII
p28-c	S	ATAG <u>AAGCTT</u> GGCGGTGGCGGTAGC	HindIII
p28-d	A	GGCC <u>CATATG</u> CGCATAGCTGGTCG	NdeI
p28-e	S	AATT <u>CATATG</u> CTCGAGGGCGGTGGCGGT	NdeI
p28-f	A	GGCA <u>ACTAGT</u> CGCATAGCTGGTCG	SpeI
Null-SEQ-1	S	TG <u>TCTAGA</u> ACAGATCTCGAGGGCG	XbaI
Null-CDS2	A	<u>AGGATCCATGCATGCTAGC</u> CGCATAGCTGGTCGCTCCAC	BamHI, NsiI, NheI
Scot-E1	S	<u>CTAGA</u> AAACGCCCCGGCGGTGGCGGTGGCAAACGCGCGGTGGCGGTGGCCCCGAAACGCGCTAGCATGCATG	XbaI
Scot-E2	A	<u>GATCCATGCATGCTAGC</u> GCGTTTCGGGCCACCGCCACCGCCGCGTTTGCCACCG CCACCGCCCCGGGCGTTTT	BamHI, NsiI, NheI
pNir1	S	TTCAGGTAAATTTGATACATCAA	no aplica
FLAG-SEQ-1	S	GATTACAAGGATGACGAC	
shdA-Rv	A	GAGGGTCTGCATTTGCAG	no aplica

Todos los oligonucleótidos fueron sintetizados por IDT Technologies. \*S = Sentido; A = Antisentido

**Construcción de la secuencia SCOT.** Dos oligonucleótidos Scot-E1 y Scot-E2 (Tabla 8) fueron diseñados para generar, por reacción de acoplamiento, una secuencia corta de DNA (SCOT) que codifica para los sitios de escisión proteolítica para la Omp T proteasa y cuya secuencia de reconocimiento lo comprenden los aminoácidos KRPGGGGGKRGGGGGPKR (Ruiz-Olvera et al., 2003; Luria-Pérez et al., 2007). Para la reacción de acoplamiento se usaron 200 pmol de cada uno de los oligonucleótidos Scot-E1 y Scot-E2 y 80 µL de MgCl<sub>2</sub> 100 µM. La mezcla de reacción se incubó a 94°C durante 15 minutos y se dejó enfriar gradualmente durante 4 horas hasta llegar a temperatura ambiente. Posteriormente, se conservó a 4°C hasta su uso en otras reacciones de ligación.

**Construcción de los plásmidos pAg30-SCOT, pAg30-p28<sub>3</sub> y pAg30-p28<sub>3</sub>-SCOT.** Para subclonar las secuencias de interés p28<sub>3</sub> y SCOT, se usó el sistema de isocaudámeros de las enzimas de restricción NheI y XbaI. Brevemente, 100 ng de plásmido pAg30 se cortaron con las enzimas NheI y BamH1, desinsertando la secuencia shdA (942 pb), la cual se purificó y se reservó. Posteriormente 50 ng del plásmido linearizado pAg30/ NheI-BamH1 se ligaron con 350 ng de inserto p28<sub>3</sub>/XbaI-BamH1 bajo las condiciones arriba mencionadas. Este producto de ligación se usó para transformar *E. coli* DH5α. El tamizaje de clonas consistió en seleccionar las clonas, cuyo tamaño de plásmido descendiera aproximadamente a 3000 pb respecto del control pAg30 debido a la eliminación de shdA. Posteriormente, el plásmido resultante se cortó nuevamente con las enzimas NheI (sitio *de novo*) y BamH1 para permitir la reinserción de la secuencia shdA y de esta manera generar el plásmido pAg30-p28<sub>3</sub>. En este caso, la selección de clonas positivas consistió en identificar aquellas clonas cuyo tamaño de plásmido correspondiera a 3943 pb. Por otra parte, la construcción de las versiones de pAg30-SCOT y pAg30-p28<sub>3</sub>-SCOT se realizó partiendo de 100 ng de los plásmidos pAg30 y pAg30-p28<sub>3</sub>, los cuales se cortaron con las enzimas NheI y BamH1, generando la desinserción de la secuencia shdA (942 pb) (la cual se purificó y se reservó). 50 ng de las formas linearizadas de estos plásmidos (pAg30/ NheI-BamH1 y pAg30-p28<sub>3</sub>/ NheI-BamH1) se ligaron con 350 ng del producto de acoplamiento de SCOT en las condiciones arriba mencionadas. Posterior a la transformación de *E. coli* DH5α con estos productos de ligación, se seleccionaron clonas cuyo tamaño de plásmido correspondiera aproximadamente a 3587 y 2645 pb respectivamente. La secuencia shdA se reinsertó en los plásmidos intermediarios de interés. Finalmente, se purificó cada uno de los plásmidos mediante el estuche comercial QIAGEN® Plasmid Purification, de acuerdo a las instrucciones del proveedor.

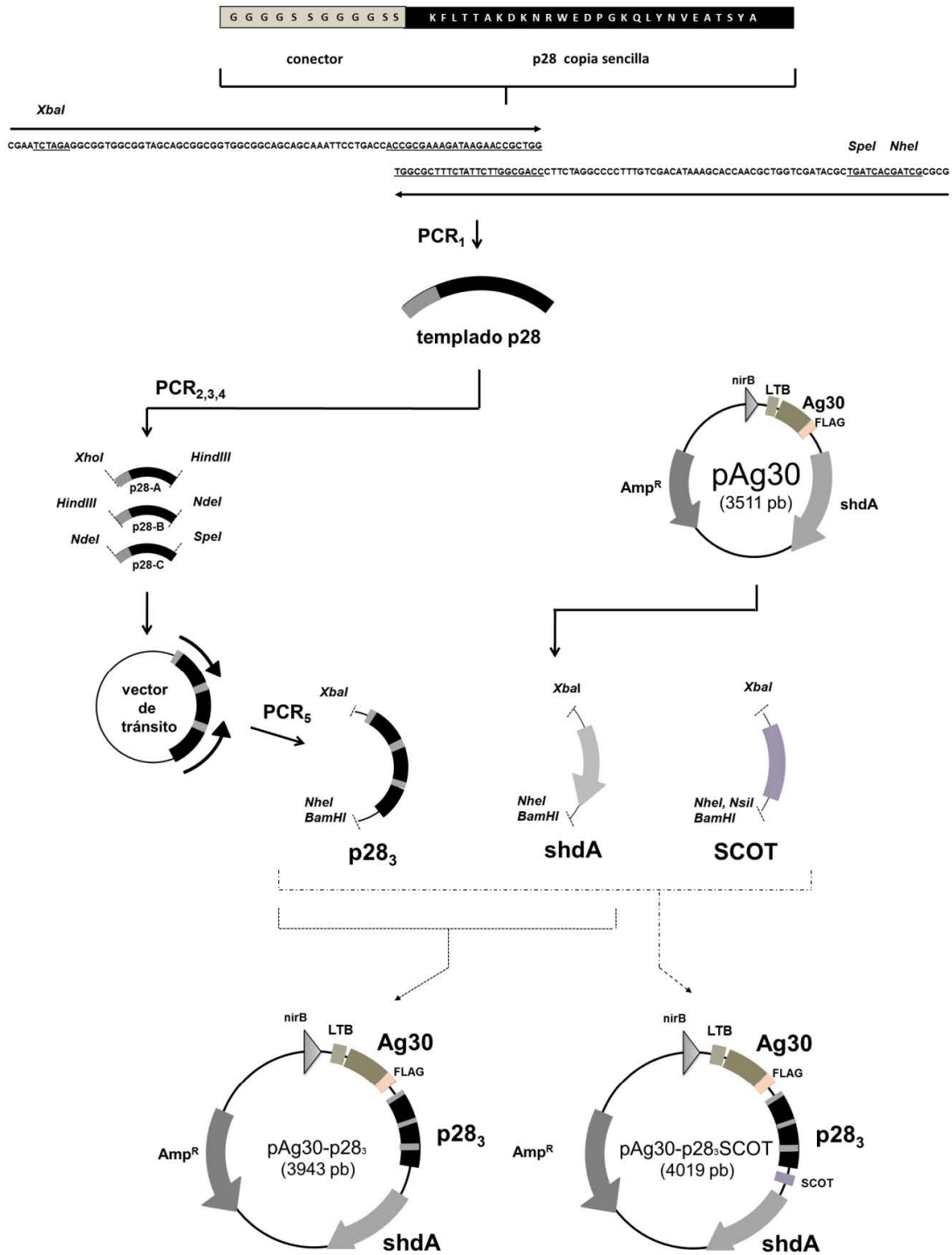


Figura 8. Estrategia general de clonación.

**Secuenciación nucleotídica automatizada.** El DNA de todos los plásmidos se verificaron mediante secuenciación nucleotídica automatizada de ambas hebras (sentido y antisentido) usando los primers pNir y ShdA-Rv (Tabla 8). Se usó un kit de secuenciación *BigDye Terminator* (Applied Biosystems, Foster City, CA), usando 20 ng de DNA templado se añadieron en cada reacción y el programa de termociclado que incluyó 25 ciclos de desnaturalización a 95 ° C durante 30 s, alineamiento a 50 ° C durante 15 s y extensión a 60°C durante 4 min. Las muestras se analizaron en un analizador genético ABI Prism 3130 (Applied Biosystems).

**Preparación y electroporación de bacterias electrocompetentes de *Salmonella entérica* serovar Typhimurium SL3261.** Se partió de un cultivo bacteriano de 250 mL de *S. enterica* serovar Typhimurium SL3261, en medio líquido BHI (DIFCO®) suplementado con 0.01% de ácido 2,3-ácido dihidroxibenzoico (DHB) (Sigma®, St. Louis, M.O), en fase logarítmica de crecimiento (D.O.= 0.7; 5 h aproximadamente). Se procedió a centrifugar a 3000 x g y se cosechó el paquete bacteriano. Se realizaron tres lavados con agua desionizada estéril, bajo condiciones de esterilidad y a 4°C en hielo. El paquete celular se resuspendió en 2 mL de solución de agua desionizada-glicerol 20% y se prepararon alícuotas de 100 µL en viales y se ultra-congelaron a -70°C hasta su uso. Previo a la electroporación, se descongelaron las bacterias electrocompetentes en hielo a 4°C por 30 min. Posteriormente, bajo condiciones de esterilidad, 100 ng de cada uno de los plásmidos (pENP, pAg30, pAg30-SCOT, pAg30-p28<sub>3</sub> y pAg30-p28<sub>3</sub>-SCOT) se emplearon para transformar a la bacteria electrocompetente en celdas Gene Pulser®/MicroPulser™ electroporation cuvettes (Bio-Rad®), usando el equipo electroporador Gene Pulser X cell total system (Bio-Rad). Las condiciones usadas fueron r=2500; c=0025; nr R= 0201: T= 0005. Inmediato al pulso eléctrico, 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. Las bacterias transformadas se sembraron en placas de BHI agar con 100 µg/mL de ampicilina y DHB (0.01%) (BHI-ampicilina-DHB), se incubaron a 37°C. Se aislaron colonias de cada una de las cepas recombinantes y se purificaron los plásmidos por lisis alcalina (Sambrook et al., 2001). La confirmación de clonas positivas para cada una de las construcciones se verificó mediante PCR usando los plásmidos pNIR y ShdA-R (PCR<sub>7</sub>, Tabla A1, ver apéndice). Las clonas recombinantes que resultaron positivas se criopreservaron en medio líquido BHI con 15% de glicerol, a -70°C para su posterior caracterización.

## II. Caracterización y análisis de la expresión de proteínas

**Cultivo, condiciones de inducción, curvas de crecimiento y preparación de cepas con fines de inmunización.** Las cepas de *Salmonella* transformadas con los diferentes plásmidos (pENP, pAg30, pAg30-SCOT, pAg30-p28<sub>3</sub>, pAg30-p28<sub>3</sub>-SCOT) se cultivaron a 37°C en medio sólido de BHI-ampicilina-DHB. Una vez que se aislaron colonias de cada una de las cepas, se procedió a inocularlas en medio líquido BHI-ampicilina-DHB. Los cultivos se incubaron a 37°C en agitación a 200 rpm en un agitador orbital (Environ Shaker Orbit, Lab Line) hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm ( $D_{600}$  nm) aproximada de 1.0. Posteriormente, un volumen de 100  $\mu$ L del cultivo de cada uno de ellos, se transfirió a matraces con 250 mL de medio líquido caldo tioglicolato-ampicilina-DHB (DIFCO® Laboratories, Detroit, MI) para favorecer el ambiente microaerófilico y de esta manera inducir el promotor *nirB*. Para realizar las curvas de crecimiento se tomaron de 1mL de cada uno de los cultivos de las cepas inducidas, cada 30 minutos hasta completar las 10 horas de cultivo. En cada toma se procedió a medir la  $D_{600}$  nm en un espectrofotómetro (Biometrix). Se incluyó a *S. enterica* serovar *Typhimurium* SL3261 sin transformar como control.

Para la preparación de las cepas de *Salmonella* transformada con los diferentes plásmidos con fines de inmunización; cultivos de 250 mL en condiciones de inducción se recuperaron durante la fase logarítmica de crecimiento, mediante centrifugación a 6000 x g, 10 minutos a 4°C y se lavaron dos veces con PBS estéril. Finalmente el paquete bacteriano se resuspendió en PBS (pH 7.4) y se prepararon alícuotas (dosis) de  $10^9$  bacterias en un volumen de 40  $\mu$ L.

**Extracción de proteínas totales de las cepas recombinantes de *Salmonella*.** Las cepas recombinantes de *Salmonella* transformadas con los diferentes plásmidos se cultivaron en condiciones inductoras a 37°C con agitación de 250 rpm hasta que alcanzaran la fase logarítmica de crecimiento. Se recuperó una alícuota de 1 mL ( $1 \times 10^6$  bacterias) se cosechó la pastilla bacteriana mediante centrifugación en una microcentrífuga (modelo ALC 4214) a 6000 x g a temperatura ambiente. El botón bacteriano se lavó cuatro veces con solución salina isotónica (SSI) estéril y después de descartar el sobrenadante, se resuspendió con 50mL de agua destilada y se adicionó 50  $\mu$ L de amortiguador de muestra (SDS 25%, Glicerol 25%, Tris-base 200mM, Azul de bromofenol 0.025%) para proteínas. Las muestras se desnaturalizaron por ebullición durante 10 minutos en baño María. Posteriormente, se dejaron enfriar, se pasaron por jeringa Hamilton a fin de homogenizar y se cuantificó la concentración de proteínas totales por el método de Bradford, usando el estuche comercial Bio-Rad Protein Assay™ (BioRad®).



**SDS-PAGE y Western-blot.** Las muestras de proteínas totales derivadas de cada una de las distintas cepas recombinantes de *Salmonella*, se ajustaron a una concentración de 30 µg/mL. Posteriormente, las proteínas se separaron mediante electroforesis vertical en dos geles de poliacrilamida al 12.5% de acuerdo al método de Laemmli (Laemmli UK., 1970) usando una cámara de electroforesis vertical BioRad® (modelo Mini-Protean 3 Cell). Se utilizó amortiguador 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. Para visualizar las proteínas separadas, uno de los geles se fijó por tres horas con solución acetona-metanol-agua (proporción 45:10:45) y se tiñó con colorante azul de Coomassie (Bio-Rad®) por 30 min y posteriormente se decoloró con solución ácido acético-metanol-agua (30:10:60). Finalmente el gel de poliacrilamida se secó en medio de una membrana (Gel drying Promega®) en un soporte de acrílico. Para detectar de manera específica las proteínas de fusión de interés (previamente separadas), a partir del gel de poliacrilamida, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa cargada positivamente (*Hybond-C Extra* (300mm x 3m, Amersham Bioscience, GE technologies®), usando buffer de transferencia (Tris base-Glicina, pH 8.3) en una cámara vertical de transferencia (BioRad® Mini Trans-Blot Cell 2005) a 150 V por una hora, a 4°C. Posteriormente, la membrana fue bloqueada con PBS-leche descremada al 5% toda la noche y se lavó dos veces con 10 mL de amortiguador salino de fosfatos (PBS) (pH 7.4, 137 mM NaCl), 2.7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) y se incubó durante toda la noche con 5mL del anticuerpo monoclonal anti-FLAG biotinilado (ANTI-FLAG BioM2, Sigma-Aldrich®) en dilución 1:250 en PBS con 0.02% de azida de sodio. Se realizaron cuatro lavados con solución PBS y posteriormente se incubó con estreptavidina conjugada a peroxidasa de rábano (HRP-Streptavidin conjugate (Zymed® Laboratories) en dilución 1:500. Las membranas se lavaron cuatro veces con PBS. Para detectar la expresión de la bandera FLAG fusionada a las proteínas de interés en extractos totales, la reacción se reveló 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 adicionando como sustrato 100 µL de peróxido de hidrógeno; durante 10-20 segundos. Al final la reacción se detuvo con agua destilada ó PBS. Todos los lavados se llevaron a cabo a temperatura ambiente por 10 minutos en un agitador orbital.

**Recuperación de proteínas de sobrenadantes de cultivos.** Las cepas recombinantes de *Salmonella* transformadas con los diferentes plásmidos se cultivaron en condiciones inductoras a 37°C con agitación de 250 rpm y hasta que alcanzaran la fase logarítmica de crecimiento. Posteriormente, se recuperó el sobrenadante de cada cultivo, mediante centrifugación a 8,000 x g durante 20 min a 4°C. El sobrenadante se filtró a través de una membrana de 0.22 µm. Las proteínas presentes en 100 mL de sobrenadante de cultivo, se precipitaron con 150 mL de solución saturada de ácido tricloroacético (TCA) suplementada

con 10% de acetona, incubando a 4°C durante una hora. La suspensión anterior se centrifugó a 8,000 x g durante una hora a 4°C y posteriormente se recuperó la pastilla y se lavó con 1 mL de acetona (pre-enfriada a 4°C). Se dejó evaporar la acetona y la pastilla se resuspendió en 200 µL de solución Tris-base (200 mM, pH 8.0) y se incubó a 45°C durante 10 min en baño seco *Thermomixer* Eppendorf®. Una vez lograda la completa disolución de las proteínas, se procedió a determinar la concentración de cada una de las muestras por el método de Bradford, usando el estuche comercial Bio-Rad Protein Assay™ (BioRad®) siguiendo las instrucciones del proveedor.

**Dot-blot para detección de proteínas en sobrenadantes.** 70 µg de proteína de cada una de las muestras se aplicaron por goteo a membranas de nitrocelulosa de 2 x 5 cm, *Hybond-C Extra* (300mm x 3m, Amersham Bioscience, GE technologies®). Se favoreció la unión de la proteína dejando secar la muestra con aire caliente. Se bloqueó la membrana con leche descremada (5%) disuelta en PBS-Tween 20 (0.05%), durante 1 hora a temperatura ambiente. Se realizaron cuatro lavados con solución PBS y se adicionó el anticuerpo primario monoclonal anti-FLAG conjugado a biotina (biotinylated M2 AntiFLAG®, Sigma) en dilución 1:250 en PBS-leche descremada al 5%. Se lavó dos veces la membrana con PBS-Tween 20 (0.05%), seguido de dos lavados con PBS y posteriormente se adicionó estreptavidina conjugada a peroxidasa de rábano (HRP-Streptavidin conjugate (Zymed® Laboratories) en dilución 1:500. Se lavó dos veces la membrana con PBS-Tween 20 (0.05%), seguido de dos lavados con PBS. Todos los lavados se llevaron a cabo a temperatura ambiente por 10 minutos. Para detectar la expresión de la bandera FLAG fusionada a las proteínas de interés en sobrenadantes recuperados, la reacción se reveló por quimioluminiscencia usando el estuche comercial Immun-Star HRP kit (Bio-Rad®) usando el sustrato de estuche comercial Pierce ECL Western Blotting Substrate (Thermo Scientific®) de acuerdo a las instrucciones del proveedor.

**Inmunofluorescencia indirecta (IFI) y citometría de flujo de las cepas vacunales de *Salmonella entérica* serovar Typhimurium SL3261.** Bajo condiciones de inducción, se cultivaron las distintas cepas de *Salmonella* hasta lograr una D.O<sub>600nm</sub> de 1.0. Una alícuota de 1 mL ajustada a 1X10<sup>6</sup> bacterias se cosecharon mediante centrifugación a 8000 x g y se lavaron tres veces con solución Amortiguadora Tris Salino (TBS) (20 mM Tris, 150 mM NaCl). El paquete celular se resuspendió en 60 µL de del anticuerpo monoclonal anti-FLAG biotinilado (ANTI-FLAG BioM2, Sigma-Aldrich®) en dilución 1:50 (en TBS) y se incubó durante 1 hora a 37°C con agitación constante. Posteriormente, la muestra se centrifugó a 6000 x g durante un minuto para retirar el anticuerpo primario. Se realizaron dos lavados con TBS, centrifugando a 6000 x g, 1 min en cada caso. El botón bacteriano, se resuspendió con 60 µL de estreptavidina acoplada a isotiocianato de fluoresceína (FITC-

streptavidine conjugate, Zymed<sup>®</sup>Laboratories) diluída 1:100 en PBS. Se incubó a 37°C con agitación de 250 rpm en un equipo Master mixer eppendorf<sup>®</sup> en la oscuridad. Se realizaron dos lavados con TBS, centrifugando a 6000 x g y un lavado final con PBS. El botón bacteriano se resuspendió en 500 µL de PBS, se realizaron frotis en portaobjetos y se analizaron en microscopio de fluorescencia Olympus BX40. Por otra parte, la expresión de la bandera FLAG fusionada a las proteínas de interés, se analizó con un equipo de Citometría de flujo Becton-Dickinson, utilizando el Software CELL QuestR.

El mismo análisis de citometría de flujo se realizó para evaluar la funcionalidad de la secuencia SCOT, una vez que las bacterias competentes de las cepas de *E. coli* BL21-DE3 (OmpT proteasa negativa) y XL-10 Gold (OmpT proteasa positiva) se transformaron con los plásmidos pAg30-SCOT y pAg30-p28<sub>3</sub>-SCOT, se cultivaron en condiciones inductoras.

### III. Mantenimiento del ciclo de vida de *T. spiralis*

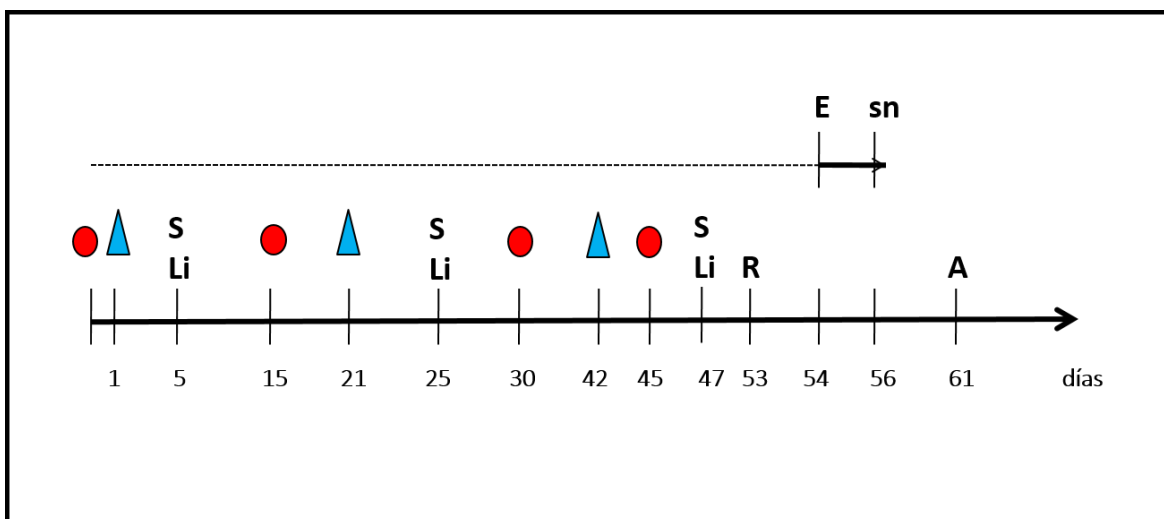
**Preservación del ciclo de vida de *T. spiralis*.** Parásitos de *T. spiralis* cepa MSUS/MEX/91/CM-91 se mantuvieron experimentalmente en rata macho de la cepa *Sprague-Dawley*. Los animales se mantuvieron bajo condiciones estándar de bioterio (25°C, 12 horas de luz, alternados con 12 horas de oscuridad y alimentación *ad libitum*). Las ratas se infectaron por vía oral con 3,000 LM y al completar su ciclo de vida las LM se recuperaron mediante la técnica descrita por Dennis (1970) con algunas modificaciones. Las ratas infectadas se sacrificaron al día 21 p.i., retirando en su totalidad piel, cabeza, cola, vísceras, extremidades y dejando únicamente el músculo esquelético y diafragma. El músculo esquelético se cortó en pequeños pedazos, los cuales se sometieron a digestión artificial durante tres horas a 37°C, con solución de pepsina al 1% (p/v) suplementada con HCl 1% (p/v) en agua destilada. Para purificar las LM, se pasó el producto de digestión a través de un aparato de Bearman modificado con una gasa estéril como tamiz. Las LM se dejaron sedimentar durante 20 min y se lavaron tres veces con solución PBS (pH 7.4), eliminando la mayor cantidad de restos de tejido muscular. Las larvas se recuperaron y se diluyeron 1:10 en solución de PBS 1X. Finalmente, se determinó el número de LM presentes en 5µL de la suspensión anterior en un microscopio óptico a 10x. Este proceso se repitió 5 veces y se obtuvo el promedio de todas las determinaciones.

#### IV. Animales.

Ratones machos de la cepa BALB/c (haplotipo MHC H2d) (inbred), de 4-6 semanas de edad, de 20-25 g de peso y libres de gérmenes (Charles River Laboratories, Inc.), se usaron en el esquema de inmunización del presente trabajo. Los animales se mantuvieron bajo condiciones estándar de bioterio (25°C, 12 horas de luz, alternados con 12 horas de oscuridad y alimentación *ad libitum*). Todo el manejo de los animales experimentales se llevó a cabo de acuerdo a la NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, *Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio*; (publicada y actualizada en 2009).

#### V. Esquema de inmunización con las cepas vacunales de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, colecta de suero y lavados intestinales.

**Esquema de inmunización y desafío con el parásito.** El esquema de inmunización se resume en la figura 9. Brevemente, grupos de 17 ratones machos BALB/c, se inmunizaron por vía intranasal con  $10^9$  UFC de cada una de las cepas recombinantes de *Salmonella* cultivada en condiciones de inducción. Se incluyó un grupo control, el cual solo recibió tratamiento con PBS. Se realizaron tres inmunizaciones a los días 0, 21 y 42 del esquema de inmunización. Durante los primeros 5 días posteriores a cada inmunización, los animales recibieron ampicilina (0.6 mg/mL) suministrado en el agua de beber.



**Figura 9. Esquema de inmunización.** Sangría (●), inmunización (▲), esplenectomía (S), obtención de lavado Intestinal (Li), obtención de parásitos adultos (A), Reto (R), ensayos de estimulación (E), recuperación de sobrenadantes (sn).

**Ensayos de persistencia *in vivo* post-vacunación y estabilidad del plásmido.** La estabilidad de cada uno de los plásmidos de las cepas recombinantes de *Salmonella*, se determinó mediante la técnica descrita por Kramer y cols., (2003) con algunas modificaciones. Cinco días después de cada inmunización, 2 ratones de cada grupo de inmunización fueron sacrificados por dislocación cervical y esplenectomizados en condiciones de esterilidad. El bazo se homogenizó en 1mL de solución de lisis (PBS 1X, pH 7.4, 0.5% (p/v) de albúmina sérica bovina y tergitol tipo NP-40 0.5% (p/v)). Se procedió a sembrar en placas con medio de cultivo sólido BHI suplementadas con DHB 0.01% con y sin ampicilina (100 µg/mL). La persistencia *in vivo* post-vacunación de las distintas cepas de *Salmonella* se determinó por el número de bacterias viables ó UFC presentes. Posteriormente se tomó una colonia de cada una de las cepas recombinantes para la extracción de plásmido por el método de lisis alcalina (Sambrook et al., 2001). La caracterización de los plásmidos se realizó mediante PCR, usando los oligonucleótidos FLAG-SEQ-1 y ShdA-Rv (PCR<sub>7</sub>, Tabla A1, ver apéndice).

**Sangría y obtención de sueros.** Se colectaron 50 µL de sangre del plexo retro-orbital de todos los animales a los días 0, 15, 30 y 45 (Fig. 9). La sangre se colectó con capilares heparinizados y el suero se obtuvo centrifugando las muestras a 1500 x g y se almacenó en microtubos de 500 µL a -80°C. Se obtuvo suero preinmune antes de iniciar el esquema de inmunización.

**Lavados intestinales.** Cinco días después de cada inmunización (días 5, 25 y 47) (Fig. 9), se sacrificaron 2 animales por grupo de inmunización y se recuperó el lavado intestinal de acuerdo a la técnica descrita por Ben-Smith y cols. (1999) con algunas modificaciones. Brevemente, dos ratones de cada uno de los grupos de inmunización se sacrificaron por dislocación cervical y bajo condiciones asépticas, el intestino delgado se retiró. Los fluidos intestinales se removieron con ayuda de una jeringa insulínica, aplicando gentilmente en la luz intestinal 5 mL de una solución que contenía PBS suplementada con los inhibidores de proteasa N- $\alpha$ -tosil-L-lisina clorhidrato de cloro-metil cetona (TLCK, por sus siglas en inglés)(Sigma-Aldrich®)(50 µg/ml) diluído en etanol y L-1-tosilamida-2-fenil etil clorometil cetona (TPCK, por sus siglas en inglés) (Sigma-Aldrich®)(174µg/ml) diluído en agua. Una vez recolectados los lavados intestinales en tubos estériles de 15 mL de polipropileno, se procedió a centrifugar las muestras a 650 x g durante 10 min a 4°C y a clarificarlas con una centrifugación adicional de 27 000 x g durante 10 min a 4°C. Se adicionó azida de sodio para tener una concentración final de 1%. Las muestras se ultracongelaron a -70°C hasta la determinación de anticuerpos.

**Preparación de suspensiones celulares de esplenocitos y de Placas de Peyer (PP).** Dos ratones por grupo (inmunizados pero no desafiados con el parásito) fueron sacrificados por dislocación cervical al día 54 del esquema de inmunización. Bajo condiciones asépticas, la zona abdominal se limpió con etanol al 70% y se procedió a realizar una incisión longitudinal en esta región. Una vez abierta la cavidad peritoneal, se hizo una esplenectomía y también se obtuvieron las placas de Peyer (PP) en condiciones de esterilidad, de acuerdo a las recomendaciones de Van den Broeck y cols., (2006) y el método descrito por Chichester y cols. (2006). En el caso del bazo, este se colocó en un tamiz ó malla de acero inoxidable estéril, el cual se colocó dentro de una caja Petri con 1 mL de PBS (pH 7.4). Se homogenizó el bazo con ayuda del émbolo de una jeringa de 10 mL de manera suave con movimientos circulares hasta disgregar por completo el tejido y obtener una suspensión de eritrocitos y esplenocitos, la cual se transfirió a un tubo de polipropileno de 15 mL estéril. Se lisaron los eritrocitos incubando la suspensión anterior con tres mL de solución de lisis ACK ( $\text{NH}_4\text{Cl}$  0.15M,  $\text{KHCO}_3$   $\text{NaHCO}_3$  10mM y  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  0.12 mM) durante tres a cinco minutos a 4°C. Los esplenocitos se cosecharon centrifugando a 600 x g durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante se descartó y los esplenocitos se lavaron con dos mL de medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640, GIBCO-Invitrogen). En el caso de las células derivadas de PP y de MLN, estos órganos se colocaron en microtubos con 1 mL de medio RPMI 1640 y se disgregaron usando un homogeneizador de tejidos de polipropileno (pellet pestle, disposable blue Sigma-Aldrich®) para preparar las suspensiones celulares. Posteriormente las células de PP y de MNL se cosecharon mediante centrifugación a 600 x g durante 10 minutos a 4°C y se lavaron dos veces con medio RPMI 1640. En todos los casos, una alícuota se empleó para realizar el conteo de células viales con azul de tripano y de esta manera ajustar la suspensión celular a  $1 \times 10^6$  células en 50  $\mu\text{L}$  de medio RPMI.

## **VI. Desafío de los animales inmunizados y determinación de la protección**

Diez días después de la última inmunización (día 53 del esquema de inmunización) se procedió a infectar a 10 animales de cada grupo de inmunización con una carga parasitaria de 300 LM por vía intragástrica. Los animales a los que se les administró PBS fueron infectados con el parásito y se incluyeron como grupo control de infección.

**Recuperación de parásitos adultos.** Para evaluar la protección a nivel local (intestinal), los parásitos adultos fueron recuperados al octavo día p.i. (McGuire et al., 2002) (día 61 del esquema de inmunización), de acuerdo al procedimiento descrito previamente (Pompa-Mera et al., 2011). Brevemente, 24 horas antes de la obtención de larvas adultas, se retiró por completo el alimento a los animales y estos se sacrificaron por dislocación cervical.

Posteriormente, la zona abdominal se limpió con etanol al 70% y se procedió a realizar una incisión longitudinal en esta región, cuidadosamente se extrajeron los intestinos, se separó el intestino delgado y se cortó longitudinalmente. Finalmente el contenido intestinal se recuperó en una caja petri que contenía 5 mL de solución 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 tres horas. Al término de este periodo, los parásitos adultos sedimentados en el tubo de ensayo, se lavaron con PBS y se procedió a realizar una cuenta total bajo microscopio óptico con objetivo de 10X. La protección a nivel intestinal se expresó como porcentaje de la reducción de la carga parasitaria respecto al control de infección.

## VII. Evaluación de la respuesta inmune humoral y celular.

**Preparación del extracto total de LM de *T. spiralis*.** La obtención de extracto total (ET) del parásito (CHA, *por sus siglas en inglés*) se realizó siguiendo el método de Parkhouse y cols. (1981). Brevemente, 1 mL de LM de *T. spiralis* se resuspendió en 1mL de solución amortiguadora de Trisma-base 10 mM, pH 8.3 (Sigma-Aldrich®) conteniendo los inhibidores de proteasas TLCK (Sigma-Aldrich®) (50 µg/ml) diluído en etanol, TPCK (Sigma-Aldrich®) (174µg/ml) diluído en agua y fenil metil sulfonil fluoruro (PMSF) 25 µg/mL diluído en isopropanol. Los parásitos se homogenizaron durante 20 minutos a 4°C con un homogenizador manual (Potter Wheaton, USA). Posteriormente, se adicionó deoxicolato de sodio (DOC) a una concentración final del 2% (Sigma-Aldrich®) y homogenizando los parásitos durante 20 minutos y la mezcla se dejó reposar durante 20 minutos a 4°C. Nuevamente los parásitos se homogenizaron durante 20 minutos más y se centrifugó a 600 x g durante 30min a 4°C. El ET se preservó a -20°C y se cuantificó la concentración de proteínas por el método de Bradford, hasta el momento de su uso en los ensayos inmunoenzimáticos para la detección de anticuerpos. Durante la cuantificación de proteínas se incluyó una solución estándar de albúmina sérica bovina con 20% de DOC. Un procedimiento similar se realizó para la extracción de ET empleado en los ensayos de estimulación *in vitro* de esplenocitos y células derivadas de placas de Peyer, sin incluir inhibidores de proteasa ni DOC.

**Determinación de anticuerpos de las clases IgG e IgG1 antígeno-específicos, mediante ensayo inmunoenzimático (ELISA).** Se sensibilizaron placas de 96 pozos (NUNC 475094) con 20 µg/mL de ET de *T. spiralis* en amortiguador de carbonatos (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> mM, NaHCO<sub>3</sub>, pH 9.0). Se incubó la placa a 4°C toda la noche con agitación constante. Al día siguiente se eliminó el exceso de antígeno por inversión de la placa y se bloqueó con 200 µL de solución

PBS-BSA (3%)-Tween 20 (0.05%) y se incubó a a 4°C. Posteriormente se eliminó el exceso de bloqueador mediante tres lavados con PBS-Tween 20 (0.05%). Se adicionaron por duplicado los sueros a evaluar en PBS-BSA (3%)-Tween 20 (0.05%) en diluciones seriadas 1:10, 1:100, 1:500, 1:1000, 1:2000, 1:4000 y 1:8000. Se incubó la placa 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, usando las diluciones indicadas anteriormente. Al día siguiente, se realizaron cuatro lavados con PBS-Tween 20 (0.05%) y se adicionó un anticuerpo secundario anti-IgG (H+L) ó anti-IgG1 de ratón acoplado a peroxidasa de rábano (HRP) (Zymed® Laboratories) en dilución 1:1000 en PBS-BSA (3%)-Tween 20 (0.05%) y se incubó una hora a 37°C con agitación constante. Se realizaron tres lavados de cinco minutos c/u. La reacción se reveló usando un estuche comercial de reactivo 3,3', 5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) (R&D Systems®), de acuerdo a las especificaciones del proveedor; posteriormente la reacción se detuvo con 50 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2N) y se registraron las lecturas a 450 nm usando un filtro de referencia a 540 nm en un lector de ELISA (Modelo Multiscan Ascent).

**Determinación de anticuerpos de la clase IgA antígeno-específicos, presentes en lavados intestinales, mediante ensayo inmunoenzimático (ELISA).** Se sensibilizaron placas de 96 pozos (NUNC 475094) con 20 µg/mL de ET de *T. spiralis* en amortiguador de carbonatos (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> mM, NaHCO<sub>3</sub>, pH 9.0). Se incubó la placa a 4°C toda la noche con agitación constante. Al día siguiente se eliminó el exceso de antígeno por inversión de la placa y se bloqueó con 200 µL de solución PBS-BSA (3%)-Tween 20 (0.05%) y se incubó a 4°C. Posteriormente se eliminó el exceso de bloqueador mediante tres lavados con PBS-Tween 20 (0.05%). Se adicionaron por duplicado los lavados intestinales recuperados y sin diluir a los días 5, 25 y 47. Se incubó la placa 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 lavado intestinal de un animal no inmunizado, usando las diluciones indicadas anteriormente. Al día siguiente, se realizaron cuatro lavados con PBS-Tween 20 (0.05%) y se adicionó un anticuerpo secundario anti-IgA de ratón conjugado a peroxidasa de rábano (HRP) (ABD Serotec, Oxford UK) en dilución 1:1000 en PBS-BSA (3%)-Tween 20 (0.05%) y se incubó una hora a 37°C con agitación constante. Se realizaron tres lavados de cinco minutos c/u. La reacción se reveló usando un estuche comercial de reactivo 3,3', 5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) (R&D Systems®), de acuerdo a las especificaciones del proveedor; posteriormente la reacción se detuvo con 50 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2N) y se registraron las lecturas a 450 nm usando un filtro de referencia a 540 nm en un lector de ELISA (ELx808 Ultra Microplate Reader, Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, USA).



**Reconocimiento de la p43 nativa de *T. spiralis* por IgA presente en lavados intestinales de los animales vacunados mediante inmunofluorescencia indirecta.** LM de *T. spiralis* se fijaron en solución de PBS con 10% de formaldehído (JT Baker®) y posteriormente se realizaron dos lavados con PBS-Tween 20, 0.1% y dos lavados con PBS, centrifugando a 200 x g a temperatura ambiente por cinco minutos. Las LM se incubaron con los lavados intestinales recolectados de los días 5, 25 y 47 del esquema de inmunización a una dilución 1:10 en PBS, durante dos horas a 37°C. Se realizaron lavados como se indicó anteriormente y las LM se incubaron durante 90 minutos a 37°C con anticuerpo secundario anti-mouse IgA-FITC (Cat Number M31101, Invitrogen, CA USA) en dilución 1:1000 y al término, se realizaron cinco lavados con PBS. Finalmente las LM se colocaron en portaobjetos y se analizaron usando un microscopio de fluorescencia BX-40; Olympus.

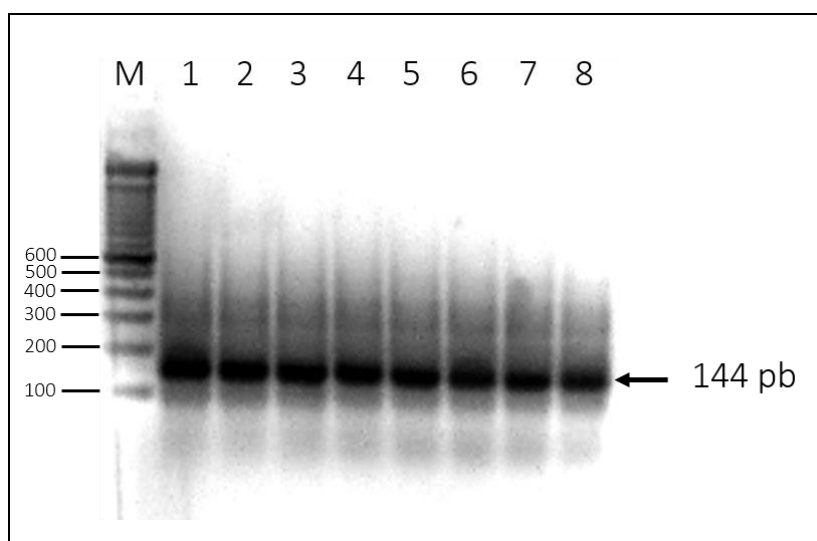
**Ensayos de estimulación *in vitro* y cuantificación de citocinas IFN- $\gamma$  e IL-5.** Los ensayos de cultivo celular y de estimulación *in vitro* para la secreción de citocinas se realizaron de acuerdo a lo descrito por Grecis y cols., (1991), McGuire y cols., (2002), Dea-Ayuela y cols., (2006). Brevemente, para el cultivo de esplenocitos y células derivadas de placas de Peyer se emplearon placas de 96 pozos con fondo plano (Nunc-Immuno MaxiSorp). Se cultivaron  $1 \times 10^6$  células/pozo en 100 $\mu$ L de medio RPMI-1640 suplementado con 10% de SFB (Invitrogen®), L-glutamina 2mM (GIBCO), 100 U/mL de penicilina G sódica, 0.25  $\mu$ g de anfotericina B y 100  $\mu$ g/mL de sulfato de estreptomina (GIBCO) y 1mM de HEPES y se estimularon *in vitro* con 50  $\mu$ g de ET (sin inhibidores de proteasa) de *T. spiralis*. Las células se incubaron a 37°C, 5 % de CO<sub>2</sub> durante 48 horas. Los sobrenadantes se recolectaron y se congelaron a -80°C hasta la cuantificación de citocinas. Se incluyó un control de células no estimuladas.

Las citocinas IFN- $\gamma$  e IL-5 se cuantificaron por triplicado en sobrenadantes de los cultivos celulares y utilizando los estuches comerciales Quantikine® mouse IFN- $\gamma$  Immunoassay (R&D System, no. de catálogo MIF00) y Quantikine® mouse IL-5 Immunoassay (R&D System, no. de catálogo M5000), siguiendo las instrucciones del proveedor. La sensibilidad de los ensayos fueron <2pg/mL para IFN- $\gamma$  y <7pg/mL para IL-5.

**Análisis estadístico.** Para determinar las diferencias significativas de la respuesta inmune inducida por los grupos de ratones inmunizados con las diferentes cepas recombinantes de *Salmonella*, se realizó análisis de varianza ANOVA Kruskal-Wallis no paramétrica (con corrección de Bonferroni). Comparaciones múltiples *post-hoc* se realizaron usando prueba estadística de U de Mann-Whitney y de Tukey usando el programa Prism 4 (Windows®). Una  $P < 0.05$  se consideró estadísticamente como significativa.

## RESULTADOS

**Construcción del templado que codifica para el adyuvante P28.** Para la generación de una copia sencilla del fragmento codificante del dominio mínimo de unión al C3d (p28) se realizó una PCR con gradiente de temperaturas usando los oligonucleótidos p28-1 y p28-2. Dado que la temperatura de alineamiento ( $T_m$ ) de cada uno de los oligonucleótidos superó los  $65^\circ\text{C}$ , se incluyó un gradiente de temperaturas durante la etapa de alineamiento. La figura 10 muestra el análisis electroforético de los productos obtenidos que corresponde a la obtención del templado p28 y cuyo tamaño correspondió al esperado de 144 pb.



**Figura 10. Análisis electroforético en agarosa al 1.5% del templado p28.** El producto se generó mediante PCR de punto final con gradiente de temperaturas. M) Marcador de 100 pb (Invitrogen®); 1)  $65.9^\circ\text{C}$ , 2)  $66.2^\circ\text{C}$ , 3)  $67.2^\circ\text{C}$ , 4)  $68.7^\circ\text{C}$ , 5)  $70.5^\circ\text{C}$ , 6)  $72.6^\circ\text{C}$ , 7)  $74.8^\circ\text{C}$  y 8)  $77^\circ\text{C}$ . El producto corresponde a la banda indicada por la flecha con un tamaño de 144 pb.

Posteriormente, este producto se empleó como templado para realizar las siguientes reacciones ( $\text{PCR}_2$ ,  $\text{PCR}_3$  y  $\text{PCR}_4$ , ver apéndice), obteniéndose bandas cuyo tamaño aproximado fue de 144 pb, las cuales difieren entre sí en los sitios de restricción. Los productos se separaron por electroforesis al 1.5%, se purificaron y se cortaron con las enzimas indicadas de acuerdo a su diseño. La figura 11 muestra el análisis electroforético en geles de agarosa al 1.5% de la banda purificada de la copia p28<sub>A</sub>, posterior al corte con las enzimas HindIII y XhoI. Resultados similares se obtuvieron con las copias de p28<sub>B</sub> y P28<sub>C</sub> (datos no mostrados).

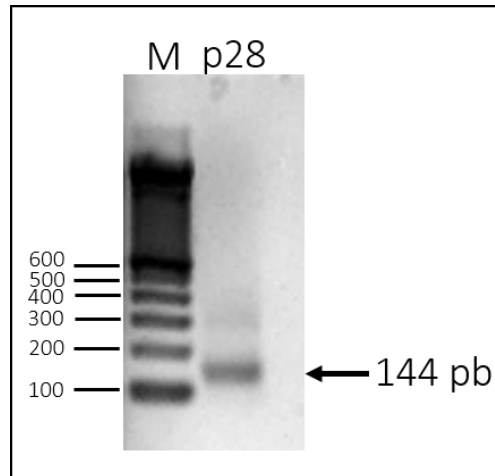


Figura 11. Análisis electroforético en agarosa al 1.5% de la copia p28<sub>A</sub> cortado con las enzimas XhoI y HindIII. El producto corresponde a la banda indicada por la flecha con un tamaño aproximado de 144 pb.

**Construcción de los plásmidos intermediarios con el vector de tránsito pRL-null.** Una vez obtenidas cada una de las copias correspondientes a p28<sub>A</sub>, p28<sub>B</sub> y p28<sub>C</sub>, estas se subclonaron en el vector de tránsito pRL-null (Promega®) con los sitios de restricción XhoI, HindIII, NdeI y SpeI, para dar finalmente tres repetidos de p28 clonados en pRL-null (pRL-null-p28<sub>3</sub>). Posterior a cada ligación, las bacterias competentes de la cepa *E. coli* DH5α se transformaron con cada uno de los plásmidos y se seleccionaron clones positivos de acuerdo a su patrón electroforético e incremento de tamaño. La figura 12A muestra el análisis electroforético de los plásmidos intermediarios: pRL-null-p28<sub>1</sub>, pRL-null-p28<sub>2</sub> y pRL-null-p28<sub>3</sub>, los cuales se cortaron con la enzima de restricción BamH1 para determinar su tamaño molecular, el cual correspondió a 3464, 3608 y 3752 pb, respectivamente (Fig. 12B).

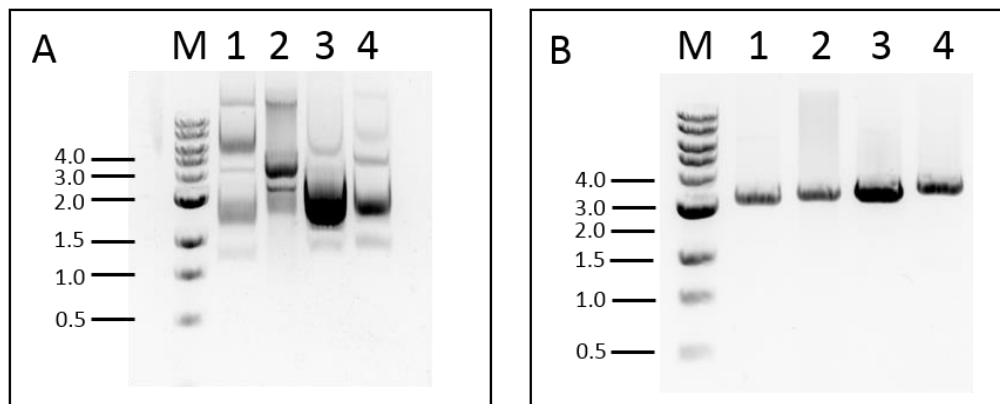
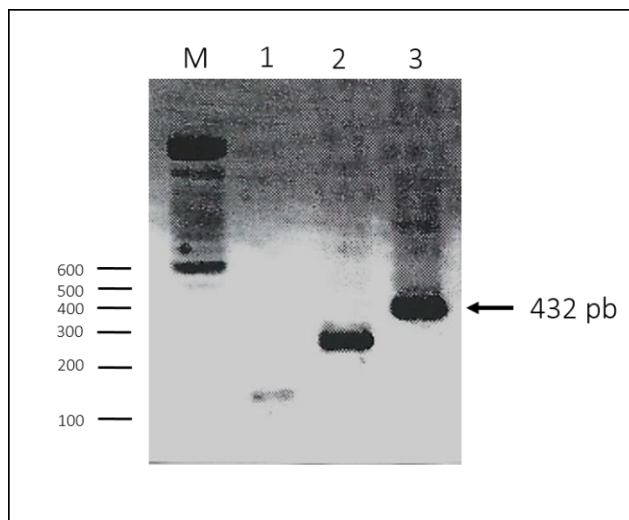


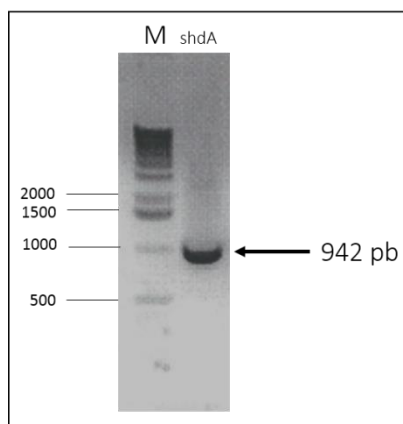
Figura 12. Análisis electroforético en agarosa al 1% de los plásmidos derivados de pRL-null que contienen hasta tres copias del fragmento p28. (A) Plásmidos no linearizados y (B) Plásmidos cortados con la enzima BamH1. M) Marcador de 1 kB (NEB®), 1) pRL-null (control), 2) pRL-null-p28<sub>1</sub>, 3) pRL-null-p28<sub>2</sub> y 4) pRL-null-p28<sub>3</sub>.

Una vez caracterizados todos los vectores de tránsito se usó el plásmido pRL-null-p28<sub>3</sub> como templado para obtener mediante PCR el fragmento correspondiente a las tres copias en tándem de p28 (p28<sub>3</sub>) y cuyo tamaño aproximado corresponde a 432 pb (Fig. 13). Este fragmento se cortó con las enzimas XbaI y BamHI y se purificó para insertarlo en el vector pAg30 (también previamente cortado con las mismas enzimas).



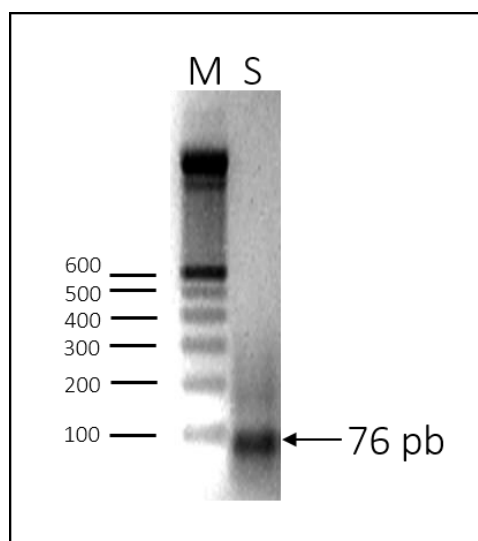
**Figura 13. Análisis electroforético en agarosa al 1.5% de las múltiples copias en tándem clonadas en el vector de tránsito pRL-null.** Los productos se obtuvieron mediante PCR usando los oligonucleótidos Null-SEQ-1 y Null-CDS-2 y a partir de las diferentes versiones de los plásmidos pRL-null. M) Marcador, 1) fragmento p28<sub>1</sub>, 2) fragmento p28<sub>2</sub> y 3) fragmento p28<sub>3</sub>.

Dado que la estrategia general de clonación (Fig. 8) genera la pérdida del fragmento correspondiente al gen *shdA* (942 pb), el cual posteriormente se purificó (Fig. 14), se reservó y se usó más adelante para generar los plásmidos pAg30-p28<sub>3</sub>, pAg30-SCOT y pAg30-p28<sub>3</sub>-SCOT.



**Figura 14. Análisis electroforético en agarosa al 1% correspondiente al fragmento de *shdA* (942 pb).** M) Marcador de 1kb (NEB®).

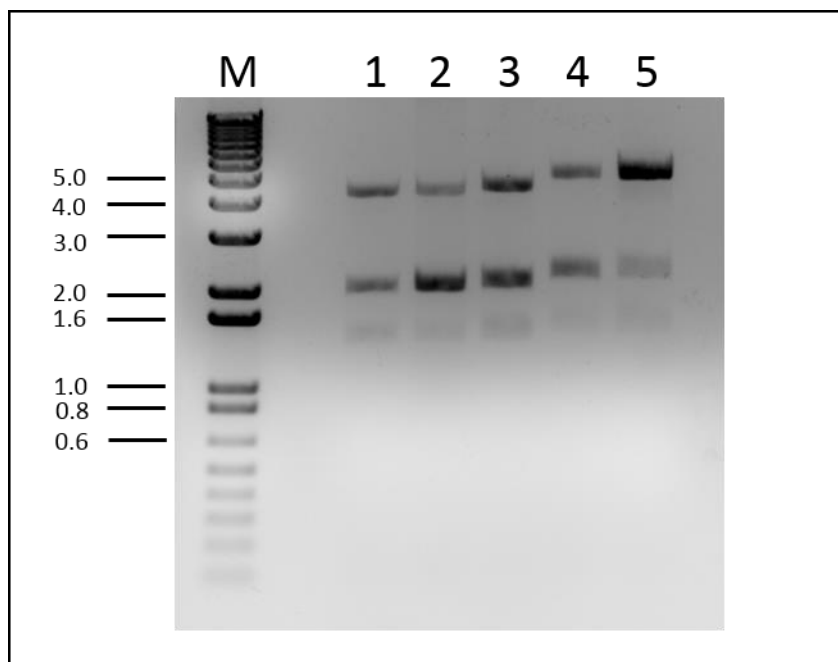
**Construcción de la secuencia SCOT.** Con el propósito de construir un plásmido que permitiera la expresión y secreción del antígeno Ag30 hacia el medio extracelular; se consideró la clonación de la secuencia SCOT, la cual codifica para un sitio corte para la Omp T proteasa de *E. coli* (Hanke et al., 1992; Ruiz-Olvera et al., 2002). Para ello, se llevó a cabo una reacción de acoplamiento, la cual resultó en un producto de DNA, cuyo tamaño corresponde a 76 pb (Fig. 15). Posteriormente el producto SCOT se cortó con las enzimas XbaI y BamHI y se clonó entre las secuencias que codifican para el antígeno Ag30 y el dominio  $\beta$  del autotransportador ShdA ó entre el antígeno Ag30 y los 3 repetidos del adyuvante. Cabe mencionar que la secuencia peptídica para la cual codifica, contiene tres sitios de corte Lisina-Arginina (K-R). La figura 15 muestra el análisis electroforético correspondiente a la secuencia SCOT.



**Figura 15.** Análisis electroforético en agarosa al 1.5% de la secuencia que codifica para el sitio de corte de la OmpT proteasa (SCOT). M) Marcador de 100 pb (Invitrogen®), S) producto de acoplamiento SCOT de 76 pb.

**Construcción de los plásmidos pAg30-SCOT, pAg30-p28<sub>3</sub> y pAg30-p28<sub>3</sub>-SCOT.** Una vez que el plásmido pAg30 se cortó con las enzimas de restricción NheI y BamHI, este se ligó con el producto de acoplamiento SCOT (Fig. 15). Esta reacción ocasiona la desinserción del gen shda, por lo que posteriormente ésta (Fig. 14) se reinsertó al plásmido, generando así, el plásmido pAg30-SCOT (3587 pb). De manera similar y paralela, el plásmido pAg30 cortado con las enzimas NheI y BamHI, se ligó con el inserto p28<sub>3</sub>/XbaI-BamHI (Fig. 13, carril 3) y con el inserto shda (Fig. 14), resultando en el plásmido pAg30-p28<sub>3</sub> (3943pb). Por último el plásmido pAg30-p28<sub>3</sub>-SCOT, se generó a partir de la doble digestión del plásmido pAg30-p28<sub>3</sub> con las enzimas NheI y BamHI y la ligación con el producto de acoplamiento SCOT (Fig. 15) y finalmente con el fragmento shdA (Fig. 14). La figura 16 muestra el análisis

electroforético de los plásmidos generados en este trabajo. Por otra parte, se realizó un análisis de restricción con la enzima BamHI con el propósito de verificar el tamaño de cada uno de los plásmidos. En este análisis fue posible apreciar el tamaño esperado de cada uno de los plásmidos pAg30-SCOT (3587 pb), pAg30-p28<sub>3</sub> (3943pb) y pAg30-p28<sub>3</sub>-SCOT (4019 pb) (Fig. 17). Los plásmidos pENP (3415 pb) y pAg30 (3511 pb) se usaron como controles para este análisis.



**Figura 16. Análisis electroforético en agarosa al 0.9%, de los plásmidos.** M) Marcador de 1 Kb (Plus DNA Invitrogen®), plásmidos 1) pENP, 2) pAg30, 3) pAg30-SCOT, 4) pAg30-p28<sub>3</sub>, 5) pAg30-p28<sub>3</sub>-SCOT.

Adicionalmente, los plásmidos fueron verificados mediante secuenciación nucleotídica automatizada. En las figuras 18, 19 y 20 se muestran las secuencias nucleotídicas de DNA y los mapas correspondientes a los plásmidos pAg30-SCOT, pAg30-p28<sub>3</sub> y pAg30-p28<sub>3</sub>-SCOT, respectivamente. Cabe mencionar que en todos los casos, se secuenciaron ambas cadenas (sentido y antisentido) y solo se muestra una de las dos secuencias para cada caso. De manera colectiva, estos resultados confirman la correcta clonación de cada uno de los insertos de interés.

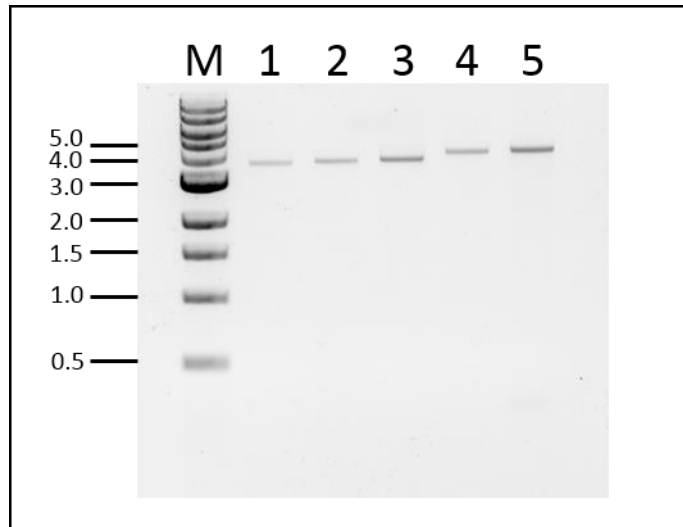
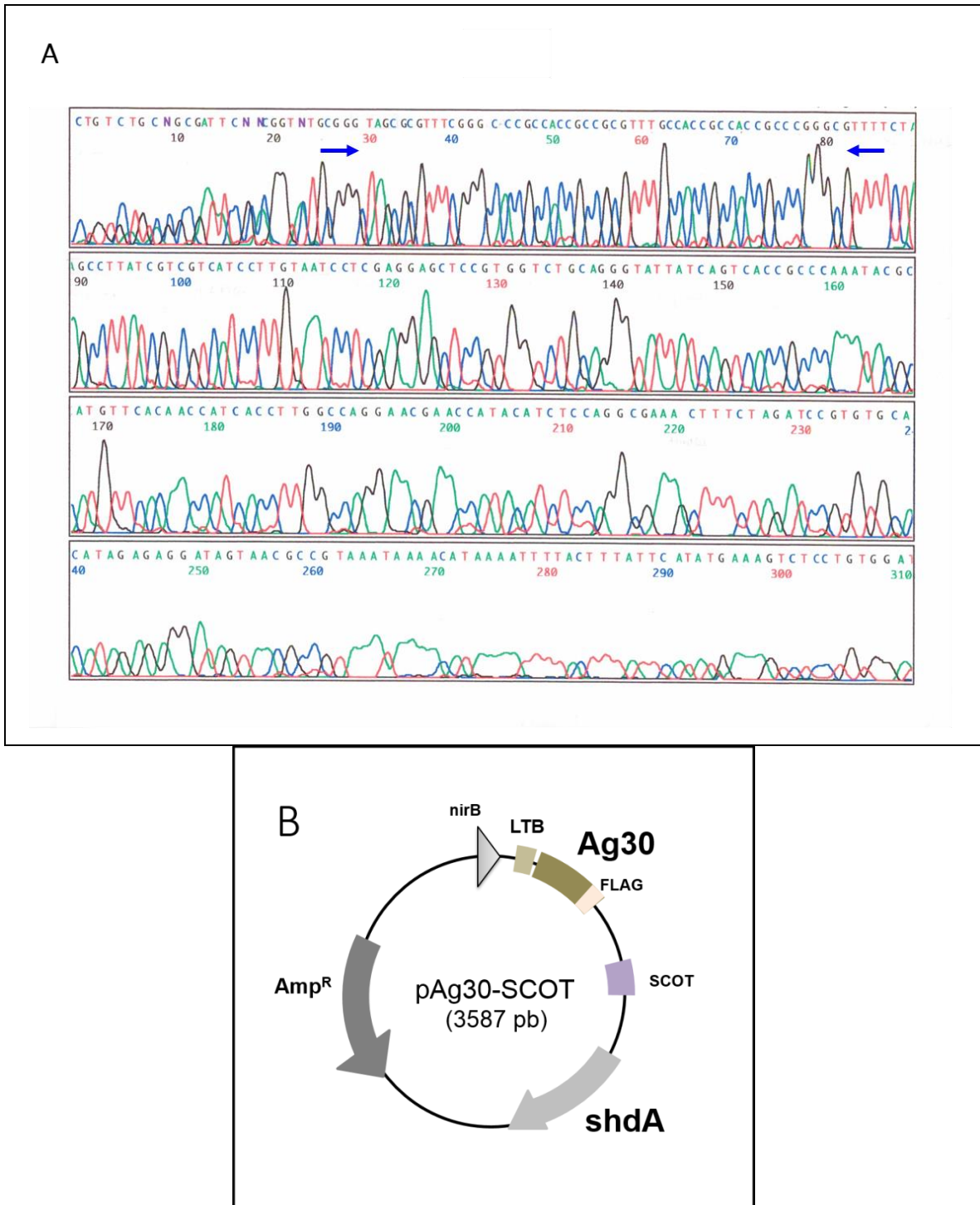


Figura 17. Análisis electroforético en agarosa al 1.0%, de los plásmidos cortados con la enzima BamHI. M) Marcador de 1 Kb (NEB®), plásmidos cortados con BamHI: 1) pENP, 2) pAg30, 3) pAg30-SCOT, 4) pAg30-p28<sub>3</sub>, 5) pAg30-p28<sub>3</sub>-SCOT.



**Figura 18. Análisis del plásmido pAg30-SCOT.** A) Secuencia nucleotídica de la cadena de DNA antisentido del plásmido pAg30-SCOT. El inicio y término de la secuencia que codifica para el sitio de reconocimiento de la OmpT proteasa (SCOT) es indicada por las flechas azules. B) Mapa representativo del plásmido pAg30-SCOT.



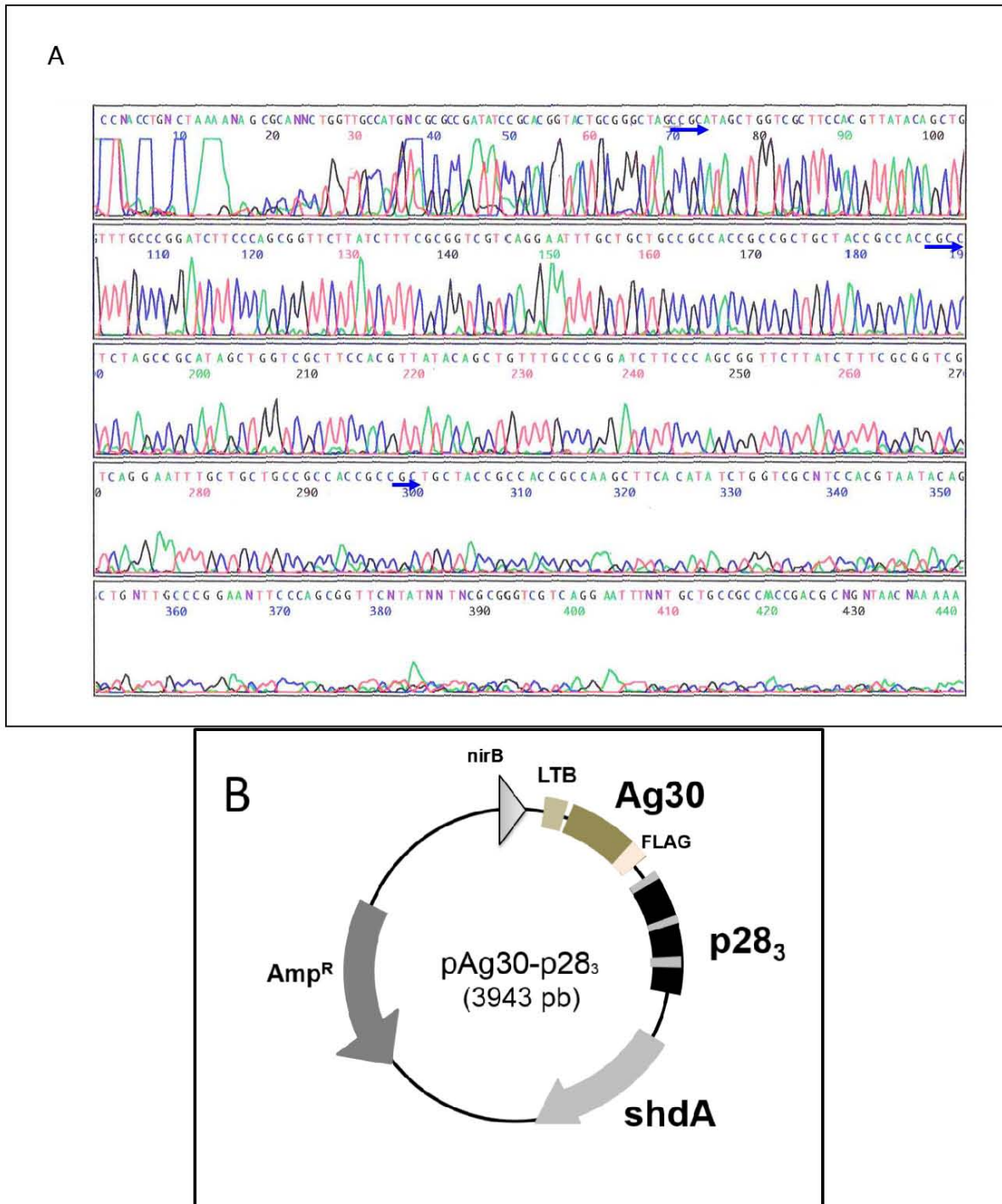


Figura 19. Análisis del plásmido pAg30-p28<sub>3</sub>. A) Secuencia nucleotídica de la cadena de DNA sentido del plásmido pAg30-p28<sub>3</sub>, indicando el inicio de cada una de las copias que codifica para el adyuvante P28 con las flechas azules. B) Mapa representativo del plásmido pAg30-p28<sub>3</sub>.

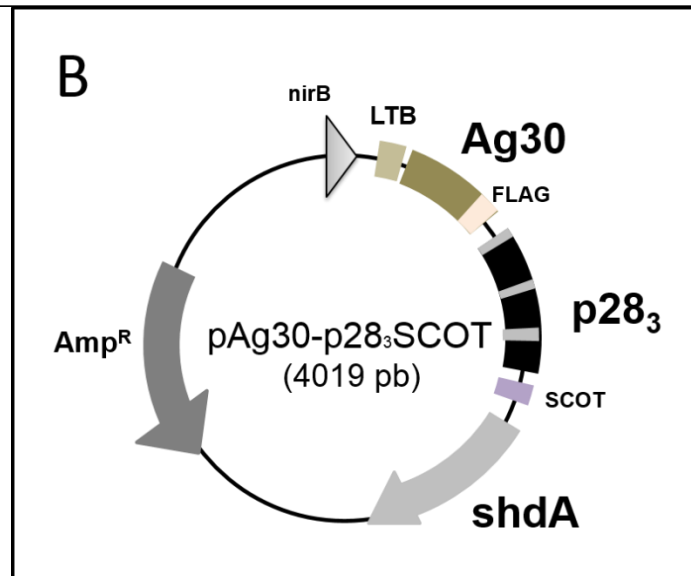
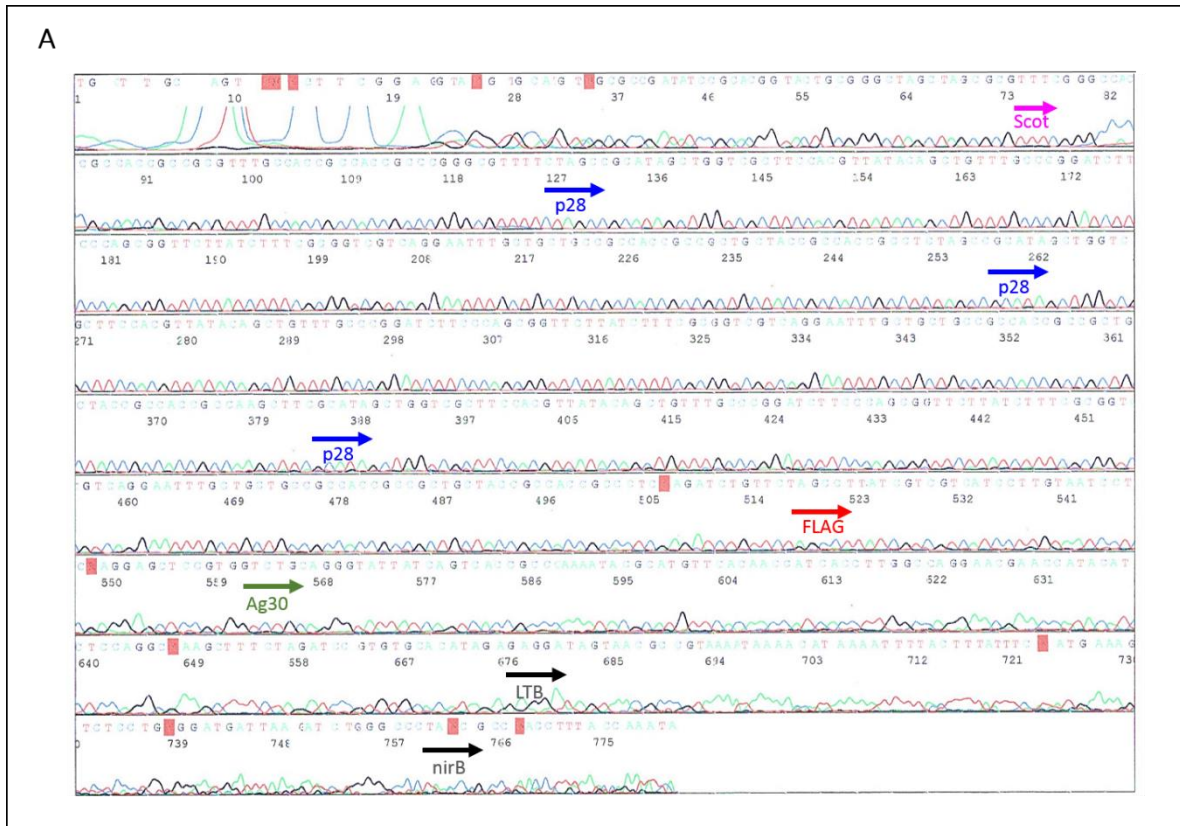


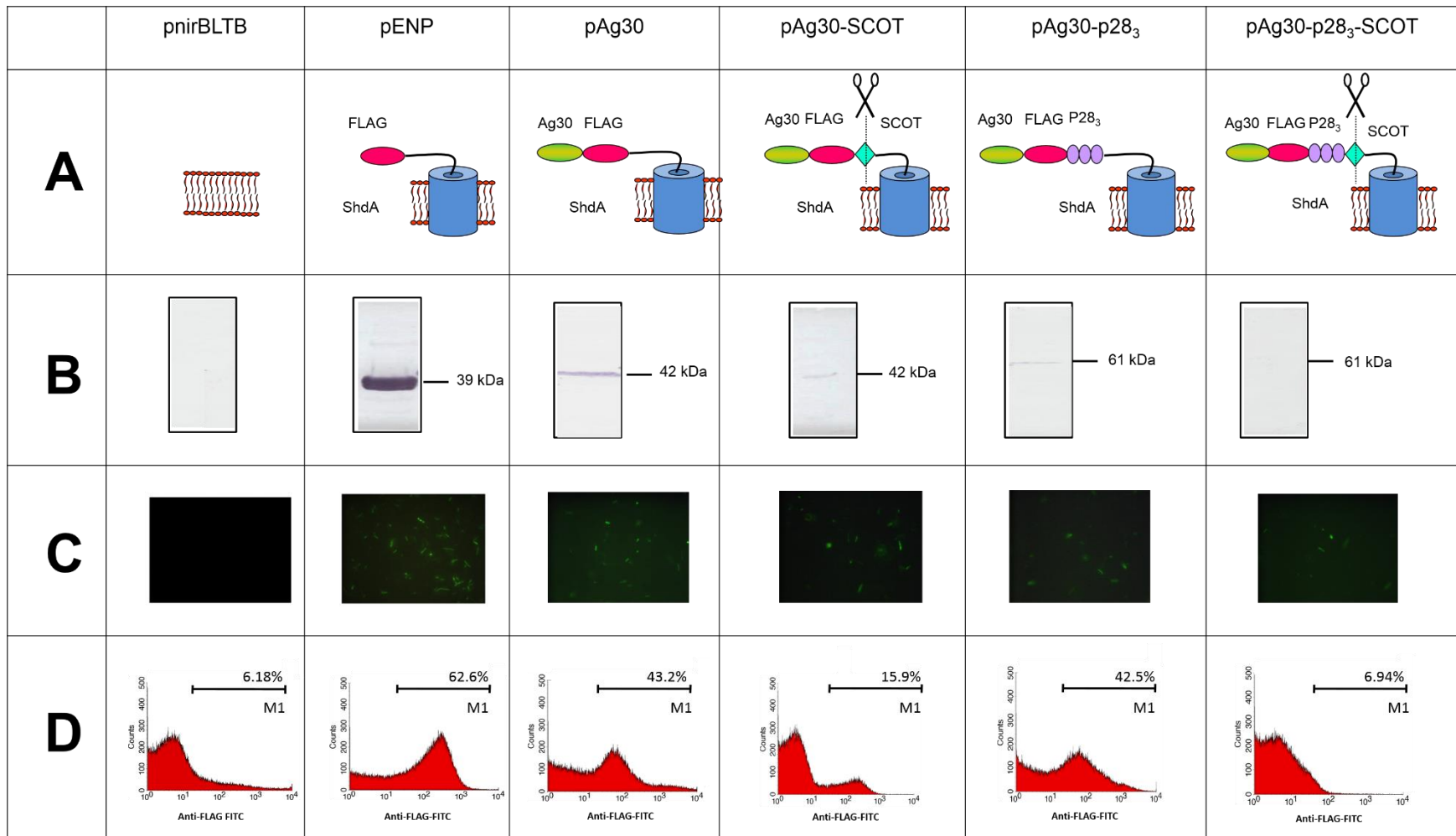
Figura 20. Análisis del plásmido pAg30-p28<sub>3</sub>-SCOT. (A) Secuencia nucleotídica de la cadena de DNA antisentido. (B) Mapa representativo del plásmido. Se indica en flechas de distintos colores cada una de las secuencias que conforman el plásmido son indicadas en distintos colores.

**Evaluación de la expresión de las proteínas de fusión heterólogas en la superficie de *E. coli* DH5 $\alpha$ .** Una vez transformada *E. coli* DH5 $\alpha$  con los plásmidos que codifican para todas las proteínas de fusión, se procedió a crecer cultivos de todas las cepas bajo condiciones inductoras. En primera instancia, la funcionalidad del sistema de expresión se evaluó en extractos totales de bacteria separados en geles de poliacrilamida al 10%, en condiciones desnaturalizantes y reductoras (SDS-PAGE), así como por Western-blot. La Fig. 21A, muestra el modelo hipotético de translocación de cada uno de los péptidos heterólogos mediante el sistema autotransportador ShdA. El plásmido pAg30 codifica para el péptido Ag30 de *T. spiralis* fusionado a ShdA y a una bandera molecular (FLAG), cuyo tamaño corresponde a 42 kDa (Fig. 21B). Cuando la proteína es liberada al medio extracelular (sistema pAg30-SCOT) a través del sitio de escisión proteolítica para la Omp T proteasa (SCOT), también es posible observar la banda de 42 kDa, aunque con menor intensidad (Fig. 21B). Con respecto a la expresión de la proteína de fusión Ag30-P28<sub>3</sub>, se observó un tamaño de 61 kDa, aunque cabe mencionar que la intensidad de esta banda es notablemente inferior respecto a la intensidad observada en las proteínas codificadas por los plásmidos pAg30 y pAg30-SCOT, esto sugiere que al tiempo del análisis de expresión, un disminuido nivel de producción de la proteína heteróloga Ag30-p28<sub>3</sub>, con respecto al nivel de expresión mostrado en las proteínas que contienen al Ag30 unido a la membrana ó en su forma secretada.

La expresión de todas las proteínas, en la superficie de *Salmonella*, con excepción de la codificada por el plásmido pnirBLTB, fue detectable según lo muestran los ensayos de inmunofluorescencia indirecta (Fig. 21C). Estos resultados fueron consistentes con los observados en el análisis de citometría de flujo, en donde se pudo observar hasta un logaritmo de desplazamiento, respecto del control negativo (Fig. 21D). Las cepas transformadas con los plásmidos pnirBLTB (Ruiz-Pérez et al., 2002; Ruiz-Olvera et al., 2003) y pENP (Pompa-Mera et al., 2011) se usaron como controles negativo y positivo, respectivamente. En todos los casos, la detección de las proteínas se realizó usando un anticuerpo monoclonal dirigido a la bandera molecular FLAG. De manera general, estos resultados mostraron que los plásmidos construidos en el presente estudio, fueron de utilidad para la expresión de diversas proteínas heterólogas que contienen al péptido Ag30 de *T. spiralis*, fusionado al adyuvante p28 de ratón. Por otra parte, la introducción de codones de preferencia para *Salmonella* (Miller, 1992) en cada uno de los plásmidos construidos, no interfirió en gran medida con la expresión en *E. coli* DH5 $\alpha$ .

**Evaluación de la funcionalidad del sitio de corte de la OmpT proteasa (SCOT).** Las versiones secretadas de Ag30 (Ag30-SCOT, Ag30-P28<sub>3</sub>-SCOT) se generaron mediante la inserción de una secuencia corta de DNA que codifica sitios de escisión proteolítica para OmpT proteasa

(SCOT) (KRPGGGGGKRGGGGGPKR) (Ruiz-Olvera et al., 2003 y Luria-Pérez et al., 2007) entre la unión de secuencias que codifican para el autotransportador ShdA y el adyuvante P28<sub>3</sub>. Por otro lado, para evaluar la funcionalidad del sitio de corte para la OmpT proteasa, se emplearon dos cepas de *E. coli*: *Escherichia coli* BL21-DE3 (OmpT<sup>-</sup>, sin actividad proteolítica) y *Escherichia coli* XL-10 Gold (OmpT<sup>+</sup>, con actividad proteolítica). Las dos cepas se transformaron con los plásmidos pAg30-SCOT y pAg30-p28<sub>3</sub>-SCOT, se cultivaron en condiciones inductoras y mediante citometría de flujo se evaluó la expresión de las proteínas heterólogas en la superficie de ambas cepas. El análisis de citometría de flujo reveló que los histogramas correspondientes a las cepas *Escherichia coli* BL21-DE3 (carente de una OmpT proteasa funcional) y transformada con los plásmidos pAg30-SCOT y pAg30-p28<sub>3</sub>-SCOT, mostraron un desplazamiento de hasta dos logaritmos, respecto de la cepa usada como control negativo *E. coli* BL21-DE3 (transformada con el plásmido pnirBLTB). Lo anterior, indicó que en estas cepas solo se lleva a cabo la expresión de las proteínas de fusión codificadas por los plásmidos pAg30-SCOT y pAg30-p28<sub>3</sub>-SCOT en la superficie bacteriana y no su secreción hacia el medio extracelular, aún en presencia del sitio de corte indispensable para esta proteasa. De manera contraria, la cepa *Escherichia coli* XL-10 Gold (provista con una OmpT proteasa funcional) mostró una disminución en el nivel de expresión de las proteínas Ag30 y Ag30-p28<sub>3</sub> en la superficie celular bacteriana, en modo similar al control negativo (*E. coli* XL-10 Gold transformada con el plásmido pnirBLTB); sugiriendo que las proteínas de fusión Ag30 y Ag30-p28<sub>3</sub> probablemente son secretadas al medio extracelular (Fig. 22). En conjunto, estos datos demuestran la funcionalidad del sitio de corte para la OmpT proteasa en las cepas estudiadas. Cepas de *Escherichia coli* XL-10 GOLD y BL21-DE3 transformadas con el plásmido pnirBLTB, se usaron como control negativo en estos ensayos.



**Figura 21. Análisis de la expresión de las proteínas de fusión que contienen al péptido heterólogo Ag30, en la superficie de *E. coli* DH5 $\alpha$ .** En la primera fila se indica el nombre de los plásmidos que codifican para cada una de las proteínas de fusión. A) Modelo hipotético de translocación de las proteínas heterólogas en la superficie bacteriana de *E. coli* DH5 $\alpha$ . B) Detección de la proteína de fusión mediante Western-blot. C) Expresión de las proteínas de fusión revelada por inmunofluorescencia indirecta y mediante D) Citometría de flujo. Cepas de *E. coli* DH5 $\alpha$  transformada con los plásmidos pnirBLTB y pENP fueron usadas como controles negativo y positivo, respectivamente.

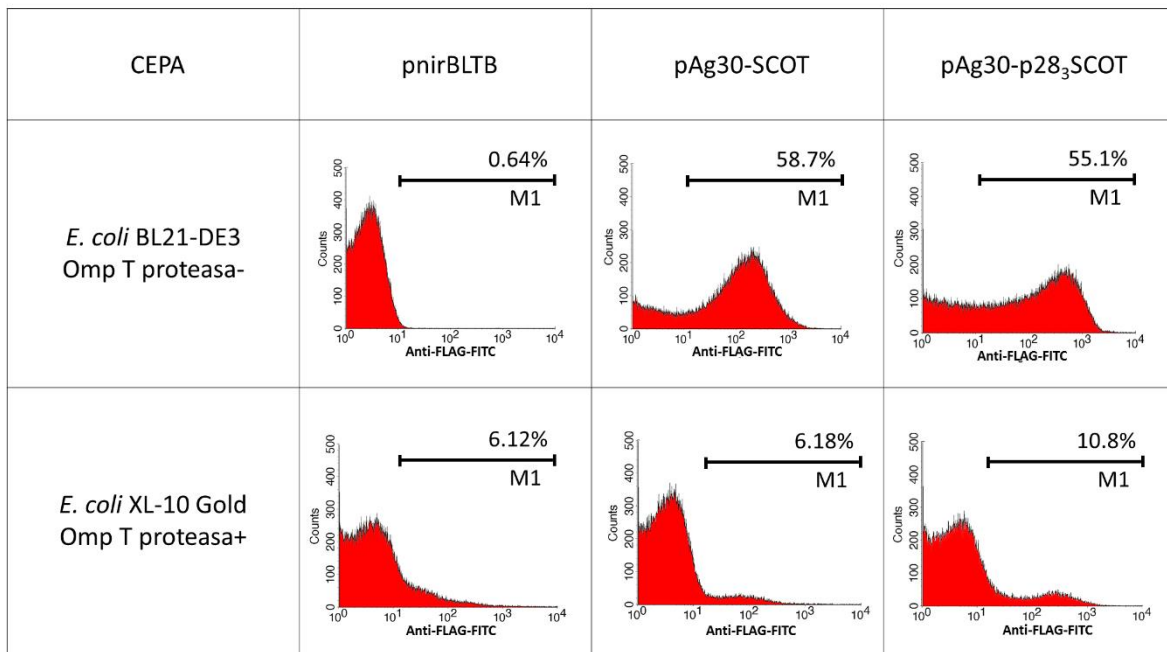


Figura 22. Análisis de la funcionalidad del sitio de corte de OmpT proteasa (SCOT) en las cepas *Escherichia coli* BL21-DE3 (OmpT<sup>-</sup> proteasa) y XL-10 Gold (OmpT<sup>+</sup> proteasa). Las cepas fueron transformadas con los plásmidos indicados en la parte superior de la Figura. Ambas cepas de *E. coli* transformadas con el plásmido pnirBLTB se usaron como controles negativos.

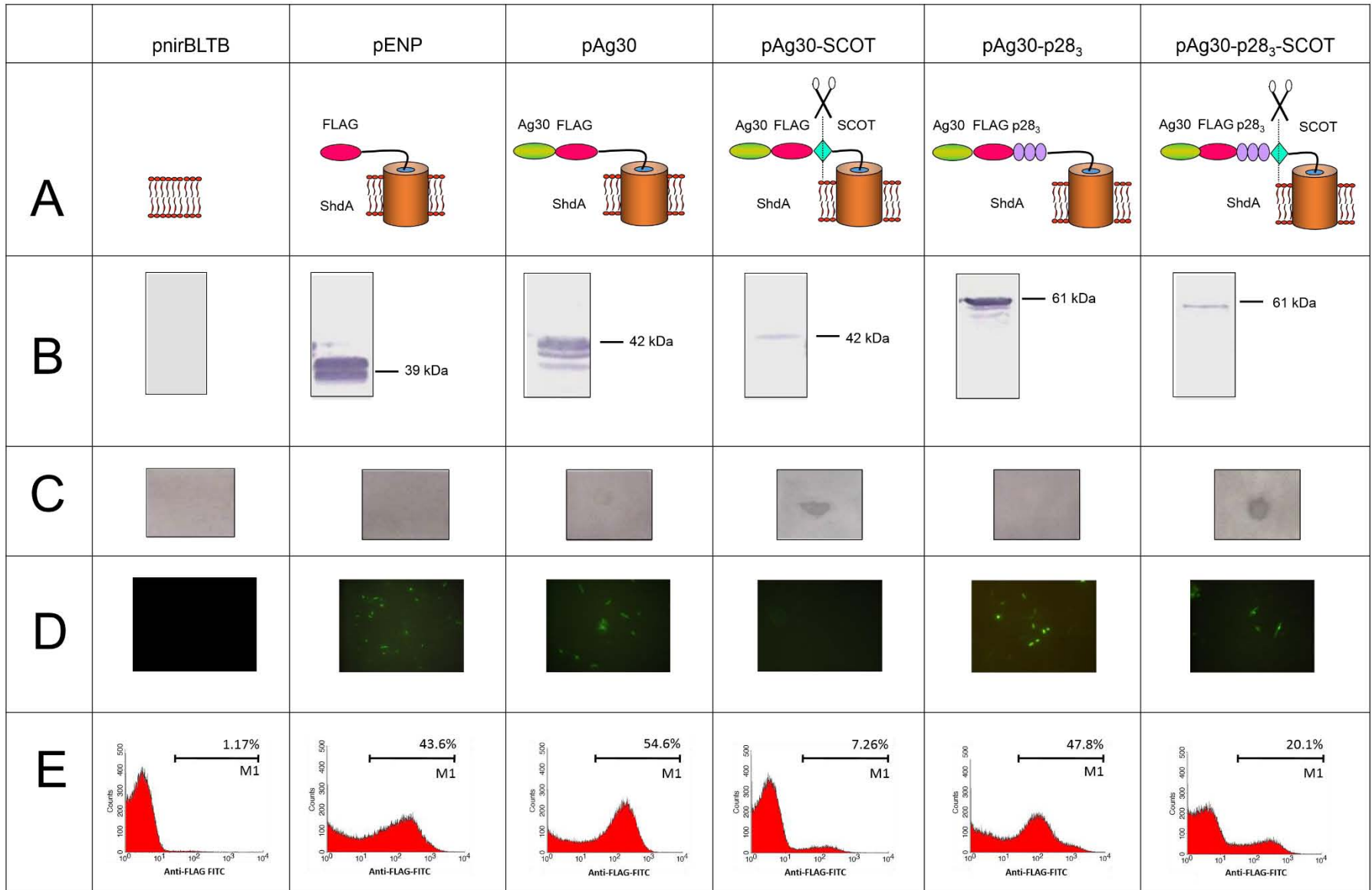
### Análisis de la expresión de las proteínas de fusión en la superficie de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium SL3261.

*Salmonella enterica* serovar Typhimurium SL3261 fue transformada por electroporación con los plásmidos pAg30, pAg30-SCOT, pAg30-p28<sub>3</sub> y pAg30-p28<sub>3</sub>-SCOT y cultivada en condiciones inductoras. Al igual que en los análisis realizados en *E. coli* DH5α, la expresión de péptidos ó proteínas heterólogas en la superficie de *Salmonella* fue evaluada. La figura 23A muestra el modelo de translocación de cada uno de los péptidos heterólogos, vía el sistema autotransportador ShdA, los cuales son codificados por los plásmidos pENP pAg30 (Pompa-Mera et al., 2011), pAg30-SCOT, pAg30-p28<sub>3</sub> y pAg30-p28<sub>3</sub>-SCOT. Mediante SDS-PAGE y Western-blot, se detectaron en extractos totales de las diferentes bacterias recombinantes las bandas de gran intensidad correspondientes a las proteínas de fusión que contiene solo la bandera molecular (FLAG) (39 kDa), al péptido Ag30 fusionado a ShdA (42 kDa) y fusionado al adyuvante p28<sub>3</sub> (61 kDa). Sin embargo, las bandas correspondientes a las formas secretadas de las proteínas Ag30 y Ag30-P28<sub>3</sub>, si bien se detectaron, su intensidad fue menor respecto a las proteínas ancladas a la

membrana externa de *Salmonella* recombinante (Fig. 23B). De manera importante, las formas secretadas de las proteínas Ag30 y Ag30-P28<sub>3</sub>, se hicieron evidentes en los sobrenadantes recuperados de los cultivos de las bacterias transformadas con los plásmidos pAg30-SCOT y pAg30-p28<sub>3</sub>-SCOT (Fig. 23C), confirmado una vez más, la funcionalidad del sitio de corte para la OmpT proteasa en *S. enterica* serovar *Typhimurium*. Por otra parte, los ensayos de inmunofluorescencia indirecta revelaron que las cepas de *Salmonella* pAg30 y pAg30-p28<sub>3</sub> expresaron en su superficie las proteínas heterólogas de interés. De manera contraria, *Salmonella* pAg30-SCOT no mostró expresión del péptido Ag30 en sus superficie al momento del análisis (Fig. 23D). Por otra parte, el análisis de citometría de flujo, reveló hasta dos logaritmos de desplazamiento, en la expresión de la proteína de fusión codificada por los plásmidos pAg30, pAg30-p28<sub>3</sub>, respecto del control negativo ó las cepas pAg30-SCOT y pAg30-p28<sub>3</sub>-SCOT (Fig. 23E). Es notable que la cepa transformada con pAg30 expresó con mayor eficiencia que la cepa pAg30-p28<sub>3</sub>.

De manera conjunta, estos resultados confirmaron que las distintas cepas de *Salmonella* transformadas con los plásmidos construidos en el presente trabajo, pueden expresar en la superficie bacteriana ó secretar hacia el medio extracelular, de manera eficiente, las proteínas que contienen al péptido heterólogo Ag30 de *T. spiralis* fusionado al adyuvante p28 de ratón.







**Figura 23. Análisis de la expresión de péptidos heterólogos en la superficie de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium SL3261.** En la primera fila se indica el nombre de los plásmidos que codifican para cada una de las proteínas de fusión. A) Modelo hipotético de translocación de las proteínas heterólogas en la superficie bacteriana de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium SL3261. B) Detección de la proteína de fusión mediante Western-blot. C) Expresión de las proteínas de fusión revelada por inmunofluorescencia indirecta y mediante D) Citometría de flujo. Cepas de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium SL3261 transformadas con los plásmidos pnirBLTB y pENP fueron usadas como controles negativo y positivo, respectivamente.

### **Efecto del plásmido y de la expresión de proteínas heterólogas sobre la cinética de crecimiento del acarreador.**

La síntesis de antígeno heterólogo codificado por un plásmido, representa una carga metabólica para la cepa recombinante con fines de vacuna; por lo que es importante evaluar la velocidad de crecimiento *in vitro* y la viabilidad del acarreador bacteriano. Una vez que se transformó a *Salmonella* con las diferentes construcciones, se procedió a evaluar el efecto del plásmido sobre la cinética de crecimiento de *Salmonella* recombinante con fines de vacuna. En la figura 24 se muestra la cinética de crecimiento de las diferentes cepas de *Salmonella* en condiciones inductoras. Aunque todas fueron muy semejantes entre sí, es notable el efecto que tiene pAg30-p28<sub>3</sub> sobre el crecimiento de la bacteria, a pesar de que el promotor del plásmido es de origen procarionte. Esta observación sugiere que el crecimiento bacteriano se afecta a medida que el plásmido codifica para una proteína de fusión más compleja y que permanece anclada a la membrana externa. El efecto de la complejidad de la proteína de fusión sobre el crecimiento bacteriano se ve disminuido cuando la proteína heteróloga es secretada como en el caso de *Salmonella* pAg30-SCOT y pAg30-p28<sub>3</sub>-SCOT, cuya cinética de crecimiento fue similar a la de las cepas controles SL3261 y pENP. Ninguna de las cepas analizadas mostró efectos tóxicos atribuibles a la replicación ó expresión de alguno de los plásmidos.

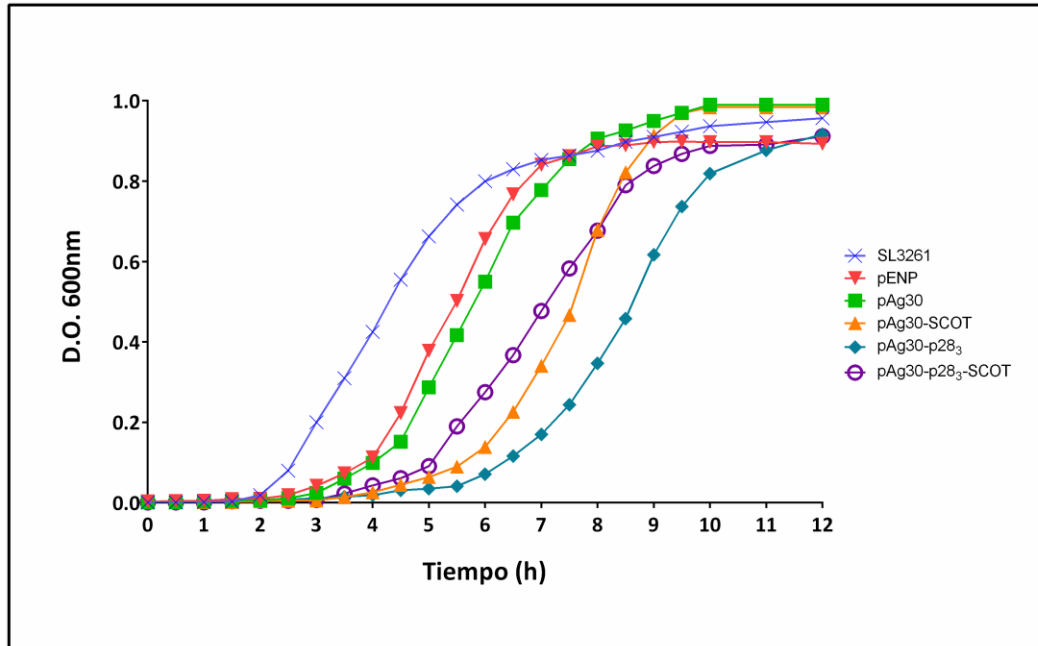


Figura 24. Efecto de la expresión de proteínas heterólogas codificadas por distintos plásmidos sobre la cinética de crecimiento de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium SL3261. Cepas de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium SL3261 transformada con los plásmidos pENP, pAg30, pAg30-SCOT, pAg30-p28<sub>3</sub> y pAg30-p28<sub>3</sub>-SCOT, se monitorearon a lo largo de 12 horas de cultivo en condiciones inductoras. Se utilizó *Salmonella* sin transformar como control.

**Colonización de *Salmonella* recombinante en el bazo de los animales inmunizados.** La capacidad de colonizar órganos linfoides como el bazo por parte de las cepas recombinantes de *Salmonella* se analizó en dos animales de cada grupo, cinco días después de cada inmunización. Los resultados muestran que en general, todas las cepas colonizaron de manera eficaz el bazo después de la primera y la segunda inmunización. Sin embargo, se observó una reducción en el número de UFC recuperadas de bazo después de la segunda inmunización (día 25 del esquema) y prácticamente después de la tercera inmunización, (día 47) las UFC fueron indetectables. Lo anterior, refleja la capacidad del acarreador bacteriano de inducir una respuesta inmune en contra de *Salmonella* (Fig. 25). Estos datos sugieren que la transformación de *Salmonella* con los diferentes plásmidos, no afecta la capacidad de la bacteria de colonizar tejidos como el bazo en el ratón.

**Estabilidad genética del plásmido *in vivo*.** La colonización de *Salmonella* en el bazo es importante para garantizar que el acarreador bacteriano pueda estar en contacto con las células de la respuesta inmune. Sin embargo, también es importante conocer si el acarreador bacteriano que arriba al bazo, posee los plásmidos que codifican para las proteínas heterólogas a fin de evocar la respuesta inmune en contra de *T. spiralis*. A este respecto, la estabilidad genética del plásmido *in vivo* se determinó aislando los plásmidos

de las cepas de *Salmonella* recuperada de bazo de los ratones inmunizados. Todos los plásmidos recuperados (días 5 y 25) se usaron como templados para amplificar por PCR, la región comprendida entre la secuencias codificantes de la bandera molecular FLAG y las primeras 50 bases del autotransportador *shdA*. Los resultados se presentan en la figura 26 y confirman la estabilidad genética de cada uno de los plásmidos *in vivo*.

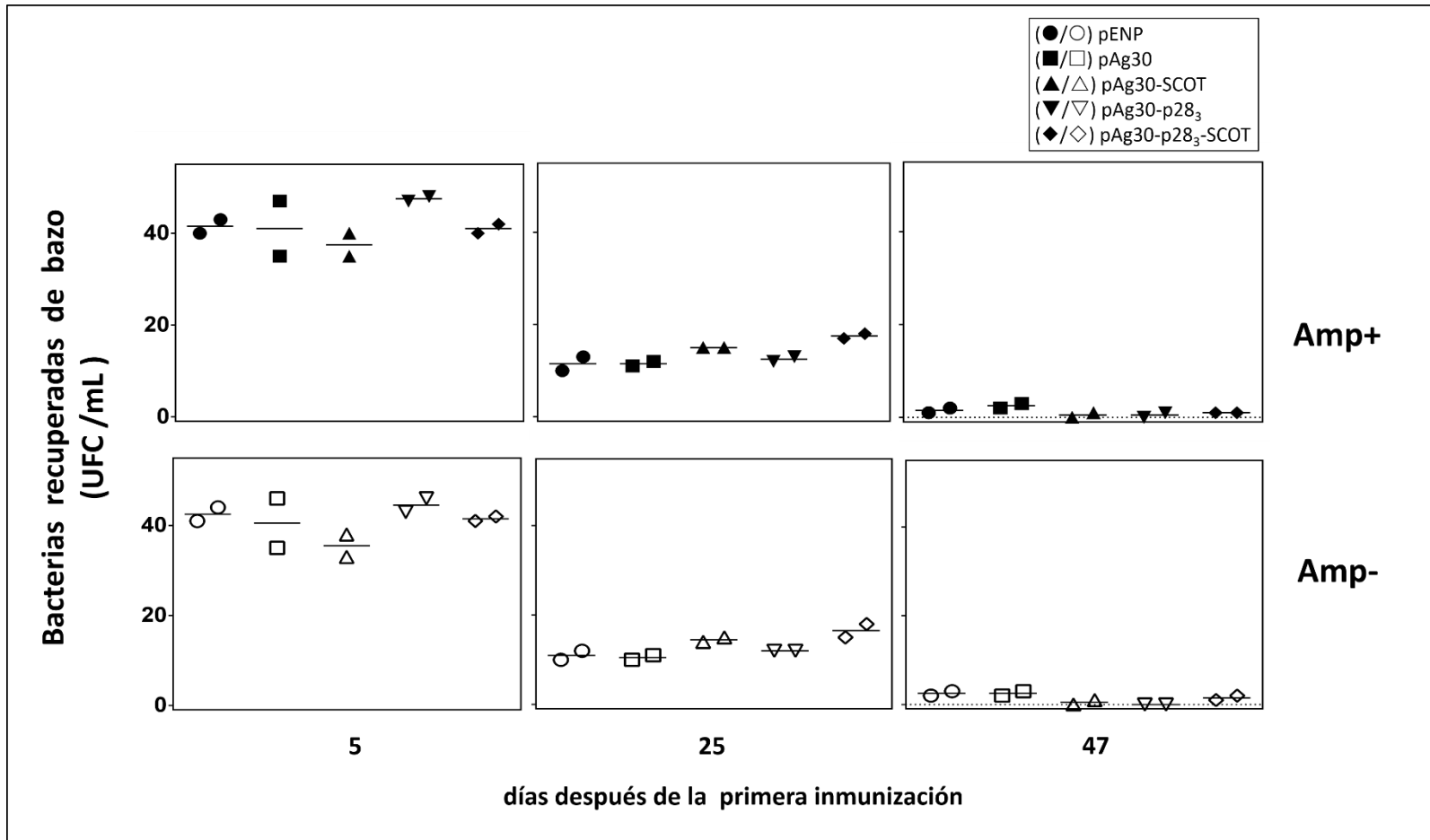


Figura 25. Recuperación de *Salmonella* recombinante a partir de esplenocitos de ratones BALB/c inmunizados. Grupos de 17 ratones se inmunizaron por vía intranasal con  $1 \times 10^9$  UFC de cada una de las cepas recombinantes de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium SL3261. Cinco días después de cada inmunización (días 5, 25 y 47), dos ratones de cada grupo fueron sacrificados y esplenectomizados. Los esplenocitos se lisaron y la solución final se sembró en placas de agar BHI suplementadas con DHB 0.01% con y sin ampicilina. El número de bacterias viables se determinó contando las UFC de cada placa.

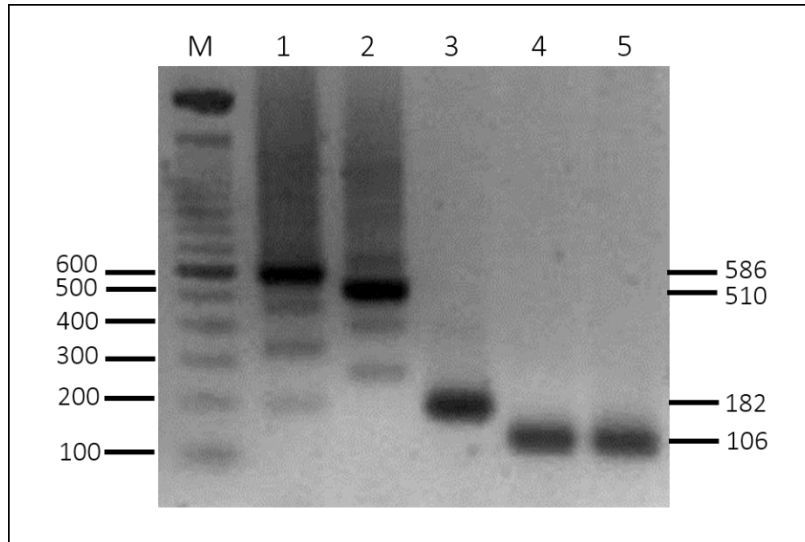
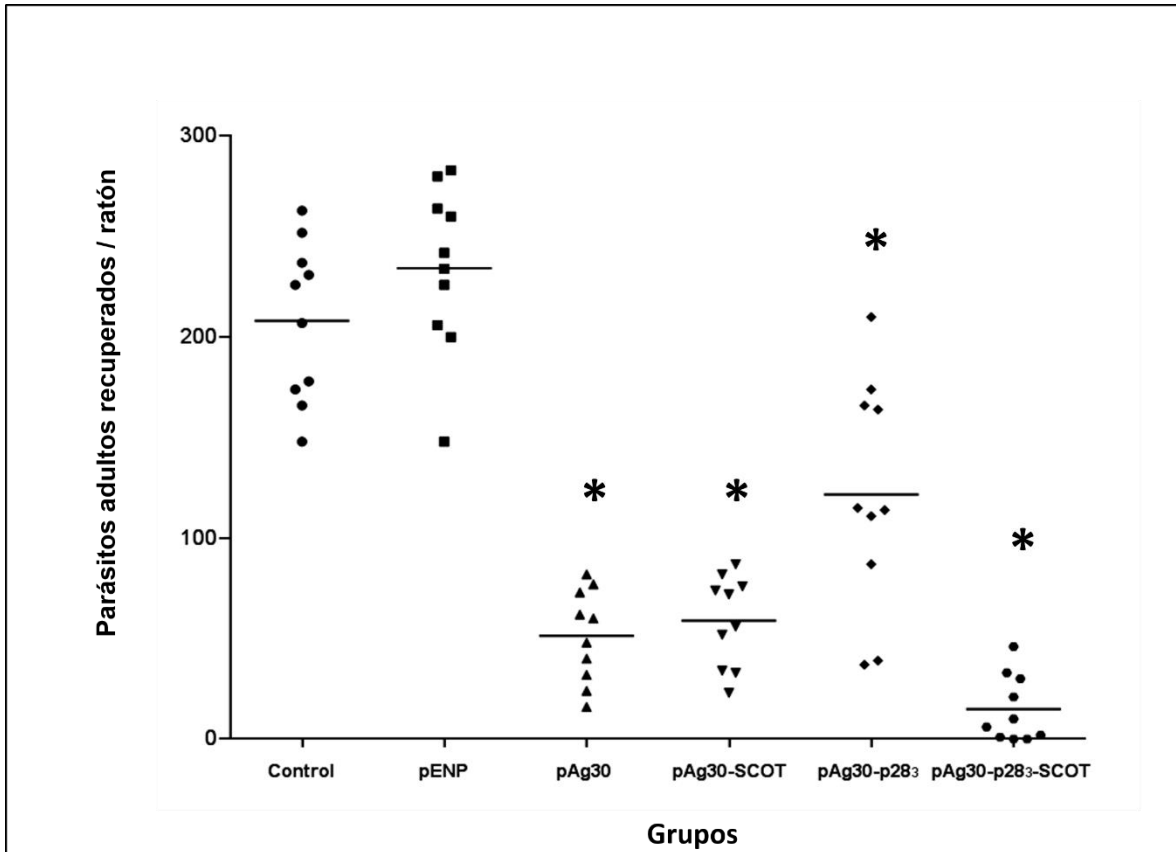


Figura 26. Amplificación por PCR de la región comprendida entre la bandera molecular FLAG y el autotransportador ShdA, a partir de plásmidos de *Salmonella* recuperada del bazo de animales inmunizados y crecida en presencia de ampicilina. Los plásmidos se purificaron a partir de colonias aisladas y se usaron como DNA templado en la PCR para amplificar la región comprendida entre la bandera molecular FLAG y el autotransportador ShdA. M) Marcador de 100 pb (Invitrogen®), amplicones derivados de los plásmidos recuperados: 1) pAg30-p28<sub>3</sub>-SCOT, 2) pAg30-p28<sub>3</sub> 3) pAg30-SCOT, 4) pAg30 y 5) pENP. Los resultados mostrados corresponden a la amplificación por PCR usando como templado los plásmidos recuperados de cepas de *Salmonella* obtenidas al día 5 del esquema de inmunización.

**Protección inducida por las diferentes cepas recombinantes de *Salmonella*.** La inmunidad protectora a nivel local (intestinal) en ratones BALB/c inducida por la inmunización con las diferentes cepas de *Salmonella* transformada con los plásmidos pENP (control), pAg30 pAg30-SCOT, pAg30-p28<sub>3</sub> y pAg30-p28<sub>3</sub>-SCOT, se evaluó al día 53. Para ello, los animales se desafiaron con 300 LM de *T. spiralis* (10 días después de la última inmunización) y posteriormente se recuperaron los parásitos adultos, 8 días p.i. La protección se determinó con respecto al grupo control de infección (tratado con PBS y desafiado con el parásito). Los animales inmunizados con las cepas de *Salmonella* pAg30 y pAg30-SCOT redujeron el número de parásitos adultos 75% y 72%, respectivamente en comparación con el grupo de infección ( $P < 0.05$ ). De manera interesante, *Salmonella* pAg30 p28<sub>3</sub>-SCOT indujo los niveles más altos de protección a nivel local con una reducción de la carga de parásitos adultos de 92.8%, el cual fue significativamente diferente del control de infección ( $P < 0.05$ ). En contraste, *Salmonella* pAg30-p28<sub>3</sub> evocó los niveles más bajos de protección (42%). A este respecto, es importante destacar que este grupo mostró una gran variabilidad en el número de parásitos adultos recuperados (Fig. 27). Todos los grupos fueron significativamente diferentes ( $P < 0.05$ ) con respecto al grupo control inmunizado con *Samonella* pENP.

De esta manera, la inmunización con las diferentes cepas de *Salmonella* permitió analizar la protección a nivel local contra la infección por *T. spiralis*, cuando el péptido es expresado en la superficie bacteriana del acarreador y/ ó es secretado por *Salmonella* recombinante, ya sea solo ó fusionado al adyuvante molecular p28.

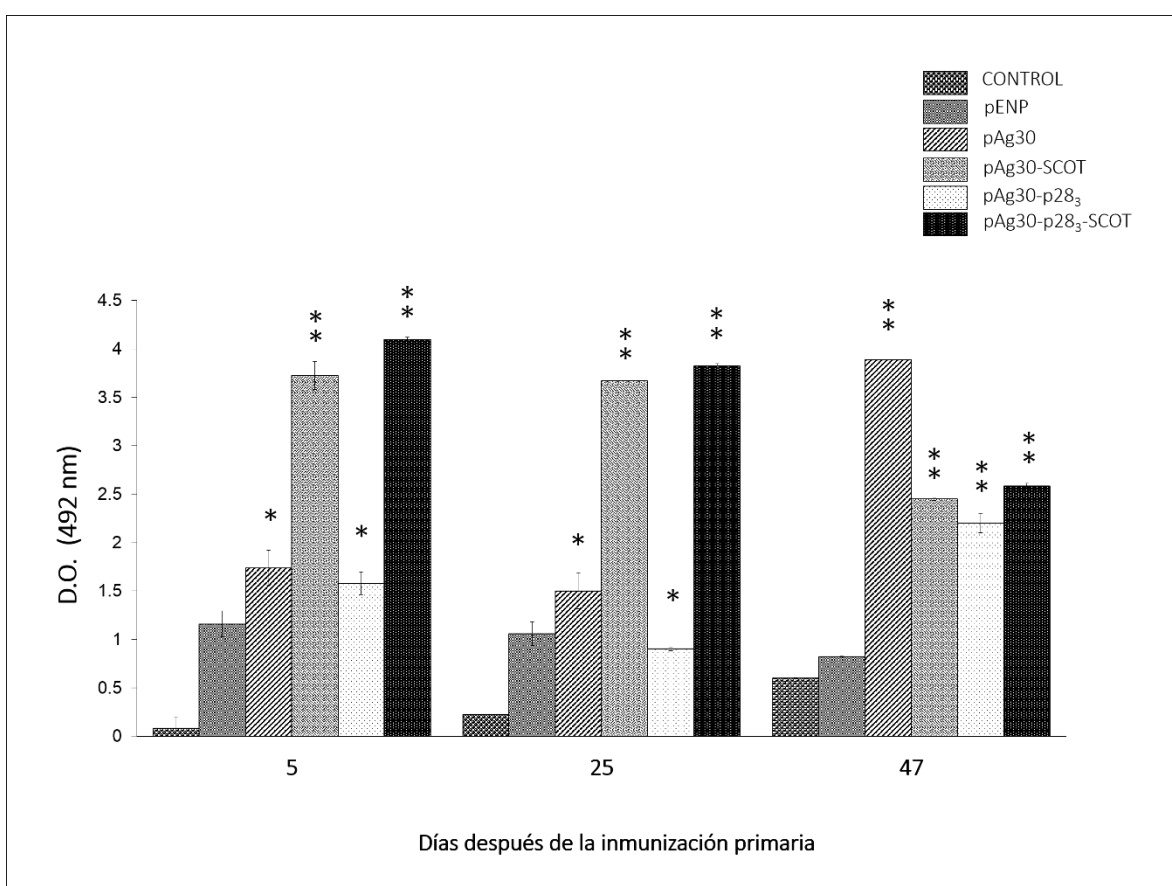


**Figura 27. Protección a nivel local inducida por las diferentes cepas de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium SL3261, contra la infección por *T. spiralis*.** Ratones BALB/c se inmunizaron por vía i.n. con  $1 \times 10^9$  UFC de *Salmonella* transformada con los plásmidos pENP, pAg30, pAg30-SCOT, pAg30-p28<sub>3</sub> y pAg30-p28<sub>3</sub>-SCOT. Se incluyó un grupo control que solo recibió PBS. Los animales se infectaron con 300 LM de *T. spiralis* día 53 del esquema de inmunización y 8 días p.i. se recuperaron los adultos del intestino de los animales inmunizados y control de infección. Los datos mostrados representan el porcentaje de protección en cada uno de los grupos (n=10). La inmunidad protectora se calculó con base al número promedio de parásitos adultos recuperados en cada grupo inmunizado, dividido entre el número promedio de parásitos adultos del grupo control (PBS) y multiplicado por 100%. (\*) Diferencia estadísticamente significativa respecto del control de infección ( $P < 0.05$ ).

### Caracterización de la respuesta inmune humoral evocada por las diferentes cepas de *Salmonella*.

La respuesta humoral local mediada por IgA y la respuesta de IgG e IgG1 (a nivel sistémico) se determinó mediante ELISA empleando 50 µg de ET de la LM de *T. spiralis*. De manera

interesante, niveles elevados de IgA intestinal se observaron desde el día 5 y hasta el día 25 en los grupos inmunizados con los acarreadores bacterianos que secretan al péptido Ag30 solo o fusionado al adyuvante P28 (Ag30-P28<sub>3</sub>), sin embargo, estos niveles disminuyeron al día 47 del esquema de inmunización. Por otra parte, los niveles de IgA intestinal de los grupos inmunizados con las cepas que expresan en la superficie Ag30 y Ag30-P28<sub>3</sub>, se fueron incrementando alcanzando un máximo hasta el día 47 del esquema de inmunización. Estos datos destacan la importancia de la secreción *in vivo* de antígenos recombinantes en la producción de anticuerpos IgA y sugieren que la secreción *in vivo* de péptidos heterólogos parece acelerar la producción de IgA intestinal poco después de la primera inmunización (Fig. 28).



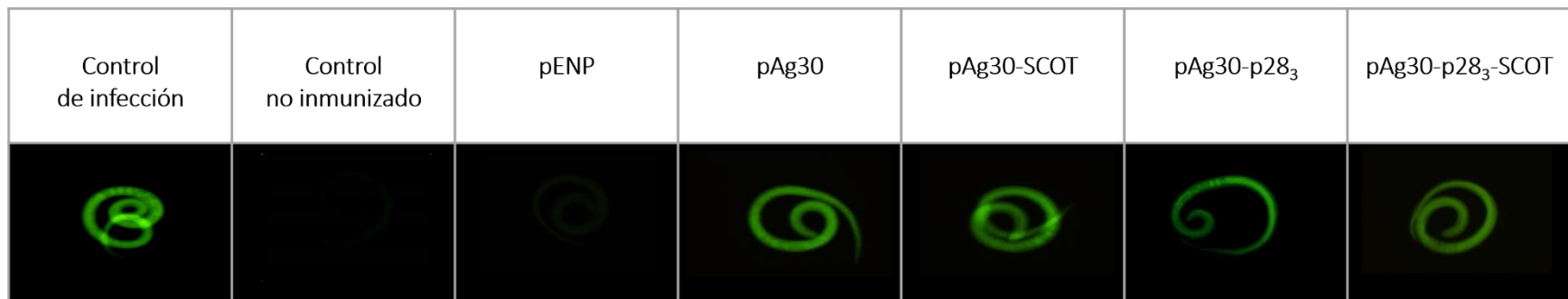
**Figura 28. Reconocimiento del ET de la LM de *T. spiralis* por anticuerpos intestinales de la clase IgA de los animales inmunizados.** Los lavados intestinales, obtenidos de los animales inmunizados con las diferentes cepas vacunales sin diluir se pusieron a reaccionar con el ET del parásito. Datos presentados como valores media  $\pm$  SD.

\* Grupos estadísticamente diferentes respecto del grupo control ( $P < 0.01$ ).

\*\* Grupos estadísticamente diferentes respecto del grupo control y del grupo inmunizado con *Salmonella* pENP ( $P < 0.0001$ ).

De manera importante, los anticuerpos intestinales de la clase IgA inducidos por las diferentes formas recombinantes del péptido Ag30 de *T. spiralis* reconocieron a la proteína nativa de la p43 de la LM del parásito, desde el día 5 y hasta el día 47 del esquema de inmunización. En la figura 29 se presentan las micrografías correspondientes a los ensayos de inmunofluorescencia indirecta, realizadas con los lavados intestinales obtenidos en el día 47 de los animales de los diferentes grupos inmunizados. Estos datos sugieren que las proteínas de fusión expresadas en la superficie de la bacteria son secretadas por ésta, conservando sus propiedades inmunogénicas.



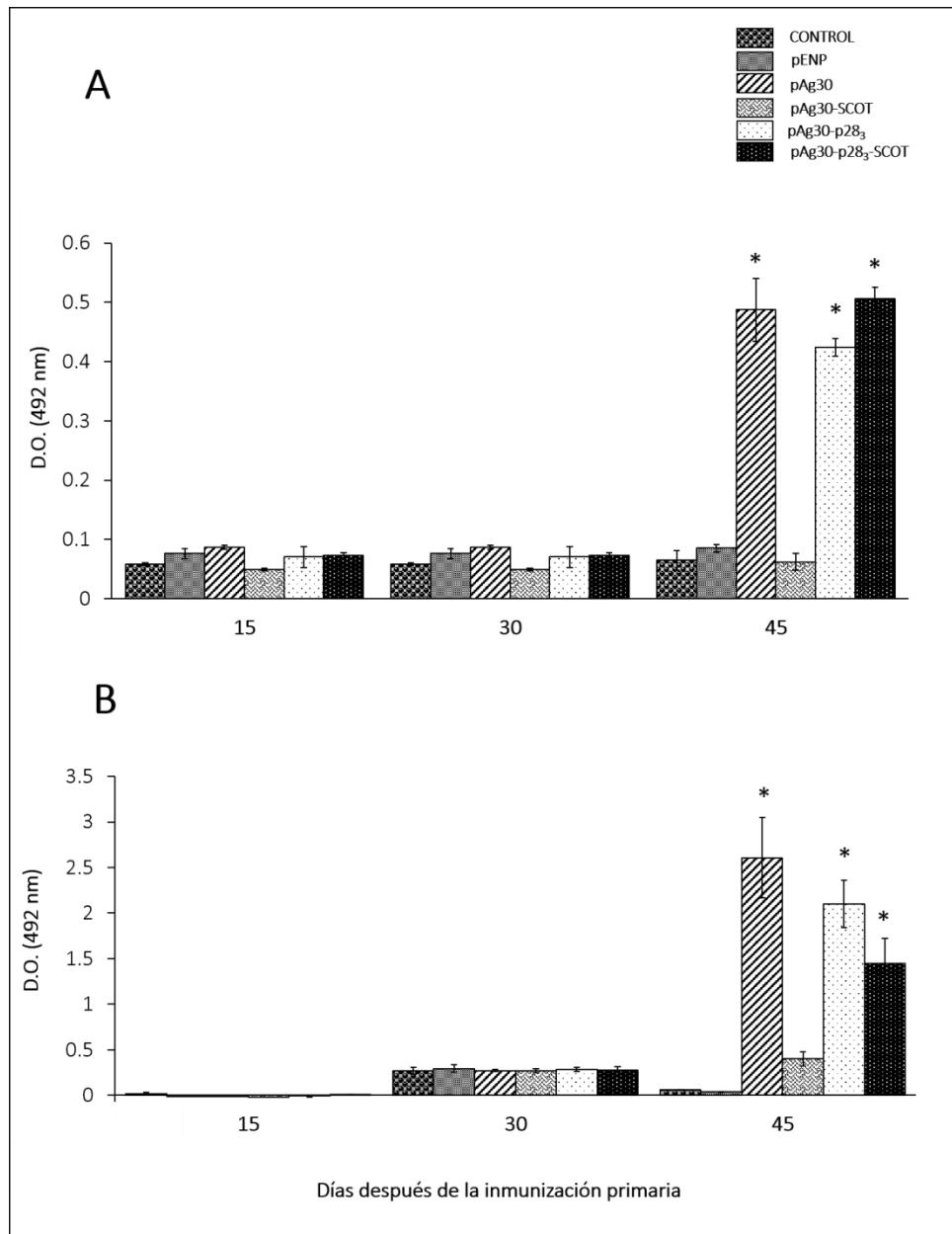


**Figura 29. Reconocimiento de la superficie de la LM de *T. spiralis* por anticuerpos intestinales de la clase IgA de los animales inmunizados.** LM de *T. spiralis* se incubaron con los lavados intestinales (sin diluir), obtenidos de los animales inmunizados con las diferentes cepas vacunales de *Salmonella*, como segundo anticuerpo se usó anti-IgA-FITC producido en cabra. Se muestran los resultados obtenidos con los lavados intestinales recuperados al día 47 del esquema de inmunización.

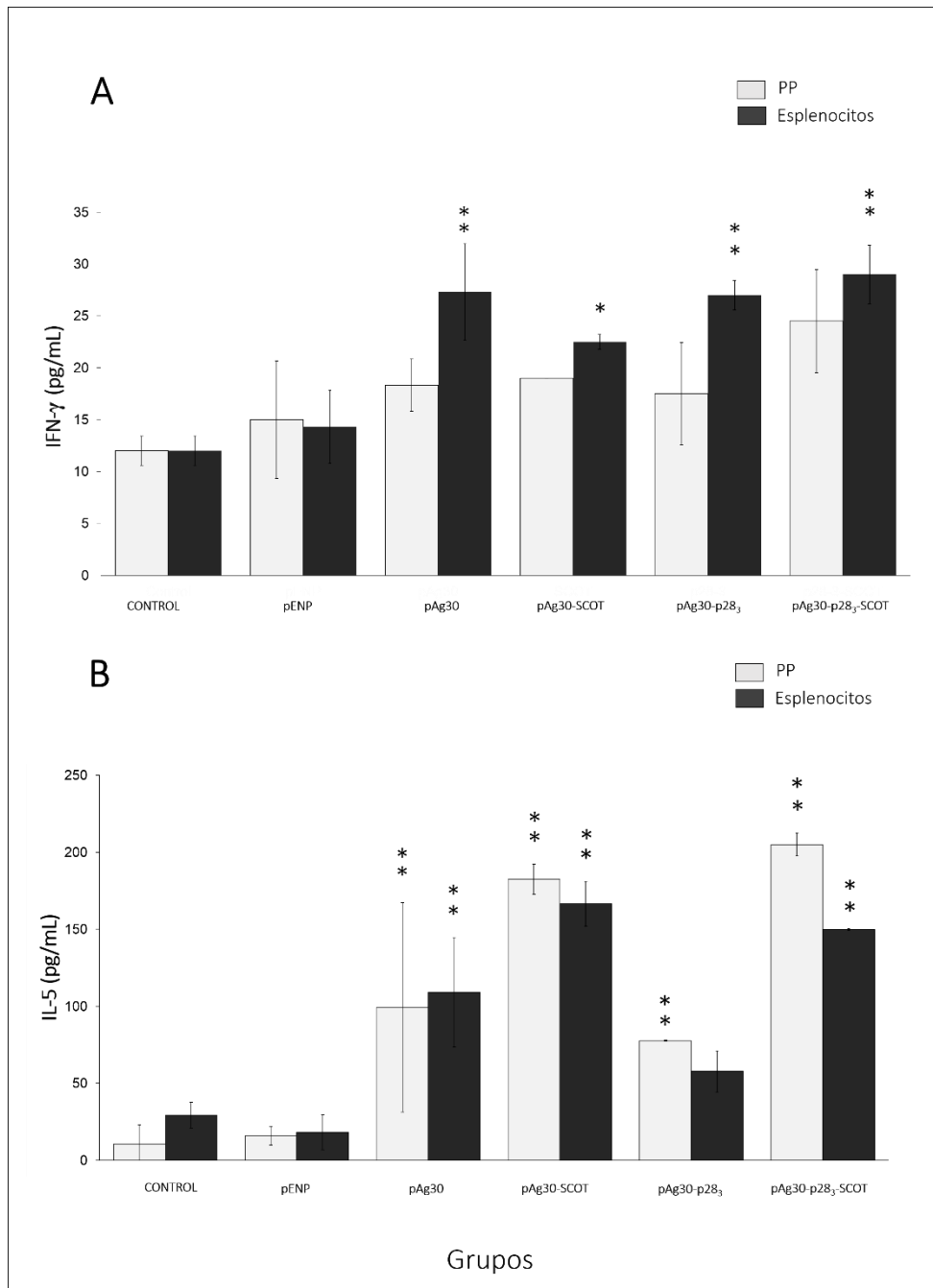
Con respecto a la respuesta inmune sistémica mediada por anticuerpos de la clase IgG, se observó que *Salmonella* pAg30, pAg30-p28<sub>3</sub> y pAg30-p28<sub>3</sub>-SCOT evocaron niveles de IgG total e IgG1 superiores a los mostrados en los grupos control (grupo tratado con PBS), pENP y pAg30-SCOT, solo hasta el día 45 del esquema de inmunización (Figs. 30 A y B). Estos datos sugieren que la respuesta de IgG e IgG1 sistémica parece estar asociada a la entrega del péptido heterólogo Ag30 a través de la expresión en la superficie bacteriana (autodisplay) y a través de la secreción cuando este péptido se encuentra fusionado a múltiples copias del adyuvante molecular P28 (codificado por el plásmido pAg30-p28<sub>3</sub>-SCOT).

### **Caracterización de la respuesta inmune celular inducida por las diferentes cepas de *Salmonella*.**

La respuesta inmune celular antígeno-específica, se evaluó al día 54 del esquema de inmunización en animales inmunizados pero que no fueron desafiados con el parásito. Para ello, 2 animales por grupo se sacrificaron con el objeto de obtener células de bazo y de las placas de Peyer (PP). Estas células se estimularon *in vitro* con ET de la LM de *T. spiralis* y se cultivaron por 48 horas. Posteriormente se determinaron las concentraciones de las citocinas IFN- $\gamma$  (como marcador de la respuesta celular Th1) e IL-5 (como marcador de la respuesta celular Th2) en los sobrenadantes de los cultivos. El análisis de los niveles de IFN- $\gamma$ , reveló que las células de PP de los ratones inmunizados con las diferentes cepas de *Salmonella* produjeron bajas cantidades de IFN- $\gamma$ , que no fueron significativamente diferentes respecto del control negativo ó sin estimulación ( $P > 0.05$ ) (Fig. 31A). Por su parte, los esplenocitos de los ratones inmunizados con las cepas de *Salmonella* pAg30, pAg30-SCOT, pAg30-p28<sub>3</sub> y pAg30-p28<sub>3</sub>-SCOT produjeron niveles elevados de IFN- $\gamma$  en comparación con los niveles producidos por las PP. A este respecto, los esplenocitos de los ratones inmunizados con la cepa *Salmonella* pAg30 produjeron niveles de IFN- $\gamma$  (27-30 pg/mL) significativamente más altos con respecto al control negativo (11-13 pg / mL) ( $P < 0.05$ ) (Fig. 31A). Con respecto al análisis de la citocina IL- 5, esplenocitos y células de PP de ratones inmunizados con las diferentes cepas de *Salmonella*, con la excepción de las células de bazo de los animales inmunizados con *Salmonella* pAg30-p28<sub>3</sub>, produjeron cantidades significativamente mayores en comparación con el grupo de control ( $P < 0.05$ ) (Fig. 31B). Es importante señalar que las células de PP procedentes de ratones inmunizados con las forma secretadas de Ag30, ya sea fusionado o no al adyuvante P28<sub>3</sub>, produjeron los más altos niveles de IL - 5 (182-205pg/mL). Por su parte, los esplenocitos y las células de las PP de los ratones inmunizados con *Salmonella* pAg30- p28<sub>3</sub> indujeron a los niveles más bajos de IL- 5 en ambos tipos de células inmunes (57-77 pg/mL) (Fig. 31B).



**Figura 30. Respuesta de anticuerpos de la clase IgG (total) e IgG1 inducidos por la inmunización con diferentes cepas de *Salmonella* recombinante.** Los sueros de los ratones inmunizados se colectaron a los días 15, 30 y 45 del esquema de inmunización y se analizaron mediante ELISA para la detección de anticuerpos dirigidos en contra del extracto total del parásito. Se muestran los resultados correspondientes a A) IgG total y B) IgG1 en dilución 1:100 de los sueros. Los datos son presentados como la media  $\pm$  S.D. (\*) Estadísticamente significativo respecto del grupo control ( $P < 0.0001$ ).



**Figura 31.** Niveles de IFN- $\gamma$  (A) e IL-5 (B) producidos por esplenocitos y placas de Peyer (PP) de ratones inmunizados con las diferentes cepas de *Salmonella* recombinante. Las células linfoides se obtuvieron al día 54 del esquema de inmunización, se estimularon *in vitro* con 50  $\mu$ g de ET del parásito y se cultivaron por 48 horas. Se incluyeron células de animales no inmunizados como control negativo. Los niveles de ambas citocinas se determinaron en sobrenadantes celulares mediante ELISA.

\*Diferencia estadísticamente significativa respecto del grupo control ( $P < 0.05$ ).

\*\*Diferencia estadísticamente significativa respecto del grupo pENP ( $P < 0.05$ ).

## DISCUSIÓN

*Trichinella spiralis* es un nemátodo intracelular causante de la triquinelosis (Pozio, 2007) que lleva a cabo todos sus estadios de desarrollo en un solo huésped, ocupando compartimentos intestinales (fase intestinal) y extraintestinales (fase sistémica o parenteral) (Fabre et al., 2009a). Es importante destacar que este parásito puede persistir en el huésped por mucho tiempo (i.e., en humanos, la LM puede permanecer infectiva hasta por 30 años en el tejido muscular estriado aun cuando han recibido tratamiento farmacológico) (Fröscher et al., 1988; Capo y Despommier, 1996). Estos casos de farmacorresistencia y falla terapéutica, en conjunto con los casos de infección y reinfección a nivel veterinario, han llevado a proponer a las vacunas de uso veterinario, como medidas de control alternativas (Meeusen et al., 2007; Harris y Gause, 2011; Vercruysse et al., 2007; Bruschi y Dupouy-Camet, 2014), especialmente en el cerdo, cuya carne es la principal fuente de infección para el humano.

Generalmente la vacunación contra enfermedades zoonóticas o transmitidas por alimentos de origen animal, como en el caso de la triquinelosis, está principalmente dirigida a reducir o eliminar el riesgo para el consumidor en términos de la mejora en la calidad y productividad de los alimentos de origen animal (Meeusen et al., 2007). Sin embargo, las vacunas también deben de tener como objetivo interceptar y eliminar los estadios de desarrollo invasores (por ejemplo a nivel de mucosas) o aquellos estadios de desarrollo estrechamente asociados a la patogénesis sistémica ocasionada por el parásito (Hewitson y Maizels, 2014).

El diseño y desarrollo racional de vacunas antihelmínticas, representa uno de los principales desafíos en medicina y biología (Maizels et al., 1999; Hewitson et al., 2014). A este respecto, existen diversos abordajes para el diseño de vacunas en contra de parásitos helmintos. Desde el punto de vista tradicional, el diseño de las vacunas con actividad antihelmíntica deberá ir enfocado a la reducción de la sobrevivencia y la fecundidad de los nemátodos (Viney, 2002). Por otra parte, resulta de suma importancia en el diseño de vacunas, la identificación de antígenos que puedan funcionar como blancos efectivos, así como el estudio de las interacciones huésped-parásito para entender el fino balance entre la sobrevivencia del parásito y los mecanismos inmunes involucrados en el proceso de su expulsión (Maizels et al., 1999; Kołodziej-Sobocińska et al., 2006; Harris, 2011).

A la fecha, se han descrito un gran número de vacunas experimentales en contra de los estadios intestinales y sistémicos de *T. spiralis*. En estos estudios, se ha evaluado el uso de diferentes preparaciones antigénicas obtenidas directamente de alguno de los estadios de desarrollo del parásito, tales como larvas musculares irradiadas atenuadas (Agyei-

Frempong y Catty, 1983; Nakayama et al., 1998), extracto crudo antigénico de *T. spiralis* (el-Shazly et al., 2002; McGuire et al., 2002), así como la inmunización con TsES de LM (Dea-Ayuela et al., 2006.); obteniéndose diversos niveles de protección. Si bien estos modelos de vacunación usan la fuente nativa de antígeno; tienen la enorme desventaja de que la obtención de antígeno o extracto total crudo requiere numerosos pases en modelos animales de infección para mantener la fuente de antígenos; aspectos que incrementan el costo de su producción (Emery et al., 1993; Geldhof et al., 2007).

Por su parte, las vacunas de DNA que codifican para diferentes antígenos derivados de *T. spiralis*, si bien resuelven el problema de conservación del preparado antigénico (en red fría), solo han ofrecido niveles parciales de protección contra la fase enteral y sistémica de la infección (Wang, et al., 2006; Yang et al., 2010; Tang et al., 2012). Lo anterior probablemente se debe a que la gran mayoría se basa en el uso de un solo epítotope, lo cual representa un enfoque demasiado estrecho para la inducción de respuestas inmunes protectoras. Por otra parte, el uso de plásmidos de expresión eucarionte en estos modelos, así como la capacidad de la célula transfectada *in vivo* para expresar el antígeno son factores que determinan la biodisponibilidad del inmunógeno y por lo tanto el tipo y magnitud de la respuesta inmune que se induce (Coban et al., 2011).

Otros estudios se han basado en la inmunización con péptidos sintéticos derivados de la glicoproteína de 43 kDa (p43) de la LM. En estos esquemas de inmunización, los péptidos se han co-administrado con adyuvantes potentes (CFA) o que actúan a nivel de mucosas (CTB), resultando en una reducción parcial en el número de parásitos adultos a los 6 y 8 días p.i. (Robinson et al., 1995a; Robinson et al., 1995b; McGuire et al., 2002.). Si bien la inmunización con péptidos representa una alternativa para administrar epítotos de células T o B, tiene la enorme desventaja de que la síntesis química es costosa (Francis y Larché, 2005). Además, los péptidos deben ser co-administrados con adyuvantes para aumentar su inmunogenicidad, tiempo de vida y en múltiples dosis para poder inducir un buen nivel de inmunidad (Reed et al., 2013).

El desarrollo de vacunas dirigidas contra los estadios intestinales de *T. spiralis* resulta de gran interés ya que en estudios realizados con anticuerpos contra los antígenos de TsES de la LM del parásito demostraron la inhibición de la invasión del epitelio intestinal por la LM así como la inhibición de la muda de la LM a adulto (McVay et al., 1998; 2000). Cabe mencionar que entre los antígenos de E/S se encuentra la p43 antes mencionada. Considerando que en la mucosa intestinal se encuentran sitios inductores de la respuesta inmune, además de ser un órgano, cuya superficie funciona como sitio de entrada de antígeno, la vacunación a nivel de mucosas, puede prevenir el establecimiento del adulto de *T. spiralis* en el nicho intestinal y/o limitar la diseminación del parásito.

Una vacuna que actúa exitosamente en las mucosas, debe ser capaz de penetrar la superficie de las mucosas de manera controlada y activar la respuesta inmune innata (activación de células dendríticas, macrófagos, células epiteliales) y adaptativa (inmunidad mediada por anticuerpos y por células T) del tracto intestinal (Chen y Cerutti, 2010). Sin embargo, la inmunización con productos purificados típicamente conduce a una respuesta modesta de anticuerpos con poca o nula respuesta de células T (Reed et al., 2013).

Existen diversas estrategias para inducir inmunidad a nivel de mucosas, que por lo general requieren de adyuvantes (Chen y Cerutti, 2010). El uso de cepas atenuadas de *Salmonella enterica* como vehículo de inmunización, representa una estrategia de vacunación atractiva para el desarrollo de vacunas contra patógenos intestinales. Estos vehículos de inmunización, ofrecen ventajas entre las cuales destacan las propiedades de adyuvante en sus componentes celulares (Chatfield et al., 1995; Spreng et al., 2006; Kotton y Hohmann, 2004), su capacidad para mimetizar la infección natural e interactuar con las mucosas, el tropismo por los sitios inductores en mucosas (placas de Peyer), así como con las células de la respuesta inmune innata y adquirida. Por otra parte, tienen gran potencial para producir y expresar *in situ* antígenos y péptidos heterólogos derivados de virus, bacterias y parásitos (Schorr et al., 1991; Guo et al., 2003; Rosenkranz et al., 2003; Kotton y Hohmann, 2004; Pacheco et al., 2005; Konjufca et al., 2006; Petavy et al., 2008; Pathangey et al., 2009; Bumann et al., 2010; Zhu et al., 2010; Yang et al., 2010b; Pompa-Mera et al., 2011; Jazayeri et al., 2012; Yu et al., 2012; Ault et al., 2013; Ding et al., 2013; Roland y Brenneman, 2013; Yin et al., 2013). Por otra parte, la inmunización por vía intranasal con *Salmonella* es más inmunogénica que la vía oral, gracias a que en el tejido linfoide asociado a la mucosa nasal (NALT) también se encuentran presentes células M que facilitan el acceso del antígeno a las células presentadoras de antígeno profesional, de manera que presumiblemente, *Salmonella* entra en contacto con este sitio inductor en una manera muy similar a la invasión de placas de Peyer (Galen et al., 1997; Huang et al., 2000).

El uso de *Salmonella* como acarreador de antígenos heterólogos requiere de la construcción del sistema y eventualmente la expresión/entrega de la proteína cuidadosamente seleccionada para asegurar la cantidad de antígeno en el tejido adecuado (Galen et al., 2009).

Tomando en cuenta la utilidad de *Salmonella* como acarreador de antígenos heterólogos, el interés de nuestro grupo de investigación fue la construcción de una vacuna contra la fase intestinal de *T. spiralis*, empleando a *S. enterica* serovar Typhimurium SL3261 como acarreador del péptido de 30 aa (Ag30) derivado de la p43 de la LM de *T. spiralis* y mediante el uso del autotransportador ShdA para lograr su expresión en la superficie de la bacteriana (cepa vacunal *Salmonella* pAg30). La cepa vacunal se administró en ratones

BALB/c por vía intranasal y fue capaz de evocar inmunidad protectora del 62% contra la fase intestinal de *T. spiralis*, la cual estuvo asociada a la producción de IgG y una respuesta mixta de citocinas Th1/Th2 (IL-5 e IFN- $\gamma$ ), además, este sistema permitió mantener las propiedades inmunogénicas del epítipo (Pompa-Mera et al., 2011).

En el presente estudio, con la finalidad de incrementar la protección conferida por la cepa vacunal *Salmonella* pAg30, se construyeron cepas de *Salmonella* que expresan y/o secretan el antígeno Ag30 fusionado a tres copias del dominio mínimo de unión del adyuvante molecular C3d (P28). La protección conferida por la administración intranasal de las cepas vacunales se determinó contra los estadios intestinales de *T. spiralis* en un modelo de triquinosis en ratones BALB/c.

Cabe mencionar que C3d ó su dominio P28 han sido empleados como adyuvantes en diversos modelos de vacunación contra una amplia variedad de patógenos ó antígenos, mostrando su capacidad para evocar inmunidad humoral, así como su capacidad para polarizar la respuesta hacia una de tipo Th2 (Mitchell et al., 2003; Wang XL et al., 2006; Tong et al., 2006; Bergmann-Leitner et al., 2007). Sin embargo, el uso del adyuvante P28 en modelos de vacunación contra parásito helmintos no ha sido explorado.

En el diseño del sistema de expresión del presente estudio un aspecto importante a considerar, fue el uso preferencial de codón, ya que las diferencias entre los codones usados entre el DNA foráneo de *T. spiralis*, *Mus musculus* y las células huéspedes procariones (*E. coli* y *Salmonella*) puede afectar la eficiencia de traducción y/o síntesis de proteínas (Gustafsson et al., 2004). A este respecto, fue importante considerar la sustitución de codones sinónimos desde el diseño de los iniciadores con la finalidad de optimizar la producción de proteínas (Nørholm et al., 2012). De esta manera, la capacidad del plásmido construido para inducir la expresión del epítipo Ag30 fusionado al adyuvante molecular P28 (derivado del C3d de ratón) en la superficie bacteriana o eventualmente secretado al medio extracelular, se evidenció en los diferentes ensayos de inmunofluorescencia, citometría de flujo y western-blot. Por otro lado, el uso del promotor nirB en los plásmidos de expresión construidos, tuvo la finalidad de regular la expresión inducible de las proteínas de fusión en un microambiente proporcionado por las mucosas (Chatfield et al., 1992; 1995; 1997). De esta manera, la expresión inducible de la proteína de fusión a través de un sistema de plásmido de bajo número de copias, puede evitar la expresión constitutiva de una proteína heteróloga, cuya síntesis representa una carga metabólica adicional para el acarreador, resultando muchas veces en un producto tóxico ó que puede resultar en un cuerpo de inclusión. Por otra parte, la carga metabólica adicional que supone la síntesis de una proteína heteróloga, también puede afectar la velocidad y/o capacidad de colonización de *Salmonella* (Bumann, 2001; Curtiss et al., 2010; Galen et al.,



2010). De hecho, a pesar de la inclusión del promotor nirB, en este estudio se observó cómo la secreción de Ag30-P28<sub>3</sub> por la cepa *Salmonella* pAg30-P28<sub>3</sub>-SCOT permitió que la bacteria tuviera un crecimiento más cercano a la cepa control, en comparación con *Salmonella* pAg30-P28<sub>3</sub>, cuya cinética de crecimiento se observó atrasada. Sin embargo, a pesar de lo anterior, la viabilidad de las diferentes cepas vacunales no se vió afectada de manera importante. Los aspectos relacionados con la cinética de crecimiento son cruciales, ya que pueden también reflejar la velocidad de crecimiento *in vivo* o la colonización del acarreador, afectando la cantidad de vector vacunal disponible para interactuar con los tejidos linfoides del huésped así como la cantidad de péptido heterólogo, resultando en una respuesta inmune insuficiente (Galen et al., 2009; 2010).

Otro aspecto de gran importancia en el diseño de los sistemas de expresión fue considerar la localización subcelular del antígeno heterólogo en el acarreador bacteriano, ya que puede influir en gran medida sobre la intensidad y el tipo de respuesta inducida (Hanh y Specht, 2003; Galen et al., 2010). De hecho existe evidencia creciente de que los antígenos asociados a la membrana de *Salmonella* y aquellos que son secretados por este acarreador, tienen una inmunogenicidad superior en comparación con la inmunogenicidad mostrada por su contraparte citoplásmica (Hess et al., 1996; Hanh y von Specht, 2003; Kang y Curtiss, 2003; Hur y Lee, 2011; Barat et al., 2012). Diversas son las razones que pueden explicar el efecto que tiene la localización en la superficie o secreción del antígeno en su inmunogenicidad. En estos casos el procesamiento antigénico es superior, ya que interactúan directamente con las células presentadoras de antígeno, especialmente si van co-administrados con patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP), tales como el lipopolisacárido de *Salmonella* y que eventualmente son reconocidos por los receptores tipo Toll (TLR) (Kang et al., 2002; Alaniz et al., 2007; Barat et al., 2012).

Aparte del sistema de autotransportador para la expresión de proteínas heterólogas en superficie, las secuencias señales para exportar/secretar proteínas, también se han empleado para este fin. Entre algunos ejemplos de estas secuencias están: Lpp, LamB, LTB, MalE, OmpA, OmpC, OmpF, OmpT, PelB, PhoA, PhoE, or SpA (Choi y Lee, 2004).

En el presente estudio, los plásmidos se diseñaron para permitir la expresión del antígeno Ag30 en la superficie bacteriana de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium SL3261, a través del autotransportador ShdA y en otros casos, para que el antígeno Ag30 fuera secretado por la bacteria a través de la introducción de la secuencia de corte proteolítico (SCOT) con reconocimiento para la Omp T proteasa, entre el antígeno Ag30 y el autotransportador ShdA. Esta secuencia de corte ha sido anteriormente empleada de manera exitosa para liberar antígenos de la membrana externa de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium SL3261 o secretarlos *in vitro* e *in vivo* hacia el espacio extracelular

(Ruiz-Olvera et al., 2002; Luria-Pérez et al., 2007). La funcionalidad del autotransportador ShdA, así como de la secuencia de corte para la Omp T proteasa (SCOT) se demostró en *E. coli* DH5 $\alpha$  y en *Salmonella enterica*, a través de ensayos de Western blot, dot blot, inmunifluorescencia y citometría de flujo.

Con base a los resultados obtenidos en este estudio, se puede decir que la expresión regulada del antígeno heterólogo Ag30 y su fusión con el adyuvante P28 no interfirieron con la viabilidad de las cepas recombinantes de *Salmonella*. Lo anterior se demostró con la presencia de las diferentes cepas en el bazo de animales inmunizados después de la primera y segunda inmunización, aunque después de la tercera inmunización, no se recuperaron bacterias. Lo anterior indica que en los animales inmunizados, el acarreador bacteriano no perdió *in vivo* su inmunogenicidad, induciendo una respuesta inmune efectora, ya que posterior a la tercera inmunización, no se recuperaron bacterias viables en el bazo de los animales inmunizados. De manera importante la persistencia del plásmido en las bacterias colectadas del bazo de los animales inmunizados se demostró por PCR. Lo anterior correlaciona con lo reportado en otros estudios que emplean a *Salmonella* como acarreador (Anderson et al., 1996; Bumann, 2001; Wang et al., 2011).

Con relación a los resultados de protección obtenidos en el presente estudio, se puede mencionar que todas las cepas vacunales indujeron protección significativa con respecto al control de infección y ésta se demostró contra la fase intestinal de *T. spiralis*. Las cepas *Salmonella* pAg30, *Salmonella* pAg30-SCOT y *Salmonella* pAg30-p28<sub>3</sub>-SCOT redujeron la carga parasitaria del adulto en 75%, 72% y 92.8%, respectivamente. Sin embargo, la cepa *Salmonella* pAg30-p28<sub>3</sub> que expresa en la superficie bacteriana la fusión Ag30-P28<sub>3</sub> no evocó niveles elevados de protección contra la fase intestinal de *T. spiralis*. De estos resultados se puede concluir que la proteína de fusión Ag30-P28<sub>3</sub>, cuando es secretada, induce una respuesta inmune eficiente contra el parásito. La baja protección inducida por *Salmonella* pAg30-p28<sub>3</sub> pudiera explicarse en términos de que probablemente la fusión del extremo carboxilo-terminal de P28 al autotransportador ShdA, impidió su unión ó su interacción con el receptor CD21. La protección conferida por *Salmonella* pAg30-p28<sub>3</sub>-SCOT (92.8%) apoya esta observación, ya que este sistema de expresión permite que la proteína de fusión sea liberada, exponiendo el extremo carboxilo-terminal del adyuvante P28. Estas observaciones coinciden con los hallazgos publicados por Bower y Ross (2006) y por Weiss y cols. (2010), cuya ingeniería genética del adyuvante, consideró mantener libre el extremo carboxilo terminal del adyuvante. De esta manera, el C3d y su dominio P28 funcionan como ligandos de receptores clave en el curso de una respuesta inmune.

De acuerdo con los resultados del presente estudio, la respuesta inmune humoral inducida por las cepas vacunales que expresan Ag30 y Ag30-P28<sub>3</sub> en la superficie bacteriana,

mostraron niveles más altos de IgG1 en comparación con las cepas de *Salmonella* que secretan a Ag30 (Ag30-SCOT y Ag30-P28<sub>3</sub>-SCOT). Con respecto a la producción de IgA secretora, *Salmonella* pAg30-SCOT y *Salmonella* pAg30-p28<sub>3</sub>-SCOT indujeron niveles altos de IgA desde el día 5, sin embargo las formas no secretadas de Ag30 tardaron más tiempo en inducir niveles altos de IgA local. Estos resultados ponen de manifiesto la importancia que tiene la secreción *in vivo* de Ag30 para la producción de IgA local contra la infección por *T. spiralis*. La IgA local producida por los animales inmunizados con las diferentes cepas vacunales reconocieron la proteína nativa presente en la superficie de la LM de *T. spiralis*, lo que indica que las proteínas de fusión conservaron su inmunogenicidad. Los niveles de IgA de secreción inducidos por las formas secretadas de Ag30 aumentaron rápidamente desde el día 5 del esquema de inmunización, pero disminuyeron para el día 47. Una observación similar fue reportada por Sheela y cols. (2003), quienes también han documentado que la respuesta mediada por IgA puede ser transitoria y tiende a regresar a los niveles basales.

La participación de anticuerpos IgG1 en el control de la infección por *T. spiralis* durante la fase intestinal del parásito ha sido demostrada, interfiriendo con la muda del parásito e inhibiendo la invasión del epitelio intestinal (McVay et al., 1998, 2000; Wang et al., 1999). Por otro lado, se sabe que la IgA local reduce la fecundidad de la hembra, el tamaño de los adultos e inhibe el establecimiento de la LM en el nicho intestinal (Inaba et al., 2003a, 2003b). Si bien la IgA intestinal evocada por las diferentes cepas de *Salmonella* que expresan y/o secretan Ag30 fue capaz de reconocer antígenos nativos en la superficie de la LM de *T. spiralis*; es necesario evaluar su papel efector, especialmente en el establecimiento del parásito en el nicho intestinal y en la tasa de fecundidad.

Los resultados que se obtuvieron en el presente estudio mostraron que a pesar de la producción de IgG1 e IgA por los animales inmunizados, no se observó una correlación entre esta producción y la protección conferida por las diferentes cepas vacunales. Por ejemplo, la cepa *Salmonella* pAg30-p28<sub>3</sub>-SCOT que confirió la máxima protección (92.8%), no indujo los niveles máximos tanto de IgG1 como de IgA (al día 47). Además, las cepas de *Salmonella* pAg30-SCOT y pAg30-p28<sub>3</sub> que redujeron la carga parasitaria de adultos 72% y 42% indujeron una respuesta similar de IgA local y en el caso de *Salmonella* pAg30-p28<sub>3</sub>, con una protección del 42% indujo niveles mayores de IgG1 que *Salmonella* pAg30-p28<sub>3</sub>-SCOT con una protección del 92.8%. Una explicación a esta falta de correlación pudiera deberse a que después del desafío con *T. spiralis*, la respuesta de anticuerpos y citocinas aumenta en el intestino de los animales vacunados (Martínez-Gómez et al., 2009; Yang et al., 2010; Cui et al., 2013; Yang et al., 2013), por lo que al hacer la correlación entre niveles de anticuerpos y protección conferida por las cepas vacunales se debe tener en cuenta que los niveles de IgG1 e IgA se determinaron en los animales inmunizados días previos al

desafío con *T. spiralis* y la protección se midió 8 días después del desafío. Futuros estudios se requieren para evaluar la contribución del reto con el parásito al incremento de los niveles de estos anticuerpos en los animales vacunados. Diversos estudios han permitido observar un incremento significativo en la producción de anticuerpos de la clase IgG, a partir de la primera semana p.i. El tiempo de presentación de este incremento puede depender de diversos factores, entre los que destacan el número de inmunizaciones, la dosis infectiva de LM de *T. spiralis*, la cepa de ratón empleada y la susceptibilidad genética a la infección (Kennedy et al., 1991; Martínez-Gómez et al., 2009; Reiterová et al., 2009; Yang et al., 2010; Cui et al., 2013; Yang et al., 2013).

El número de inmunizaciones empleado en distintos modelos de vacunación es variado y controversial. La administración repetida de antígenos a nivel de mucosas puede dar lugar a la supresión de una respuesta inmune humoral en favor de la tolerancia oral (Jacob et al., 2013). Sin embargo, también existen modelos de vacunación en donde la administración repetida tiene como efecto el aumento de la respuesta inmune a antígenos contenidos en la vacuna (Church et al., 2011). En otros estudios, queda demostrado que la inmunización repetida puede reducir de manera significativa la respuesta antígeno-específica. De manera interesante, LaCelle y cols., (2009) reportaron que la vacunación repetida (3 inmunizaciones) resultó menos efectiva que la transferencia adoptiva de células T derivadas de ratones que recibieron una sola vacunación el mismo antígeno. En el presente estudio, si bien se emplearon 3 inmunizaciones, sería de gran interés conocer si un menor de ellas permite obtener niveles de protección similar.

En relación con la respuesta inmune celular, en los animales inmunizados se observó una respuesta mixta Th1/Th2, con predominancia de Th2. Es de interés resaltar que los animales inmunizados con *Salmonella* pAg30-SCOT y *Salmonella* pAg30-P28<sub>3</sub>-SCOT produjeron significativamente mayor cantidad de IL-5, a diferencia de *Salmonella* pAg30-p28<sub>3</sub> que produjo los niveles más bajos de la citocina. El nivel de protección conferido por las cepas recombinantes de *Salmonella* contra la infección por *T. spiralis* a nivel intestinal, estuvo sin lugar a dudas, relacionada con la producción de IL-5. Nuestros resultados demostraron que después de la inmunización intranasal, las placas de Peyer de los animales vacunados con *Salmonella* produjeron mayores cantidades de IL-5 en comparación con la producción de esta citocina por esplenocitos. Lo anterior evidencia que Ag30 es capaz de promover inmunidad en la mucosa intestinal. A este respecto, las citocinas TGF- $\beta$ , IL-10, IL-4, IL-5 y la IL-6 tienen un papel importante en promover la inmunidad de mucosas asociada con la producción de IgA (Marinaro et al., 1997; Brandtzaeg y Johansen, 2005). La IL-5 aumenta el número de células B (IgA+) en el intestino (Bao et al., 1998). De hecho, la producción de IgA de secreción dependiente de IL-5 también ha sido observada en modelos de vacunación empleando *S. enterica* serovar

Typhimurium (Walters et al., 2005). Por su parte, la IL-4 si bien es necesaria para la respuesta de IgA en mucosas en respuesta a antígenos solubles, esta citocina no es necesaria para la respuesta de IgA a antígenos pasajeros entregados (expresados o secretados) por *Salmonella* (VanCott et al., 1996; Okahashi et al., 1996; Pathangey et al., 2009). Un aspecto importante es la producción de IgA de secreción inducida por la inmunización con *Salmonella* recombinante, es que es un proceso dependiente de las respuestas Th1 y Th2 (Yamamoto et al., 1996). Esta observación coincide con nuestras observaciones acerca del microambiente de citocinas dado por el IFN- $\gamma$  y por la IL-5 al día 47, momento en el que aún se detectaron niveles importantes de IgA. Las PP han sido consideradas como los sitios inductores esenciales para la regulación de respuestas mediada por IgA antígeno-específica después de la inmunización oral (Cerutti et al., 2011). Sin embargo, la inmunización oral en ratones que carecen de PP resultó en la generación de respuestas de IgA antígeno-específica en el tracto gastrointestinal cuando se administraron las proteínas solubles por vía oral o directamente en el intestino (Yamamoto et al., 2000; Kunisawa et al., 2002), lo que sugiere la existencia de una vía para la respuesta de IgA en mucosas que es independiente de las PP como sitios inductores (Hashizume et al., 2008).

En el presente estudio no se determinaron otras citocinas que se sabe están relacionadas a la respuesta Th2, tales como linfopoyetina estromal de timo (TSLP) y la IL-25, que son producidas por células epiteliales, a las cuales se les ha identificado por tener un papel importante en la inducción de la activación de la respuesta Th2 en infecciones por helmintos intestinales (Koyasu y Moro, 2011); o como en el caso de la IL-25, que se produce en respuesta a TsES (Kang et al., 2012). Estudios recientes han demostrado que la producción de citocinas Th2 también involucra a células de la respuesta inmune innata a nivel intestinal, llamadas células colaboradoras naturales que producen grandes cantidades de IL-5 e IL-13, en respuesta a IL-25 e IL-33, independientemente de la inmunidad adaptativa (Kroeger et al., 2009; Neill et al., 2010; Neill y McKenzie, 2011). La producción de IL-5 e IL-13 produce eosinofilia e hiperplasia de células caliciformes (Saenz et al., 2010). Dado que el sistema del presente estudio permite la secreción *in vivo* de una proteína de fusión que contiene un péptido de *T. spiralis*, resultaría de gran interés estudiar si este sistema promueve el microambiente de citocinas Th2 a través de la producción temprana de IL-25.

Es importante mencionar que la respuesta mixta Th1/Th2 con predominancia de la respuesta Th2 observada en el presente trabajo, también es una característica que ha sido observada por otros grupos de investigación enfocados al desarrollo de vacunas contra *T. spiralis* (McGuire et al., 2002; Yang et al., 2008; Yang et al., 2010b; Cui et al., 2013; Feng et al., 2013; Yu et al., 2013; Fang et al., 2014). A este respecto, se sabe que las células

dendríticas expuestas a patógenos intracelulares como *Salmonella*, exhiben una importante plasticidad para promover ambas respuestas. Por una parte, promueven la respuesta Th1 (IFN- $\gamma$ ) (como parte del mecanismo protector y controlador del crecimiento bacteriano) (Mittrücker y Kaufmann, 2000; Mastroeni, 2002; Nanton et al., 2012; Olivier et al., 2013) y también promueven la producción de citocinas tipo Th2, en respuesta a TsES de diversos estadíos del parásito (Gruden-Movsesijan et al., 2011; Ilic et al., 2011). Sin embargo, es necesario realizar estudios adicionales para identificar si en estos modelos experimentales de vacuna la participación de las células dendríticas determina el perfil mixto de citocinas Th1/Th2. De hecho existe evidencia de que en muchos modelos de vacunas experimentales en contra de helmintos con estadíos intestinales, la respuesta mixta Th1/Th2 pudiera también estar implicada en el proceso de eliminación del parásito (Mulcahy et al., 2005). Por otra parte, la inducción de una respuesta mixta Th1/Th2 también surge como una consecuencia no solo de usar ciertos antígenos derivados del patógeno (i.e. Ag30, Ts87, Ts-Pmy) (Yang et al., 2010b; Cui et al., 2013; Yang et al., 2013); sino también puede ser consecuencia del uso de componentes inmunomodulatorios y/o inmunoestimulatorios que puedan funcionar como adyuvantes o ligandos para moléculas o receptores de la respuesta inmune innata y así amplificar la respuesta antígeno-específica (Reed et al., 2013). El incremento de citocinas Th2, principalmente IL-4, está relacionada con la expulsión del adulto de *T. spiralis*, y niveles disminuídos de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  y de IL-2 están asociados con patología intestinal (Lawrence et al., 1998; 2004; Garside et al., 2000; Scales et al., 2007). De esta manera el balance entre la respuesta Th1 y Th2 en la inducción de la respuesta inducida por la vacunación podría ser requerida con la finalidad de generar menor patología con el mayor grado de protección. En el caso de las cepas vacunales de *Salmonella* se observó la predominancia de Th2, sin embargo una de las limitantes del presente estudio es que no se analizó si se había inducido un proceso patológico en el intestino de los animales inmunizados y de manera comparativa con los controles de infección.

Es importante mencionar que el sistema de expresión de péptidos heterólogos diseñado en el presente trabajo, presenta como inconveniente la disminuída estabilidad del plásmido, ya que se debe de considerar el suministro oral de ampicilina a los animales durante los primeros 5 días del esquema de inmunización, para evitar pérdida del plásmido y de esta manera evitar interferencia con la expresión *in vivo* del péptido heterólogo, después de la inmunización; tal y como se ha descrito previamente (Galen et al., 2010). No obstante, el uso de antibiótico también tiene un impacto negativo sobre la composición de la microbiota intestinal, cuyo equilibrio se pierde, generando un fenómeno de disbiosis intestinal que promueve la colonización de bacterias resistentes a antibiótico y su diseminación sistémica, una vez que atraviesan las barreras epiteliales, en detrimento de la

inmunidad de mucosas del huésped (Kim et al., 2014; Yu et al., 2014a). En contraste, un estudio realizado por Croswell y cols., (2009) demostró que el uso de antibióticos orales, además de perturbar el ecosistema microbiano intestinal en ratones, también puede incidir en la susceptibilidad del huésped al patógeno entérico común, *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. Recientemente, un estudio realizado por Scalfone y cols., (2013) acerca del papel de la microbiota en la inducción temprana de la inmunidad Th2 contra *T. spiralis*, determinó que la disbiosis secundaria al uso de antibióticos no influyó en el proceso de expulsión del parásito y solo tuvo un efecto modesto en la producción de IL-5.

Aparte del empleo de acarreadores bacterianos que exponen en su superficie antígenos heterólogos a través de auto transportadores, recientemente se ha investigado el uso de nuevas tecnologías y más recientemente, la tecnología de fagos para la expresión de antígenos derivados del parásito expresados en la superficie. Cui y cols., (2013) emplearon la tecnología de fagos para expresar el antígeno Tsp10 de la LM de *T. spiralis*, obteniendo una reducción del 62.8% en el número de parásitos adultos (a nivel intestinal) y una reducción del 78.6% en la carga parasitaria de músculo (nivel sistémico). Esta respuesta estuvo asociada con una respuesta mixta Th1/Th2, caracterizada por la producción de IL-4 e IFN- $\gamma$ , con predominancia de la respuesta Th2. Nuestros resultados en términos de la protección a nivel intestinal y de respuesta de citocinas como resultado de la inmunización con las cepas de *Salmonella* transformadas con pAg30, pAg30-Scot y Ag30-p28<sub>3</sub>-SCOT, fue superior a la obtenida por Cui y cols., (2013) con el uso de otras plataformas más recientes para expresar antígenos en la superficie. Con fines comparativos resultaría de gran interés, evaluar la protección conferida con *Salmonella* Ag30-p28<sub>3</sub>-SCOT a nivel sistémico.

En resumen, la protección conferida por la cepa vacunal *Salmonella* pAg30-p28<sub>3</sub>-SCOT es en nuestro conocimiento la más alta hasta ahora obtenida. Sin embargo la vacuna puede implementarse con el uso de otros sistemas de entrega de antígenos y rutas de administración (por ejemplo: la ruta sublingual). También se puede incluir el uso de citocinas Th2 como adyuvantes y la construcción de vacunas polivalentes con epítomos de otras fases del ciclo de vida de *T. spiralis*. Todas estas alternativas representan estrategias importantes para el desarrollo a futuro de una vacuna contra la infección por *T. spiralis* y con aplicación en el campo veterinario.

## CONCLUSIONES

1. La inmunización intranasal de ratones BALB/c empleando *cepas de Salmonella* transformadas con pAg30, pAg30-SCOT y pAg30-p28<sub>3</sub>-SCOT indujo niveles altos de protección (72% a 92.8%) contra la infección por *T. spiralis* a nivel intestinal.
2. Las cepas recombinantes de *Salmonella* indujeron una respuesta inmune mixta Th1/Th2 con predominancia de Th2 (IL-5, IFN- $\gamma$ , IgA e IgG1). Lo anterior demuestra el gran potencial de *Salmonella* como acarreador de antígenos heterólogos para evocar respuestas protectoras en contra parásitos intestinales como *Trichinella spiralis*.
3. La forma secretada de Ag30- P28<sub>3</sub> fue la más inmunogénica. La protección conferida por la cepa vacunal *Salmonella* pAg30-p28<sub>3</sub>-SCOT estuvo relacionada con la producción de IL-5.
4. El adyuvante P28 en múltiples copias puede ser útil en la inducción de inmunidad a nivel de mucosas, siempre y cuando éste se encuentre fusionado al antígeno y libre en su extremo carboxilo, un aspecto que en el presente trabajo solo se logró en su forma secretada.
5. El presente modelo experimental de vacuna basado en el uso de *Salmonella* como acarreador, resulta de gran utilidad como una plataforma para futuras propuestas de vacunación que requieran de la secreción *in vivo* de uno o varios antígenos de *T. spiralis* o de algún otro helminto.
6. La sola secreción de Ag30 fusionado o no al adyuvante molecular P28, contribuye de manera importante a la producción de IgA intestinal, la cual reconoce directamente a los antígenos presentes en la larva muscular de *T. spiralis*.



## PERSPECTIVAS

- Se requieren estudios adicionales que permitan evaluar en el intestino el microambiente de citocinas posterior al reto en animales vacunados para determinar la contribución del parásito en la respuesta evocada por el vehículo vacunal.
- También es necesario conocer el papel de otras citocinas (IL-17, IL-9, IL-4, IL-13, IL-25) durante el esquema de inmunización, lo cual podría contribuir al conocimiento del potencia que puede tener *Salmonella* recombinante en la inducción de la respuesta contra *T. spiralis*.
- Si bien la IgA intestinal evocada por las diferentes cepas de *Salmonella* que expresan y/o secretan Ag30 fue capaz de reconocer antígenos nativos en la superficie de la LM de *T. spiralis*; es necesario realizar más estudios acerca de su papel efector, especialmente en el establecimiento del parásito en el nicho intestinal y en la tasa de fecundidad.
- Se requieren estudios adicionales que permitan evaluar la contribución de la inmunidad a nivel intestinal en la disminución del número de parásitos que llegan a establecerse a nivel de músculo.

## APÉNDICE

Condiciones de la PCR empleadas en el presente trabajo.

Ronda de PCR	Oligonucleótidos (20 pmol)	Templado (ng)	Componentes de la reacción	Termociclado
PCR <sub>1</sub>	P28-1 P28-2	No aplica	3 µL de amortiguador de reacción (10X), 0.75 µL de MgCl <sub>2</sub> (50 mM), 0.5 µL de mezcla de dNTP's (10 mM), 0.15 µL de enzima termoestable Taq polimerasa (5 U/µL) y agua inyectable (c.b.p. 30 µL).	94°C , 3 min; 30 ciclos (94°C,15 s; 66°C, 30 s; 72°C, 1 min;) 72°C, 10 min.
PCR <sub>2</sub>	P28a P28b	templado p28	3 µL de amortiguador de reacción (10X), 0.75 µL de MgCl <sub>2</sub> (50 mM), 0.5 µL de mezcla de dNTP's (10 mM), 0.15 µL de enzima termoestable Taq polimerasa (5 U/µL) y agua inyectable (c.b.p. 30 µL).	94°C , 3 min; 30 ciclos (94°C, 15 s; 65.3°C, 30 s; 72°C, 1 min;) 72°C, 10 min.
PCR <sub>3</sub>	P28c P28d	templado p28	3 µL de amortiguador de reacción (10X), 0.75 µL de MgCl <sub>2</sub> (50 mM), 0.5 µL de mezcla de dNTP's (10 mM), 0.15 µL de enzima termoestable Taq polimerasa (5 U/µL) y agua inyectable (c.b.p. 30 µL).	94°C , 3 min; 30 ciclos (94°C,15 s; 65.4°C, 30 s; 72°C, 1 min;) 72°C, 10 min.
PCR <sub>4</sub>	P28e P28f	templado p28	3 µL de amortiguador de reacción (10X), 0.75 µL de MgCl <sub>2</sub> (50 mM), 0.5 µL de mezcla de dNTP's (10 mM), 0.15 µL de enzima termoestable Taq polimerasa (5 U/µL) y agua inyectable (c.b.p. 30 µL).	94°C , 3 min; 30 ciclos (94°C,15 s; 65.5°C, 30 s; 72°C, 1 min;) 72°C, 10 min.

## APÉNDICE

### Condiciones de la PCR empleadas en el presente trabajo (continuación).

Ronda de PCR	Oligonucleótidos (20 pmol)	Templado (ng)	Componentes de la reacción	Termociclado
PCR <sub>5</sub>	Null-SEQ-1 Null-CDS-2	(15 ng) pRL-null-p28 <sub>3</sub>	3 µL de amortiguador de reacción (10X), 5 µL de MgCl <sub>2</sub> (50 mM), 0.5 µL de mezcla de dNTP's (10 mM), 0.15 µL de enzima termoestable <i>Taq</i> polimerasa (5 U/µL) y agua inyectable (c.b.p. 30 µL).	94°C , 3 min; 30 ciclos (94°C,15 s; 65.4°C, 30 s; 72°C, 1 min;) 72°C, 10 min.
PCR <sub>6</sub>	Scot E-1* Scot E2*	No aplica	200 pmol de cada oligonucleótido, 100 µL de MgCl <sub>2</sub> (100 µM), agua inyectable (c.b.p. 100 µL).	94°C, 15 min Enfriamiento lento hasta T.A.
PCR <sub>7</sub>	pNIR ó shdA-R (para cada reacción)	10 ng del producto purificado de PCR	3.5 µL de amortiguador-mezcla de reacción (3.5X), 0.5 µL de Big dye (BDT), 10 pmol de oligonucleótido (pNIR ó ShdA) y agua inyectable (c.b.p. 10 µL).	25 ciclos (94°C, 30 s; 50°C, 15 s; 60°C, 4 min)
PCR <sub>8</sub>	FLAG-SEQ-1 ShdA-Rv	20 ng de cada uno de los plásmidos	3 µL de amortiguador de reacción (10X), 5 µL de MgCl <sub>2</sub> (50 mM), 0.5 µL de mezcla de dNTP's (10 mM), 0.15 µL de enzima termoestable <i>Taq</i> polimerasa (5 U/µL) y agua inyectable (c.b.p. 30 µL).	94°C , 3 min; 30 ciclos (94°C,15 s; 56°C, 30 s; 72°C, 1 min;) 72°C, 10 min.

\*En esta reacción, se utilizó una concentración de primers distinta de 20 pmol/µL.

## REFERENCIAS

- Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. 2012. Inmunología celular y molecular. Séptima edición. Elsevier Saunders.
- Acuerdo por el que se establece la clasificación y prescripción de los productos farmacéuticos veterinarios por el nivel de riesgo de sus ingredientes activos. Publicado en el Diario Oficial de la Federación el 12 de julio de 2004. Disponible en: <http://www.sagarpa.gob.mx/ganaderia/Publicaciones/Lists/Publicaciones%20Zoosanitarias/Attachments/5/acufarmavet120704.pdf>
- Agyei-Frempong M, Catty D. 1983. The measurement of antigens released by radiation-attenuated *Trichinella spiralis* larvae. *Parasite Immunol.* 5(3):289-303.
- Alaniz RC, Deatherage BL, Lara JC, Cookson BT. 2007. Membrane vesicles are immunogenic faccsimiles of *Salmonella typhimurium* that potently activate dendritic cells, prime B and T cell responses, and stimulate protective immunity in vivo. *179(11): 7692-7701.*
- Anderson R, Dougan G, Roberts M. 1996. Delivery of the Pertactin/P.69 polypeptide of *Bordetella pertussis* using an attenuated *Salmonella typhimurium* vaccine strain: expression levels and immune response. *Vaccine.* 14(14):1384-90.
- Angkasekwina P, Srimanote P, Wang YH, Pootong A, Sakolvaree Y, Pattanapanyasat K, Chaicumpa W, Chaiyaraj S, Dong C. 2013. Interleukin-25 (IL-25) promotes efficient protective immunity against *Trichinella spiralis* infection by enhancing the antigen-specific IL-9 response. *Infect Immun.* 81(10):3731-3741.
- Appleton JA, Bell RG, Homan W, van Knapen F. 1991. Consensus on *Trichinella spiralis* antigens and antibodies. *Parasitology Today.* 7: 190-192.
- Appleton JA, Romaris F. 2001. A pivotal role for glycans at the interface between *Trichinella spiralis* and its host. *Vet Parasitol.* 101(3-4):249-260.
- Arriaga C, Yépez-Mulia L, Viveros N, Adame LA, Zarlenga DS, Lichtenfels JR, Benitez E, Ortega-Pierres, MG, 1995. Detection of *Trichinella spiralis* muscle larvae in naturally infected horses. *J. Parasitol.* 81, 781–783
- Ashour DA. 2013. *Trichinella spiralis* immunomodulation: an interactive multifactorial process. *Expert Rev. Clin. Immunol.* 9(7), 669–675.
- Ault A, Tennant SM, Gorres JP, Eckhaus M, Sandler NG, Roque A, Livio S, Bao S, Foulds KE, Kao SF, Roederer M, Schmidlein P, Boyd MA, Pasetti MF, Douek DC, Estes JD, Nabel GJ, Levine MM, Rao SS. 2013. Safety and tolerability of a live oral *Salmonella typhimurium* vaccine candidate in SIV-infected nonhuman primates. *Vaccine,* 31(49):5879-5888.
- Baneyx F. 1999. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol.* 10(5):411-421.
- Bao S, Beagley KW, Murray AM, Caristo V, Matthaei KI, Young IG, Husband AJ. 1998. Intestinal IgA plasma cells of the B1 lineage are IL-5 dependent. *Immunology.* 94(2):181-188.

- Barat S, Willer Y, Rizos K, Claudi B, Mazé A, Schemmer AK, Kirchhoff D, Schmidt A, Burton N, Bumann D. 2012. Immunity to intracellular *Salmonella* depends on surface-associated antigens. *PLoS Pathogens*, 8(19): e1002966.
- Barry EM, Altboum Z, Losonsky G, Levine MM. 2003. Immune responses elicited against multiple enterotoxigenic *Escherichia coli* fimbriae and mutant LT expressed in attenuated *Shigella* vaccine strains. *Vaccine*, 21(5-6):333-340.
- Beiting DP, Bliss SK, Schlafer DH, Roberts VL, Appleton JA. 2004. Interleukin-10 limits local and body cavity inflammation during infection with muscle-stage *Trichinella spiralis*. *Infect Immun*. 72(6):3129-3137.
- Beiting DP, Park PW, Appleton JA. 2006. Synthesis of syndecan-1 by skeletal muscle cells is an early response to infection with *Trichinella spiralis* but is not essential for nurse cell development. *Infect Immun*. 74(3):1941-1943.
- Beiting DP, Gagliardo LF, Hesse M, Bliss SK, Meskill D, Appleton JA. 2007. Coordinated control of immunity to muscle stage *Trichinella spiralis* by IL-10, regulatory T cells, and TGF-beta. *J Immunol*. 178(2):1039–1047.
- Bell RG, Adams LS, Ogden RW. 1984. *Trichinella spiralis*: genetics of worm expulsion in inbred and F1 mice infected with different worm doses. *Exp Parasitol*. 58(3):345-355.
- Ben-Smith A, Wahid FN, Lammas DA, Behnke JM. 1999. The relationship between circulating and intestinal *Heligmosomoides polygyrus*-specific IgG1 and IgA and resistance to primary infection. *Parasite Immunol*. 21(8): 383-395.
- Bergmann-Leitner ES, Leitner WW, Tsokos GC. 2006. Complement 3d: from molecular adjuvant to target of immune escape mechanisms. *Clin Immunol*. 121(2):177-185.
- Bergmann-Leitner ES, Duncan EH, Leitner WW, Neutzner A, Savranskaya T, Angov E, Tsokos GC. 2007. C3d-defined complement receptor-binding peptide p28 conjugated to circumsporozoite protein provides protection against *Plasmodium berghei*. *Vaccine*. 25(45):7732-7736.
- Berthony J, Brooker S, Albonico M, Geiger SM, Loukas A, Diemert D, Hotez PJ. 2006. Soil-transmitted helminth infections: ascariasis, trichuriasis, and hookworm. *Lancet*. 367(9521):1521-1532.
- Blum LK, Mohanan S, Fabre MV, Yafawi RE, Appleton JA. 2013. Intestinal infection with *Trichinella spiralis* induces distinct, regional immune responses. *Vet Parasitol*. 194(2-4):101-105.
- Boireau P, Vayssier M, Fabien JF, Perret C, Calamel M, Soulé C. 1997. Characterization of eleven antigenic groups in *Trichinella* genus and identification of stage and species markers. *Parasitology*. 115 (Pt 6):641-651.
- Bolas-Fernández F. 2003. Biological variation in *Trichinella* species and genotypes. *J Helminthol*. 77(2):111-118.
- Bolás-Fernández F, Corral Bezara LD. 2006. TSL-1 antigens of *Trichinella*: an overview of their potential role in parasite invasion, survival and serodiagnosis of trichinellosis. *Res Vet Sci*. 81(3):297-303.

- Bonnington KE, Kuehn MJ. 2014. Protein selection and export via outer membrane vesicles. *Biochim Biophys Acta*. 1843(8):1612-1619.
- Bower JF, Ross TM. 2006. A minimum CR2 binding domain of C3d enhances immunity following vaccination. *Adv Exp Med Biol*. 586: 249-264.
- Brandtzaeg P, Johansen FE. 2005. Mucosal B cells: phenotypic characteristics, transcriptional regulation, and homing properties. *Immunol Rev*. 206:32-63.
- Bruschi F, Murrell KD. 2002. New aspects of human trichinellosis: the impact of new *Trichinella* species. *Postgrad Med J*. 78(915): 15-22.
- Bruschi F, Korenaga M, Watanabe N. 2008. Eosinophils and *Trichinella* infection: toxic for the parasite and the host? *Trends Parasitol*, 24(10):462-467.
- Bruschi F, Chiumiento L. 2011. *Trichinella* inflammatory myopathy: host or parasite strategy? *Parasit Vectors*. 4:42.
- Bruschi F, Dupoy-Camet J. 2014. Chapter 8. Trichinellosis. EN: Bruschi F. *Helminth Infections and their Impact on Global Public Health*. Springer. ISBN: 978-3-7091-1781-1. pp. 229-273.
- Bumann D, Hueck C, Aebischer T, Meyer TF. 2000. Recombinant live *Salmonella spp.* for human vaccination against heterologous pathogens. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 27(4):357-364.
- Bumann D. 2001. Regulated antigen expression in live recombinant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strongly affects colonization capabilities and specific CD4(+)-T-cell responses. *Infect Immun*. 69(12):7493-7500.
- Bumann D, Behre C, Behre K, Herz S, Gewecke B, Gessner JE, von Specht BU, Baumann U. 2010. Systemic, nasal and oral live vaccines against *Pseudomonas aeruginosa*: a clinical trial of immunogenicity in lower airways of human volunteers. *Vaccine*, 28(3):707–713.
- Cabral-Soto J, Villicaña-Fuentes H, Fragoso-Urbe R, Contreras A. 1990. Perfil epidemiológico de la triquinosis en el estado de Zacatecas. *Salud Pública Mex*. 32(5): 575-582.
- Capó V, Despommier DD. 1996. Clinical aspects of infection with *Trichinella spp.* *Clin Microbiol Rev*. 9(1):47-54.
- Capó VA, Despommier DD, Polvere RI. 1998. *Trichinella spiralis*: vascular endothelial growth factor is up-regulated within the nurse cell during the early phase of its formation. *J Parasitol*. 84(2):209-214.
- Cárdenas L, Clements JD. 1992. Oral immunization using live attenuated *Salmonella spp.* as carriers of foreign antigens. *Clin Microbiol Rev*, 5(3):328-342.
- Carlisle MS, McGregor DD, Appleton JA. 1991. The role of the antibody Fc region in rapid expulsion of *Trichinella spiralis* in suckling rats. *Immunology*. 74(3):552-558.
- Carroll MC. 2004. The complement system in regulation of adaptive immunity. *Nat Immunol*. 5(10):981-986.
- Carroll MC. 2008. Complement and humoral immunity. *Vaccine*. 26 Suppl 8: 128-133.

- Carter RH, Fearon DT. 1992. CD19: Lowering the threshold for antigen receptor stimulation of B lymphocytes. *Science* 256: 105-107.
- Castillo Alvarez AM, Vaquero-Vera A, Fonseca-Liñán R, Ruiz-Pérez F, Villegas-Sepúlveda N, Ortega-Pierres G. 2013. A prime-boost vaccination of mice with attenuated *Salmonella* expressing a 30-mer peptide from the *Trichinella spiralis* gp43 antigen. *Vet Parasitol*, 194(2-4):202-206.
- Cerutti A, Cols M, Gentile M, Cassis L, Barra CM, He B, Puga I, Chen K. 2011. Regulation of mucosal IgA responses: lessons from primary immunodeficiencies. *Ann N Y Acad Sci.* 1238:132-44.
- Cervera-Castillo H, Torres-Caballero V, Martínez-García E, Blanco-Favela F. 2009. Triquinosis humana. Un caso que simula poliomiocitosis. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc.* 47 (3): 323-326.
- Chatfield SN, Charles IG, Makoff AJ, Oxeer MD, Dougan G, Pickard D, Slater D, Fairweather NF. 1992. 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 (N Y).* 10(8): 888-892.
- Chatfield SN, Roberts M, Dougan G, Hormaeche C, Khan CM. 1995. The development of oral vaccines against diseases utilizing live attenuated *Salmonella*. *Parasitology.* 110 Suppl: S17-S24.
- Chatfield y Dougan, 1997. Attenuated *Salmonella* as a live vector for expression of foreign antigens. En: Levine MM, Woodrow GC, Kaper JB, Cobon GS, editors, *New Generation Vaccines*, 2nd edn. New York: Marcel Dekker. pp. 331-341.
- Cheminay C, Hensel M. Rational design of *Salmonella* recombinant vaccines. 2008. *Int J Med Microbiol.* 298(1-2):87-98.
- Chen H, Schifferli DM. 2007. Comparison of a fimbrial versus an autotransporter display system for viral epitopes on an attenuated *Salmonella* vaccine vector. *Vaccine.* 25(9):1626-1633.
- Chen K, Cerutti A. 2010. Vaccination strategies to promote mucosal antibody responses. *Immunity.* 33(4): 479-491.
- Chen Z, Cao J, Liao X, Ke J, Zhu S, Zhao P, Qi Z. 2011. Plasmids enriched with CpG motifs activate human peripheral blood mononuclear cells in vitro and enhance th-1 immune responses to hepatitis B surface antigen in mice. *Viral Immunol.* 24(3):199-209.
- Cherukuri A, Cheng PC, Pierce SK. 2001. The role of the CD19/CD21 complex in B cell processing and presentation of complement-tagged antigens. *J Immunol.* 167(1):163-172.
- Choi JH, Lee SY. 2004. Secretory and extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 64(5): 625-635.
- Church SE, Jensen SM, Twitty CG, Bahjat K, Hu HM, Urba WJ, Fox BA. 2011. Multiple vaccinations: friend or foe. *Cancer J.* 2011 17(5):379-396.
- Clemenza L, Isenman DE. 2000. Structure-guided identification of C3d residues essential for its binding to complement receptor 2 (CD21). *J Immunol.* 65(7): 3839-3848.

- Coban C, Kobiyama K, Takeshita F, Horii T, Akira S, Ishii KJ. 2011. Novel strategies to improve DNA vaccine immunogenicity. *Curr Gen Ther*. 11(6):479-484.
- Cooper ES, Whyte-Alleng CA, Finzi-Smith JS, MacDonald TT. 1992. Intestinal nematode infections in children: the pathophysiological price paid. *Parasitology*. 104 suppl: S91-S103.
- Crompton DW, Nesheim MC. 2002. Nutritional impact of intestinal helminthiasis during the human life cycle. *Annu Rev Nutr*. 22:35-59.
- Cui J, Wang ZQ. 2011. An epidemiological overview of swine trichinellosis in China. *Vet J*. 190(3):323-328.
- Cui J, Wang ZQ, Xu BL. 2011. The epidemiology of human trichinellosis in China during 2004-2009. *Acta Trop*. 118(1):1-5.
- Cui J, Ren HJ, Liu RD, Wang L, Zhang ZF, Wang ZQ. 2013. Phage-displayed specific polypeptide antigens induce significant protective immunity against *Trichinella spiralis* infection in BALB/c mice. *Vaccine*, 31(8):1171-1177.
- Curtiss R 3rd, Xin W, Li Y, Kong W, Wanda SY, Gunn B, Wang S. 2010. New technologies in using recombinant attenuated *Salmonella* vaccine vectors. *Crit Rev Immunol*, 30(3):255-270.
- Croswell A, Amir E, Tegatz P, Barman M, Salzman NH. 2009. Prolonged impact of antibiotics on intestinal microbial ecology and susceptibility to enteric *Salmonella* infection. *Infect Immun*. 77(7):2741-2753.
- Dabrowska M, Skoneczny M, Zielinski Z, Rode W. 2008. Nurse cell of *Trichinella spp.* as a model of long-term cell cycle arrest. *Cell Cycle*. 7(14):2167-2178.
- Daleke-Schermerhorn MH, Felix T, Soprova Z, Ten Hagen-Jongman CM, Vikström D, Majlessi L, Beskers J, Follmann F, de Punder K, van der Wel NN, Baumgarten T, Pham TV, Piersma SR, Jiménez CR, van Ulsen P, de Gier JW, Leclerc C, Jong WS, Luirink J. 2014. Decoration of outer membrane vesicles with multiple antigens using autotransporter approach. *Appl Environ Microbiol*, *In press*.
- Dalton JP, Brinley PJ, Knox DP, Brady CP, Hotez PJ, Donnelly S, O'Neill SM, Mulcahy G, Loukas A. 2003. Helminth vaccines: from mining genomic information for vaccine targets to systems used for protein expression. *Int J Parasitol*. 33(5-6): 621-640
- Darwish RA, Sanad MM, Youssef SM. 1996. Immunization against *Trichinella spiralis* using antigens from different life-cycle stages experimental study in mice. *J Egypt Soc Parasitol*, 26(1):19-26.
- Dawicki W, Marshall JS. 2007. New and emerging roles for mast cells in host defence. *Curr Opin Immunol*. 19(1):31-38.
- Dea-Ayuela MA, Bolas-Fernández F. 1999. *Trichinella* antigens: a review. *Vet Res*. 30(6):559-571.
- Dea-Ayuela MA, Rama-Iñiguez S, Torrado-Santiago S, Bolas-Fernandez F. 2006. Microcapsules formulated in the enteric coating copolymer Eudragit L100 as delivery systems for oral vaccination against infections by gastrointestinal nematode parasites. *J Drug Target*, 14(8):567-75.



- Diawara A, Halpenny CM, Churcher TS, Mwandawiro C, Kihara J, Kaplan RM, Streit TG, Idaghdour Y, Scott ME, Basáñez MG, Prichard RK. 2013. Association between response to albendazole treatment and  $\beta$ -tubulin genotype frequencies in soil-transmitted helminths. *PLoS Negl Trop Dis*. 7(5): e2247.
- Dempsey PW, Allison ME, Akkaraju S, Goodnow CC, Fearon DT. 1996. C3d of complement as a molecular adjuvant: bridging innate and acquired immunity. *Science*. 271(5247):348-350.
- Dennis DT, Despommier DD, Davis N. 1970. Infectivity of the newborn larva of *Trichinella spiralis* in the rat. *J Parasitol*. 56(5):974-977.
- Denkers EY, Wassom DL, Krco CJ, Hayes CE. 1990. The mouse antibody response to *Trichinella spiralis* defines a single, immunodominant epitope shared by multiple antigens. *J Immunol*. 144(8):3152-3159.
- Despommier D. 1975. Adaptive changes in muscle fibers infected with *Trichinella spiralis*. *Am J Pathol*. 78(3):477-496.
- Despommier D, Aron L, Turgeon L. 1975. *Trichinella spiralis*: growth of the intracellular (muscle) larva. *Exp Parasitol*. 37(1):108-116.
- Despommier, DD. 1983. Biology, p. 75-142. In W.C. Campbell (ed.), *Trichinella* and trichinosis. Plenum Press, New York.
- Despommier DD, Gold AM, Buck SW, Capo V, Silberstein D. 1990. *Trichinella spiralis*: secreted antigen of the infective L1 larva localizes to the cytoplasm and nucleoplasm of infected host cells. *Exp Parasitol*. 71(1):27-38.
- Despommier DD. 1993. *Trichinella spiralis* and the concept of niche. *J Parasitol*. 79(4):472-482.
- Despommier DD. 1998. How does *Trichinella spiralis* make itself at home? *Parasitol Today*. 14(8):318-323.
- Ding J, Zheng Y, Wang Y, Dou Y, Chen X, Zhu X, Wang S, Zhang S, Liu Z, Hou J, Zhai J, Yan H, Luo X, Cai X. 2013. Immune responses to a recombinant attenuated *Salmonella typhimurium* strain expressing a *Taenia solium* oncosphere antigen TSOL18. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 36(1):17-23.
- Dupouy-Camet J. 2000. Trichinellosis: a worldwide zoonosis. *Vet Parasitol*. 93(3-4):191-200.
- Dupouy-Camet J, Paugam A, De Pinieux G, Lavarde V, Vieillefond A. 2001. *Trichinella murrelli*: pathological features in human muscles at different delays after infection. *Parasite*. 8 (Suppl 2):S176-179.
- Dupouy-Camet J, Kociecka W, Bruschi F, Bolas-Fernandez F, Pozio E. 2002. Opinion on the diagnosis and treatment of human trichinellosis. *Expert Opin Pharmacother*. 3:1117-1130.
- Dupouy-Camet J, Bruschi F 2007. Management and diagnosis of human trichinellosis. En: Dupouy-Camet J, Murrell KD, editors. *FAO/WHO/OIE guidelines for the surveillance, management, prevention and control of trichinellosis*. Paris: World Organisation for Animal Health; 2007. p. 37-68.
- Egli A, Santer D, Barakat K, Zand M, Levin A, Vollmer M, Weisser M, Khanna N, Kumar D, Tyrrell L, Houghton M, Battegay M, O'Shea D. 2014. Vaccine adjuvants: understanding molecular mechanisms to improve vaccines. *Swiss Med Wkly*. 144:w13940.

- Ellis LA, Reason AJ, Morris HR, Dell A, Iglesias R, Ubeira FM, Appleton JA. 1994. Glycans as targets for monoclonal antibodies that protect rats against *Trichinella spiralis*. *Glycobiology*. 4(5):585-592.
- el-Shazly AM, el-Shewey K, el-Hamshary E, Habib FS, el-Garhy MF, Morsy TA. 2002. Mice immunization using crude *Trichinella spiralis* antigen. *J Egypt Soc Parasitol*. 32(2):391-403.
- Emery DL, McClure SJ, Wagland BM. 1993. Production of vaccines against gastrointestinal nematodes of livestock. *Immunol Cell Biol*. 71 (Pt 5):463-472.
- Fabre MV, Beiting DP, Bliss SK, Appleton JA. 2009a. Immunity to *Trichinella spiralis* muscle infection. *Vet Parasitol*. 159(3-4):245-258.
- Fabre V, Beiting DP, Bliss SK, Gebreselassie NG, Gagliardo LF, Lee NA, Lee JJ, Appleton JA. 2009b. Eosinophil deficiency compromises parasite survival in chronic nematode infection. *J Immunol*. 182(3):1577-1583.
- Fang Y, Xu C, Fu YX, Holers VM, Molina H. 1998. Expression of complement receptors 1 and 2 on follicular dendritic cells is necessary for the generation of a strong antigen-specific IgG response. *J Immunol*. 160(11):5273-5279.
- Fang L, Sun L, Yang J, Gu Y, Zhan B, Huang J, Zhu X. 2014. Heat shock protein 70 from *Trichinella spiralis* induces protective immunity in BALB/c mice by activating dendritic cells. *Vaccine*. 32(35):4412-4419.
- Fearon DT, Carter RH. 1995. The CD19/CR2/TAPA-1 complex of B lymphocytes: linking natural to acquired immunity. *Annu Rev Immunol*. 13:127-149.
- Feng S, Wu X, Wang X, Bai X, Shi H, Tang B, Liu X, Song Y, Boireau P, Wang F, Zhao Y, Liu M. 2013. Vaccination of mice with an antigenic serine protease-like protein elicits a protective immune response against *Trichinella spiralis* infection. *J Parasitol*, 99(3):426-432.
- Finkelman FD, Shea-Donohue T, Morris SC, Gildea L, Strait R, Madden KB, Schopf L, Urban JF Jr. 2004. Interleukin-4- and interleukin-13-mediated host protection against intestinal nematode parasites. *Immunol Rev*. 201:139-155.
- Fleming SD, Shea-Donohue T, Guthridge JM, Kulik L, Waldschmidt TJ, Gipson MG, Tsokos GC, Holers VM. 2002. Mice deficient in complement receptors 1 and 2 lack a tissue injury-inducing subset of the natural antibody repertoire. *J Immunol*. 169(4):2126-2133.
- Forbes LB, Scandrett WB, Gajadhar AA. 2005. A program to accredit laboratories for reliable testing of pork and horse meat for *Trichinella*. *Vet Parasitol* 132(1-2):173-177
- Fourestie V, Douceron H, Brugieres P, Ancelle T, Lejonc JL, Gherardi RK. 1993. Neurotrichinosis. A cerebrovascular disease associated with myocardial injury and hypereosinophilia. *Brain*. 116 (Pt 3):603-616.
- Francis JN, Larché M. 2005. Peptide-based vaccination: where do we stand? *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 5(6):537-543.
- Fröscher W, Gullotta F, Saathoff M, Tackmann W. 1988. Chronic trichinosis. Clinical, bioptic, serological and electromyographic observations. *Eur Neurol*. 28(4):221-226.

- Fu Y, Wang W, Tong J, Pan Q, Long Y, Qian W, Hou X. 2009. Th17: a new participant in gut dysfunction in mice infected with *Trichinella spiralis*. *Mediators Inflamm.* 2009:517052
- Gagliardo LF, McVay CS, Appleton JA. 2002. Molting, ecdysis, and reproduction of *Trichinella spiralis* are supported in vitro by intestinal epithelial cells. *Infect Immun.* 70(4):1853-1859.
- Galen JE, Gomez-Duarte OG, Losonsky GA, Halpern JL, Lauderbaugh CS, Kaintuck S, Reymann MK, Levine MM. 1997. 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.* 15(6-7):700-708.
- Galen JE, Pasetti MF, Tennant S, Ruiz-Olvera P, Sztejn MB, Levine MM. 2009. *Salmonella enterica* serovar Typhi live vector vaccines finally come of age. *Immunol Cell Biol.* 87(5):400-412.
- Galen JE, Wang JY, Chinchilla M, Vindurampulle C, Vogel JE, Levy H, Blackwelder WC, Pasetti MF, Levine MM. 2010. A new generation of stable, nonantibiotic, low-copy-number plasmids improves immune responses to foreign antigens in *Salmonella enterica* serovar Typhi live vectors. *Infect Immun.* 78(1):337-347.
- Galen JE, Curtiss R 3rd. 2014. The delicate balance in genetically engineering live vaccines. *Vaccine.* 32(35):4376-4385.
- Gamble HR, Bessonov AS, Cuperlovic K, Gajadhar AA, van Knapen F, Nöeckler K, Schenone H, Zhu X. 2000. International Commission on Trichinellosis: recommendations on methods for the control of *Trichinella* in domestic and wild animals intended for human consumption. *Vet Parasitol.* 93(3-4):393-408.
- Gamble HR, Boireau P, Nöckler K, Kapel CMO. 2007. Prevention of *Trichinella* infection in the domestic pig. In: Dupouy-Camet J, Murrell KD (eds) FAO/WHO/OIE guidelines for the surveillance, management, prevention and control of trichinellosis. World Organisation for Animal Health Press, Paris, pp 101–110
- Garmory HS, Titball RW, Griffin KF, Hahn U, Böhm R, Beyer W. 2003. *Salmonella enterica* serovar typhimurium expressing a chromosomally integrated copy of the *Bacillus anthracis* protective antigen gene protects mice against an anthrax spore challenge. *Infect Immun.* 71(7):3831-3836.
- Garside P, Kennedy MW, Wakelin D, Lawrence CE. 2000. Immunopathology of intestinal helminth infection. *Parasite Immunol.* 22(12):605-612.
- Gelal F, Kumral E, Dirim Vidinli B, Erdogan D, Yucel K, Erdogan N. 2004. Diffusion-weighted and conventional MR imaging in neurotrichinosis. *Acta Radiol.* 46(2): 196-199.
- Geldhof P, De Maere V, Vercruyssen J, Claerebout E. 2007. Recombinant expression systems: the obstacle to helminth vaccines? *Trend parasitol.* 23(11): 527-532.
- Gentschev I, Dietrich G, Spreng S, Kolb-Mäurer A, Brinkmann V, Grode L, Hess J, Kaufmann SH, Goebel W. 1995. *Infect Immun.* 63(10): 4202-4205.
- Gómez-Duarte OG, Pasetti MF, Santiago A, Sztejn MB, Hoffman SL, Levine MM. 2001. Expression, extracellular secretion, and immunogenicity of the *Plasmodium falciparum* sporozoite surface protein 2 in *Salmonella* vaccine strains. *Infect Immun.* 69(2):1192-1198.

- Gonzalez C, Hone D, Noriega FR, Tacket CO, Davis JR, Losonsky G, Nataro JP, Hoffman S, Malik A, Nardin E, Sztein MB, Heppner DG, Fouts TR, Isibasi A, Levine MM. 1994. *Salmonella typhi* vaccine strain CVD 908 expressing the circumsporozoite protein of *Plasmodium falciparum*: strain construction and safety and immunogenicity in humans. *J Infect Dis*, 169(4): 927-931.
- Gottstein B, Pozio E, Nöckler K. 2009. Epidemiology, diagnosis, treatment, and control of trichinellosis. *Clin Microbiol Rev*. 22(1):127-145.
- Goyal PK, Wheatcroft J, Wakelin D. 2002. Tyvelose and protective responses to the intestinal stages of *Trichinella spiralis*. *Parasitol Int*. 51(1):91-98.
- Green TD, Newton BR, Rota PA, Xu Y, Robinson HL, Ross TM. 2002. C3d enhancement of neutralizing antibodies to measles hemagglutinin. *Vaccine*. 20(1-2):242-248.
- Grencis RK, Hültner L, Else KJ. 1991. Host protective immunity to *Trichinella spiralis* in mice: activation of Th cell subsets and lymphokine secretion in mice expressing different response phenotypes. *Immunology*. 74(2):329-332.
- Grencis RK. 1997. Th2-mediated host protective immunity to intestinal nematode infection. *Phil Trans R Soc Lond B*. 352: 1377-1384.
- Gruden-Movsesijan A, Milosavljevic LJS. 2006. The involvement of the macrophage mannose receptor in the innate immune response to infection with parasite *Trichinella spiralis*. *Vet Immunol Immunopathol*. 109(1-2):57-67.
- Gruden-Movsesijan A, Ilic N, Colic M, Majstorovic I, Vasilev S, Radovic I, Sofronic-Milosavljevic Lj. 2011. The impact of *Trichinella spiralis* excretory-secretory products on dendritic cells. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 34(5):429-439.
- Gu Y, Li J, Zhu X, Yang J, Li Q, Liu Z, Yu S, Li Y. 2008. *Trichinella spiralis*: characterization of phage-displayed specific epitopes and their protective immunity in BALB/c mice. *Exp Parasitol*, 118(1):66-74.
- Gu Y, Wei J, Yang J, Huang J, Yang X, Zhu X. 2013. Protective immunity against *Trichinella spiralis* infection induced by a multi-epitope vaccine in a murine model. *PLoS One*. 8(10):e77238.
- Guo CC, Ding J, Pan BR, Yu ZC, Han QL, Meng FP, Liu N, Fan DM. 2003. Development of an oral DNA vaccine against MG7-Ag of gastric cancer using attenuated *Salmonella typhimurium* as carrier. *World J Gastroenterol*. 9(6):1191-1195.
- Gurish MF, Bryce PJ, Tao H, Kisselgof AB, Thornton EM, Miller HR, Friend DS, Oettgen HC. 2004. IgE enhances parasite clearance and regulates mast cell responses in mice infected with *Trichinella spiralis*. *J Immunol*. 172(2): 1139-1145.
- Gustafsson C, Govindarajan S, Minshull J. 2004. Codon bias and heterologous protein expression. *Trends Biotechnol*. 22(7):346-353.
- Guy B. 2007. The perfect mix: recent progress in adjuvant research. *Nat Rev Microbiol*. 5(7):505-517.

- Hahn HP, von Specht BU. 2003. Secretory delivery of recombinant proteins in attenuated *Salmonella* strains: potential and limitations of Type I protein transporters. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 37(2-3):87-98.
- Hanke C, Hess J, Schumacher G, Goebel W. 1992. Processing by OmpT of fusion proteins carrying the HlyA transport signal during secretion by the *Escherichia coli* hemolysin transport system. *Mol Gen Genet.* 233(1-2):42-8.
- Hannan JP, Young KA, Guthridge JM, Asokan R, Szakonyi G, Chen XS, Holers VM. 2005. Mutational analysis of the complement receptor type 2 (CR2/CD21)-C3d interaction reveals a putative charged SCR1 binding site for C3d. *J Mol Biol.* 346(3): 845-858.
- Harris N, Gause WC. 2011. To B or not to B: B cells and the Th2-type immune response to helminths. *Trends Immunol.* 32(2):80-88.
- Harris NL. 2011. Advances in helminth immunology: optimism for future vaccine design? *Trends Parasitol.* 27(7):288-293.
- Hashizume T, Togawa A, Nochi T, Igarashi O, Kweon MN, Kiyono H, Yamamoto M. 2008. Peyer's patches are required for intestinal immunoglobulin A responses to *Salmonella* spp. *Infect Immun.* 76(3):927-934.
- Helmby H, Grecis RK. 2002. IL-18 regulates intestinal mastocytosis and Th2 cytokine production independently of IFN-gamma during *Trichinella spiralis* infection. *J Immunol.* 169(5):2553-2560.
- Henderson IR, Navarro-Garcia F, Nataro JP. 1998. The great escape: structure and function of the autotransporter proteins. *Trends Microbiol,* 6(9):370-378.
- Hess J, Gentschev I, Miko D, Welzel M, Ladel C, Goebel W, Kaufmann SH. 1996. Superior efficacy of secreted over somatic antigen display in recombinant *Salmonella* vaccine induced protection against listeriosis. *Proc Natl Acad Sci USA,* 93(4): 1458-1463.
- Hess J, Grode L, Gentschev I, Fensterle J, Dietrich G, Goebel W, Kaufmann SH. 2000. Secretion of different listeriolysin cognates by recombinant attenuated *Salmonella typhimurium*: superior efficacy of haemolytic over non- haemolytic constructs after oral vaccination. *Microbes Infect,* 2(15): 1799-1806.
- Hewitson JP, Maizels RM. 2014. Vaccination against helminth parasite infections. *Expert Rev Vaccines,* 13(4): 473-487.
- Hoise SK, Stocker BA. 1981. Aromatic-dependent *Salmonella typhimurium* are non-virulent and effective as live vaccines. *Nature.* 1981. 291(5812):238-239.
- Hopkins SA, Niedergang F, Corthesy-Theulaz IE, Kraehenbuhl JP. 2000. A recombinant *Salmonella typhimurium* vaccine strain is taken up and survives within murine Peyer's patch dendritic cells. *Cell Microbiol.* 2(1):59-68.
- Hotez PJ, Molyneux DH, Fenwick A, Ottesen E, Ehrlich Sachs S, Sachs JD. 2006. Incorporating a rapid-impact package for neglected tropical diseases with programs for HIV/AIDS, tuberculosis, and malaria. *PLoS Med.* 3(5):e102.

- Hotez PJ, Brindley PJ, Bethony JM, King CH, Pearce EJ, Jacobson J. 2008. Helminth infections: the great neglected tropical diseases. *J Clin Invest.* 118(4):1311-1321.
- Huang Y, Hajishengallis G, Michalek SM. 2000. Construction and characterization of a *Salmonella enterica* serovar typhimurium clone expressing a salivary adhesin of *Streptococcus mutans* under control of the anaerobically inducible nirB promoter. *Infect Immun.* 68(3):1549-1556.
- Hur J, Lee JH. 2011. Enhancement of immune responses by an attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strain secreting an *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit protein as an adjuvant for a live *Salmonella* vaccine candidate. *Clin Vaccine Immunol.* 18(2):203-209.
- ICT 2014. Métodos recomendados para el control de *Trichinella* en animales domésticos y salvajes destinados al consumo humano. International Commission on Trichinellosis. Disponible en: [http://www.trichinellosis.org/Further\\_Reading.html](http://www.trichinellosis.org/Further_Reading.html)
- Ierna MX, Scales HE, Saunders KL, Lawrence CE. 2008. Mast cells production of IL-4 and TNF may be required for protective and pathological responses in gastrointestinal helminth infection. *Mucosal Immunology.* 1(2): 147-155.
- Ierna MX, Scales HE, Mueller C, Lawrence CE. 2009. Transmembrane tumor necrosis factor is required for enteropathy and is sufficient to promote parasite expulsion in gastrointestinal helminth infection. *Infect Immun.* 77(9): 3879-3885.
- Iida K, Nadler L, Nussenzweig V. 1983. Identification of the membrane receptor for the complement fragment C3d by means of a monoclonal antibody. *J Exp Med.* 158(4):1021-1033.
- Ilic N, Worthington JJ, Gruden-Movsesijan A, Travis MA, Sofronic-Milosavljevic L, Grecis RK. 2011. *Trichinella spiralis* antigens prime mixed Th1/Th2 response but do not induce de novo generation of Foxp3+ T cells in vitro. *Parasite Immunol.* 33(10):572-582.
- Ilic N, Gruden-Movsesijan A, Sofronic-Milosavljevic L. 2012. *Trichinella spiralis*: shaping the immune response. *Immunol. Res.* 52(1-2), 111–119.
- Inaba T, Sato H, Kamiya H. 2003a. Monoclonal IgA antibody-mediated expulsion of *Trichinella* from the intestine of mice. *Parasitology.* 126(Pt 6):591-598.
- Inaba T, Sato H, Kamiya H. 2003b. Impeded establishment of the infective stage of *Trichinella* in the intestinal mucosa of mice by passive transfer of an IgA monoclonal antibody. *J Vet Med Sci.* 65(11):1227-1231.
- Ishikawa N, Goyal PK, Mahida YR, Li KF, Wakelin D. 1998. Early cytokine responses during intestinal parasitic infections. *Immunology.* 93(2):257-263.
- Jacob SS, Cherian S, Sumithra TG, Raina OK, Sankar M. 2013. Edible vaccines against veterinary parasitic diseases--current status and future prospects. *Vaccine.* 31(15): 1879-1885.
- Jasmer DP. 1993. *Trichinella spiralis* infected skeletal muscle cells arrest in G2/M and cease muscle gene expression. *J Cell Biol.* 121(4):785-793.

- Jasmer DP, Kwak D. 2006. Fusion and differentiation of murine C2C12 skeletal muscle cells that express *Trichinella spiralis* p43 protein. *Exp Parasitol*. 112(2):67-75.
- Jazayeri SD, Ideris A, Zakaria Z, Yeap SK, Omar AR. 2012. Improved immune responses against avian influenza virus following oral vaccination of chickens with HA DNA vaccine using attenuated *Salmonella typhimurium* as carrier. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 35(5):417-427.
- Jose J, Meyer TF. 2007. The autodisplay story, from discovery to biotechnical and biomedical applications. *Microbiol Mol Biol Rev*. 71(4):600-619.
- Kang HY, Srinivasan J, Curtiss R 3rd. 2002. Immune responses to recombinant pneumococcal PspA antigen delivered by live attenuated *Salmonella enterica* serovar typhimurium vaccine. *Infect Immun* 70(4): 1739-1749.
- Kang HY, Curtiss R 3rd. 2003. Immune responses dependent on antigen location in recombinant attenuated *Salmonella typhimurium* vaccines following oral immunization. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 37(2-3): 99-104.
- Kang SA, Cho MK, Park MK, Kim DH, Hong YC, Lee YS, Cha HJ, Ock MS, Yu HS. 2012. Alteration of helper T-cell related cytokine production in splenocytes during *Trichinella spiralis* infection. *Vet Parasitol*. 186(3-4):319-327.
- Kaplan RM. 2002. Anthelmintic resistance in nematodes of horses. *Vet Res*. 33(5): 491-507.
- Kaufmann SH. 2007. The contribution of immunology to the rational design of novel antibacterial vaccines. *Nat Rev Microbiol*. 5(7):491-504.
- Kennedy MW, Wassom DL, McIntosh AE, Thomas JC. 1991. H-2 (I-A) control of the antibody repertoire to secreted antigens of *Trichinella spiralis* in infection and its relevance to resistance and susceptibility. *Immunology*. 73(1):36-43.
- Khan S, Chatfield S, Stratford R, Bedwell J, Bentley M, Sulsh S, Giemza R, Smith S, Bongard E, Cosgrove CA, Johnson J, Dougan G, Griffin GE, Makin J, Lewis DJ. 2007. Ability of SPI2 mutant of *S. typhi* to effectively induce antibody responses to the mucosal antigen enterotoxigenic *E. coli* heat labile toxin B subunit after oral delivery to humans. *Vaccine*. 25(21):4175-4182.
- Khan WI, Blennerhasset PA, Varghese AK, Chowdhury SK, Omsted P, Deng Y, Collins SM. 2002. Intestinal nematode infection ameliorates experimental colitis in mice. *Infect Immun*. 70(11):5931-5937.
- Khan WI, Richard M, Akiho H, Blennerhasset PA, Humphreys NE, Grecis RK, Van Snick J, Collins SM. 2003. Modulation of intestinal muscle contraction by interleukin-9 (IL-9) or IL-9 neutralization: correlation with worm expulsion in murine nematode infections. *Infect Immun*. 71(5):2430-2438.
- Kim YG, Udayanga KG, Totsuka N, Weinberg JB, Núñez G, Shibuya A. 2014. Gut dysbiosis promotes M2 macrophage polarization and allergic airway inflammation via fungi-induced PGE<sub>2</sub>. *Cell Host Microbe*. 15(1):95-102.

- Knight PA, Pemberton AD, Robertson KA, Roy DJ, Wright SH, Miller HR. 2004. Expression profiling reveals novel innate and inflammatory responses in the jejunal epithelial compartment during infection with *Trichinella spiralis*. *Infect Immun.* 72(10):6076-6086.
- Knight PA, Brown JK, Pemberton AD. 2008. Innate immune response mechanisms in the intestinal epithelium: potential roles for mast cells and goblet cells in the expulsion of adult *Trichinella spiralis*. *Parasitology.* 135(6):655-670.
- Kociecka W, 2000. Trichinellosis: human disease, diagnosis and treatment. *Vet Parasitol.* 93(3-4):365-383.
- Kolla RV, Chintalapati S, Sabet M, Santelli E, Liddington RC, David M, Fierer J, Guiney D, Rickert RC. 2007. Complement C3d conjugation to anthrax protective antigen promotes a rapid, sustained, and protective antibody response. *PLoS One.* 2(10):e1044.
- Kołodziej-Sobocińska M, Dvoroznakova E, Dziemian E. 2006. *Trichinella spiralis*: macrophage activity and antibody response in chronic murine infection. *ExpParasitol.* 112(1):52-62.
- Konjufca V, Wanda SY, Jenkins MC, Curtiss R III. 2006. A recombinant attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium vaccine encoding *Eimeria acervulina* antigen offers protection against E. acervulina challenge. *Infect Immunity.* 74(12): 6785-6796.
- Kotton CN, Hohmann EL. 2004. Enteric pathogens as vaccine vectors for foreign antigen delivery. *Infect Immun.* 72(10): 5535-5547.
- Koyasu S, Moro K. 2011. Type 2 innate immune responses and the natural helper cell. *Immunology.* 132(4):475-481.
- Kramer U, Rizos K, Apfel H, Autenrieth IB, Lattemann CT. 2003. Autodisplay: development of an efficacious system for surface display of antigenic determinants in *Salmonella* vaccine strains. *Infect Immun.* 71(4):1944-1952.
- Kroeger KM, Sullivan BM, Locksley RM. 2009. IL-18 and IL-33 elicit Th2 cytokines from basophils via a MyD88- and p38alpha-dependent pathway. *J Leukoc Biol.* 86(4): 769-78.
- Kunisawa J, Takahashi I, Okudaira A, Hiroi T, Katayama K, Ariyama T, Tsutsumi Y, Nakagawa S, Kiyono H, Mayumi T. 2002. Lack of antigen-specific immune responses in anti-IL-7 receptor alpha chain antibody-treated Peyer's patch-null mice following intestinal immunization with microencapsulated antigen. *Eur J Immunol.* 32(8):2347-2355.
- LaCelle MG, Jensen SM, Fox BA. 2009. Partial CD4 depletion reduces regulatory T cells induced by multiple vaccinations and restores therapeutic efficacy. *Clin Cancer Res.* 15(22):6881-6890.
- Lambris JD, Ganu VS, Hirani S, Mueller Eberhard HJ. 1985. Mapping of the 3Cd receptor (CR2)-binding site and a neoantigenic site in the C3 domain of the third component of complement. *Proc Natl Acad Sci USA.* 82(12): 4235-4239.
- Lanusse CE, Prichard RK. 1993. Relationship between pharmacological properties and clinical efficacy of ruminant anthelmintics. *Vet Parasitol.* 49(2-4):123-158.



- Lawrence CE, Paterson JC, Higgins LM, MacDonald TT, Kennedy MW, Garside P. 1998. IL-4-regulated enteropathy in an intestinal nematode infection. *Eur J Immunol.* 128(9):2672-2684.
- Lawrence CE, Paterson YY, Wright SH, Knight PA, Miller HR. 2004. Mouse mast cell protease-1 is required for the enteropathy induced by gastrointestinal helminth infection in the mouse. *Gastroenterology.* 127(1):155-165.
- Lee JS, Shin KS, Pan JG, Kim CJ. 2000. Surface-displayed viral antigens on *Salmonella* carrier vaccine. *Nat Biotechnol.* 18(6):645-648.
- Lee TD. 1991. Helminthotoxic responses of intestinal eosinophils to *Trichinella spiralis* newborn larvae. *Infect Immun.* 59(12):4405-4411.
- Li GX, Tian ZJ, Yu H, Jin YY, Hou SH, Zhou YJ, Liu TQ, Hu SP, Tong GZ. 2009. Fusion of C3d with hemagglutinin enhances protective immunity against swine influenza virus. *Res Vet Sci.* 86(3):406-413.
- Liciardi M, Marucci G, Addis G, Ludovisi A, Gomez Morales MA, Deiana B, Cabaj W, Pozio E. 2009. *Trichinella britovi* and *Trichinella spiralis* mixed infection in a horse from Poland. *Vet Parasitol,* 161(3-4):345-348.
- Liu MY, Zhu XP, Xu KC, Lu Q, Boireau P. 2001 Biological and genetic characteristics of two *Trichinella* isolates in China; comparison with European species. *Parasite* 8: S34–38.
- Liu Q, Sundar K, Mishra PK, Mousavi G, Liu Z, Gaydo A, Alem F, Lagunoff D, Bleich D, Gause WC. 2009. Helminth infection can reduce insulinitis and type 1 diabetes through CD25- and IL-10-independent mechanisms. *Infect Immun.* 77(12):5347-5358.
- Lopez-Garcia ML, Torrado-Duran S, Torrado-Duran J, Martínez-Fernández AR, Bolás-Fernández F. 1997. Albendazole versus ricobendazole (albendazole-sulphoxide) against enteral and parenteral stages of *Trichinella spiralis* in mice. *Int J Parasitol.* 27(7): 781-785.
- Loessner H, Endmann A, Leschner S, Bauer H, Zelmer A, zur Lage S, Westphal K, Weiss S. 2008. Improving live attenuated bacterial carriers for vaccination and therapy. *Int J Med Microbiol.* 298(1-2):21-26.
- Luria-Perez R, Cedillo-Barron L, Santos-Argumedo L, Ortiz-Navarrete VF, Ocaña-Mondragon A, Gonzalez-Bonilla CR. 2007. A fusogenic peptide expressed on the surface of *Salmonella enterica* elicits CTL responses to a dengue virus epitope. *Vaccine.* 2007. 25(27):5071-5085.
- Lustigman S, Geldhof P, Grant WN, Osei-Atweneboana MY, Sripan B, Basáñez MG. 2012. A research agenda for helminth diseases of humans: basic research and enabling technologies to support control and elimination of helminthiasis. *PLoS Negl Trop Dis.* 6(4):e1445.
- Lyubchenko T, dal Porto J, Cambier JC, Holers VM. 2005. Coligation of the B cell receptor with complement receptor type 2 (CR2/CD21) using its natural ligand C3dg: activation without engagement of an inhibitory signaling pathway. *J Immunol.* 174(6):3264-3272.
- Ma X, Yao B, Zheng W, Li L. 2010. Comparative study on characterization of recombinant B subunit of *E. coli* heat-labile enterotoxin (rLTB) prepared from *E. coli* and *P. pastoris*. *J Microbiol Biotechnol.* 20(3):550-557.

- MacLea KS, Krieser RJ, Eastman A. 2003. A family history of deoxyribonuclease II: surprises from *Trichinella spiralis* and *Burkholderia pseudomallei*. *Gene*. 305(1):1-12.
- Maizels RM, Holland MJ, Falcone FH, Zang XX, Yazdanbakhsh M. 1999. Vaccination against helminth parasites—the ultimate challenge for vaccinologists? *Immunol Rev*. 171: 125-147.
- Maizels RM, Balic A, Gomez-Escobar N, Nair M, Taylor MD, Allen JE. 2004. Helminth parasites - masters of regulation. *Immunol Rev*. 201:89-116.
- ManWarren T, Gagliardo L, Geyer J, McVay C, Pearce-Kelling S, Appleton J. 1997. Invasion of intestinal epithelia in vitro by the parasitic nematode *Trichinella spiralis*. *Infect Immun*. 65(11): 4806-4812.
- Marinaro M, Boyaka PN, Finkelman FD, Kiyono H, Jackson RJ, Jirillo E, McGhee JR. 1997. Oral but not parenteral interleukin (IL)-12 redirects T helper 2 (Th2)-type responses to an oral vaccine without altering mucosal IgA responses. *J Exp Med*. 185(3):415-427.
- Marti HP, Murrel KD, Gamble HR. 1987. *Trichinella spiralis*: immunization of pigs with newborn larval antigens. *Exp Parasitol*. 1987. 63 (1): 68-73.
- Martínez-Gómez F, Fuentes-Castro BE, Bautista-Garfias CR. 2011. The intraperitoneal inoculation of *Lactobacillus casei* in mice induces total protection against *Trichinella spiralis* infection at low challenge doses. *Parasitol Res*, 109(6):1609-1617.
- Martínez-Gómez F, Santiago-Rosales R, Ramón Bautista-Garfias C. 2009. Effect of *Lactobacillus casei* Shirota strain intraperitoneal administration in CD1 mice on the establishment of *Trichinella spiralis* adult worms and on IgA anti-*T.spiralis* production. *Vet Parasitol*, 162(1-2):171-175.
- Martínez-Marañón, 1983. Cuatro nuevos casos de triquinosis aguda en Naucalpan. Consideraciones sobre la frecuencia real de la enfermedad en México. *Sal. Pub. Mex.*, 25: 712.
- Mastroeni P. 2002. Immunity to systemic *Salmonella* infections. *Curr Mol Med*. 2(4):393-406.
- Matadamas-Martínez F, Noguera-Torres B, Hernández-Campos A, Hernández-Luis F, Castillo R, Mendoza G, Ambrosio JR, Andrés-Antonio G, Yépez-Mulia L. 2013. Analysis of the effect of a 2-(trifluoromethyl)-1H-benzimidazole derivative on *Trichinella spiralis* muscle larvae. *Vet Parasitol*. 194(2-4):193-197
- Matsumoto AK, Kopicky-Burd J, Carter RH, Tuveson DA, Tedder TF, Fearon DT. 1991. Intersection of the complement and immune systems: a signal transduction complex of the B lymphocyte-containing complement receptor type 2 and CD19. *J Exp Med*. 173(1):55-64.
- Matsuo A, Wu Z, Nagano I, Takahashi Y. 2000. Five types of nuclei present in the capsule of *Trichinella spiralis*. *Parasitology*. 121 (Pt 2):203-210.
- MBPPGP, 2004. Manual de Buenas Prácticas de Producción en Granjas Porcícolas. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Unidad de Hermosillo del CIAD, A.C. y el Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria, SAGARPA. Disponible en: [www.sagarpa.gob.mx/ganaderia/.../Lists/.../manual\\_porcino.pdf](http://www.sagarpa.gob.mx/ganaderia/.../Lists/.../manual_porcino.pdf)

- McHeyzer-Williams LJ, Cool M, McHeyzer-Williams MG. 2000. Antigen-specific B cell memory: expression and replenishment of a novel b220(-) memory b cell compartment. *J Exp Med.* 191(7):1149-1166.
- McGuire C, Chan WC, Wakelin D. 2002. Nasal immunization with homogenate and peptide antigens induces protective immunity against *Trichinella spiralis*. *Infect Immun,* 70(12):7149-7152.
- McVay CS, Tsung A, Appleton J. 1998. Participation of parasite surface glycoproteins in antibody-mediated protection of epithelial cells against *Trichinella spiralis*. *Infect Immun.* 66(5):1941-1945.
- McVay CS, Bracken P, Gagliardo LF, Appleton J. 2000. Antibodies to tyvelose exhibit multiple modes of interference with the epithelial niche of *Trichinella spiralis*. *Infect Immun.* 68(4):1912-1918.
- Medina E, Guzmán CA. 2001. Use of live bacterial vaccine vectors for antigen delivery: potential and limitations. *Vaccine.* 19(13-14):1573-1580.
- Medina E, Paglia P, Nikolaus T, Müller A, Hensel M, Guzmán CA. 1999. Pathogenicity island 2 mutants of *Salmonella typhimurium* are efficient carriers for heterologous antigens and enable modulation of immune responses. *Infect Immun,* 67(3):1093-1099.
- Meeusen EN, Piedrafita D. 2003. Exploiting natural immunity to helminth parasites for the development of veterinary vaccines. *Int J Parasitol.* 33(11):1285-1290.
- Meeusen EN, Walker J, Peters A, Pastoret PP, Jungersen G. 2007. Current status of veterinary vaccines. *Clin Microbiol Rev.* 20(3):489-510.
- Meeusen EN. 2011. Exploiting mucosal surfaces for the development of mucosal vaccines. *Vaccine.* 29(47):8506-8511.
- Miller JH, 1992. The genetic code and codon usage in selected organisms. In: Miller JH (Ed.) *A Short Course in Bacterial Genetics: A Laboratory Manual and Handbook for Escherichia coli and Related Bacteria.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, USA, pp. 19.1–19.4.
- Mitchell JA, Green TD, Bright RA, Ross TM. 2003. Induction of heterosubtypic immunity to influenza A virus using a DNA vaccine expressing hemagglutinin-C3d fusion proteins. *Vaccine.* 21(9-10):902-914.
- Mitreva M, Jasmer DP, Appleton J, Martin J, Dante M, Wylie T, Clifton SW, Waterston RH, McCarter JP. 2004. Gene discovery in the adenophorean nematode *Trichinella spiralis*: an analysis of transcription from three life cycle stages. *Mol Biochem Parasitol.* 137(2):277-291.
- Mitreva M, Jasmer DP. 2005. Biology and genome of *Trichinella spiralis*. En: *WormBook: The Online Review of C. elegans Biology.* Edited by The C. elegans Research Community. Pasadena (CA): WormBook; 2005. ISSN: 1551-8507. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK19662/>
- Mittrücker HW, Kaufmann SH. 2000. Immune response to infection with *Salmonella typhimurium* in mice. *J Leukoc Biol.* 67(4):457-463.
- Monroy H, Flores-Trujillo M, Benitez E, Arriaga C. 2001. Swine trichinellosis in slaughterhouses of the metropolitan area of Toluca. *Parasite.* 8(2 Suppl): S249-S251.

- Mulcahy G, O'Neill S, Fanning J, McCarthy E, Sekiya M. 2005. Tissue migration by parasitic helminths - an immunoevasive strategy? *Trends Parasitol.* 21(6):273-277.
- Muralinath M, Kuenh MJ, Roland KL, Curtiss R III. 2011. Immunization with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium-derived outer membrane vesicles delivering the pneumococcal protein PspA confers protection against challenge with *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immunity*, 79(2): 887-894.
- Murrell KD, Despommier DD. 1984. Immunization of swine against *Trichinella spiralis*. *Vet Parasitol.* 15(3-4): 263-270.
- Murrell KD. *Trichinella spiralis*: acquired immunity in swine. 1985. *Exp Parasitol.* 59(3):347-354.
- Murrell KD, Pozio E. 2011. Worldwide occurrence and impact of human trichinellosis, 1986-2009. *Emerg Infect Dis.* 17(12):2194-2202
- Musa HH, Zhang WJ, Lv J, Duan XL, Yang Y, Zhu CH, Li HF, Chen KW, Meng X, Zhu GQ. 2014. The molecular adjuvant mC3d enhances the immunogenicity of FimA from type I fimbriae of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *J Microbiol Immunol Infect.* 47(1):57-62.
- Nagano I, Wu Z, Boonmars T, Takahashi Y. 2004. Molecular cloning and characterisation of two kinds of proteins in excretory-secretory products of *Trichinella pseudospiralis*. *Int J Parasitol.* 34(4):491-500.
- Nagano I, Wu Z, Takahashi Y. 2009. Functional genes and proteins of *Trichinella spp.* *Parasitol Res.* 104(2):197-207.
- Nakayama H, Inaba T, Nargis M, Chisty M, Ito M, Kamiya H. 1998. Immunization of laboratory animals with ultraviolet-attenuated larvae against homologous challenge infection with *Trichinella britovi*. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 29(3):563-566.
- Nanton MR, Way SS, Shlomchik MJ, McSorley SJ. 2012. Cutting edge: B cells are essential for protective immunity against *Salmonella* independent of antibody secretion. *J Immunol.* 189(12):5503-5507.
- Nardelli-Haefliger D, Kraehenbuhl JP, Curtiss R 3rd, Schodel F, Potts A, Kelly S, De Grandi P. 1996. Oral and rectal immunization of adult female volunteers with a recombinant attenuated *Salmonella typhi* vaccine strain. *Infect Immun.* 64(12):5219-5224.
- Negrão-Corrêa D. 2001. Importance of immunoglobulin E (IgE) in the protective mechanism against gastrointestinal nematode infection: looking at the intestinal mucosae. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 43(5):291-299.
- Neill DR, Wong SH, Bellosi A, Flynn RJ, Daly M, Langford TK, Bucks C, Kane CM, Fallon PG, Pannell R, Jolin HE, McKenzie AN. 2010. Nuocytes represent a new innate effector leukocyte that mediates type-2 immunity. *Nature.* 464(7293):1367-1370.
- Neill DR, McKenzie AN. 2011. Nuocytes and beyond: new insights into helminth expulsion. *Trends Parasitol.* 27(5):214-221.
- Nöckler K, Kapel CMO. 2007. Detection and surveillance for *Trichinella*: meat inspection and hygiene, and legislation. In: Dupouy-Camet J, Murrell KD (eds) *FAO/WHO/OIE guidelines for the surveillance,*

management, prevention and control of trichinellosis. World Organisation for Animal Health Press, Paris, pp 71–85.

Nørholm MH, Light S, Virkki MT, Elofsson A, von Heijne G, Daley DO. 2012. Manipulating the genetic code for membrane protein production: what have we learnt so far? *Biochim Biophys Acta*. 1818(4):1091-1096.

Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Publicada y actualizada en 2009.

Norma Oficial Mexicana NOM-064-ZOO-2000. Lineamientos para la clasificación y prescripción de los productos farmacéuticos veterinarios por el nivel de riesgo de sus ingredientes activos. Publicada el 27 de enero de 2003. Disponible en: <http://www.senasica.gob.mx/includes/asp/download.asp?IdDocumento=521&IdUrl=993&down=true>

Norma Oficial Mexicana NOM-017-SSA2-2012, Para la vigilancia epidemiológica. Actualizada el 19 de febrero de 2013. Disponible en: [http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/sinave/NOM-017-SSA2-2012\\_para\\_vig\\_epidemiologica.pdf](http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/sinave/NOM-017-SSA2-2012_para_vig_epidemiologica.pdf)

Ock MS, Cha HJ, Choi YH. 2013. Verifiable hypotheses for thymosin  $\beta$ 4-dependent and -independent angiogenic induction of *Trichinella spiralis*-triggered nurse cell formation. *Int J Mol Sci*. 14(12):23492-23498.

O'Gaora P, Roberts M, Bowe F, Hormaeche C, Demarco de Hormaeche R, Cafferkey M, Tite J, Dougan G. 1990. *Yersinia enterocolitica* aroA mutants as carriers of the B subunit of the *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin to the murine immune system. *Microb Pathog*. 9(2): 105-116.

Okahashi N, Yamamoto M, Vancott JL, Chatfield SN. 1996. Oral immunization of interleukine-4 (IL-4) knockout mice with recombinant *Salmonella strain* or cholera toxin reveals that CD4<sup>+</sup> Th2 cells producing IL-6 and IL-10 are associated with mucosal immunoglobulin A response. *Infect Immunity*. 64(5):1516-1525.

Olivier M, Foret B, Le Vern Y, Kerboeuf D, Guilloteau LA. 2013. Plasticity of migrating CD1b<sup>+</sup> and CD1b<sup>-</sup> lymph dendritic cells in the promotion of Th1, Th2 and Th17 in response to *Salmonella* and helminth secretions. *PLoS One*. 8(11):e79537.

Ortega-Pierres MG, Yepez-Mulia L, Homan W, Gamble HR, Lim PL, Takahashi Y, Wassom DI, Appleton JA. 1996. Workshop on a detailed characterization of *Trichinella spiralis* antigens: a platform for future studies on antigens and antibodies to this parasite. *Parasite Immunol*. 18(6):273-284.

Ortega-Pierres MG, C. Arriaga C y Yépez-Mulia L. 2000. Epidemiology of trichinellosis in Mexico, Central and South America. *Vet Parasitol*. 93(3-4): 201-225.

Pacheco LG, Zucconi E, Mati VL, Garcia RM, Miyoshi A, Oliveira SC, de Melo AL, Azevedo V. 2005. Oral administration of a live Aro attenuated *Salmonella* vaccine strain expressing 14-kDa *Schistosoma mansoni* fatty acid-binding protein induced partial protection against experimental schistosomiasis. *Acta Trop*, 95(2):132-142.

- Paolucci N, Sironi M, Bettini M, Bartoli G, Michalak S, Bandi C, Magni F, Bruschi F. 1998. Immunopathological mechanisms underlying the time-course of *Trichinella spiralis* cardiomyopathy in rats. *Virchows Arch*, 432 (3): 261-266.
- Parkhouse RM, Harrison LJ. 1989. Antigens of parasitic helminths in diagnosis, protection and pathology. *Parasitology*. 99 Suppl: S5-19.
- Pasetti M, Simon JK, Szein MB, Levine MM. 2010. Immunology of gut mucosal vaccines. *Immunol Rev*, 239(1): 125-148.
- Pathangey L, Kohler JL, Isoda R, Brown TA. 2009. Effect of expression level on immune responses to recombinant oral *Salmonella enterica* Typhimurium vaccines. *Vaccine*, 27(20): 2707-2711.
- Pauls SD, Lafarge ST, Landego I, Zhang T, Marshall AJ. 2012. The phosphoinositide 3-kinase signaling pathway in normal and malignant B cells: activation mechanisms, regulation and impact on cellular functions. *Front Immunol*. 3:224.
- Perrie Y, Mohammed AR, Kirby DJ, McNeil SE, Bramwell VW. 2008. Vaccine adjuvant systems: enhancing the efficacy of sub-unit protein antigens. *Int J pharm*. 364 2):272-280.
- Petavy AF, Hormaeche C, Lahmar S, Ouhelli H, Chabalgoity A, Marchal T, Azzouz S, Schreiber F, Alvite G, Sarciron ME, Maskell D, Esteves A, Bosquet G. 2008. An oral recombinant vaccine in dogs against *Echinococcus granulosus*, the causative agent of human hydatid disease: a pilot study. *PLoS Negl Trop Dis*, 2(1):e125.
- Piekarska J, Michalski A, Szczypka M, Obmińska-Mrukowicz B. 2009. *Trichinella spiralis*: Effect of thymus factor X on apoptosis and necrosis in mice. *Exp Parasitol*. 123(2):128-133.
- Polvere RI, Kabbash CA, Capó VA, Kadan I, Despommier DD. 1997. *Trichinella spiralis*: synthesis of type IV and type VI collagen during nurse cell formation. *Exp Parasitol*. 86(3):191-199.
- Pompa-Mera EN, Yépez-Mulia L, Ocaña-Mondragón A, García-Zepeda EA, Ortega-Pierres G, González-Bonilla CR. 2011. *Trichinella spiralis*: intranasal immunization with attenuated *Salmonella enterica* carrying a gp43 antigen-derived 30mer epitope elicits protection in BALB/c mice. *Exp Parasitol*, 129(4):393-401.
- Pore D, Chakrabarti MK. 2013. Outer membrane protein A (OmpA) from *Shigella flexneri* 2a: a promising subunit vaccine candidate. *Vaccine*. 31(36):3644-3650.
- Pozio E. 2001. New patterns of *Trichinella* infection. *Vet Parasitol*. 98(1-3):133-148.
- Pozio E, Sacchini D, Sacchi L, Tamburrini A, Alberici F. 2001. Failure of mebendazole in the treatment of humans with *Trichinella spiralis* infection at the stage of encapsulating larvae. *Clin Infect Dis*. 32(4):638-642.
- Pozio E, Gomez-Morales MA, Dupouy-Camet J. 2003. Clinical aspects, diagnosis and treatment of trichinellosis. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 1(3): 471-482.
- Pozio E, Zarlenga DS. 2005. Recent advances on the taxonomy, systematics and epidemiology of *Trichinella*. *Int J Parasitol*. 35(11-12):1191-1204.
- Pozio E, Darwin Murrell K. 2006. Systematics and epidemiology of *Trichinella*. *Adv Parasitol*. 63:367-439.

- Pozio E. 2007. World distribution of *Trichinella spp.* infections in animals and humans. *Vet Parasitol.* 149(1-2):3-21.
- Pozio E, Hoberg E, La Rosa G, Zarlenga DS. 2009. Molecular taxonomy, phylogeny and biogeography of nematodes belonging to the *Trichinella* genus. *Infect Genet Evol.* 9(4):606-616.
- Pozio E, Zarlenga DS. 2013. New pieces of the *Trichinella* puzzle. *Int J Parasitol.* 43(12-13):983-997.
- Prechl J, Baiu DC, Horváth A, Erdei A. 2002. Modeling the presentation of C3d-coated antigen by B lymphocytes: enhancement by CR1/2-BCR co-ligation is selective for the co-ligating antigen. *Int Immunol.* 14(3):241-247.
- Pulendran B, Ahmed R. 2006. Translating innate immunity into immunological memory: implications for vaccine development. *Cell.* 124(4):849-863.
- Reed SG, Orr MT, Fox CB. 2013. Key roles of adjuvants in modern vaccines. *Nat Med.* 19(12):1597-1608.
- Reiterová K, Antolová D, Hurníková Z. 2009. Humoral immune response of mice infected with low doses of *Trichinella spiralis* muscle larvae. *Vet Parasitol.* 159(3-4):232-235.
- Robinson K, Bellaby T, Wakelin D. 1995a. Oral and parenteral vaccination against *Trichinella spiralis* infections in high- and low-responder mice. *Int J Parasitol.* 25(8):989-992.
- Robinson K, Bellaby T, Chan WC, Wakelin D. 1995b. High levels of protection induced by a 40-mer synthetic peptide vaccine against the intestinal nematode parasite *Trichinella spiralis*. *Immunology.* 86(4):495-498.
- Rodríguez JJ, de Prada I, Durán JJ, Fernández FB. 2009. The effect of intestinal trichinellosis on oral bioavailability of albendazole in mice. *Parasitol Res.* 105(1):65-70
- Roland KL, Brenneman KE. 2013. *Salmonella* as a vaccine delivery vehicle. *Expert Rev Vaccines.* 2013. 2(9):1033-1045.
- Rosano GL, Ceccarelli EA. 2014. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Front Microbiol.* 5: 172.
- Rosenkranz CD, Chiara D, Agorio C, Baz A, Pasetti MF, Schreiber F, Dematteis S, Martinez M, Szein MB, Chabalgoity JA. 2003. Towards new immunotherapies: targeting recombinant cytokines to the immune system using live attenuated *Salmonella*. *Vaccine.* 21(7-8):798-801.
- Ross TM, Xu Y, Bright RA, Robinson HL. 2000. C3d enhancement of antibodies to hemagglutinin accelerates protection against influenza virus challenge. *Nat Immunol.* 1(2):127-131.
- Ruiz-Olvera P, Ruiz-Pérez F, Sepulveda NV, Santiago-Machuca A, Maldonado-Rodríguez R, Garcia-Elorriaga G, González-Bonilla C. 2003. Display and release of the *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein using the autotransporter MisL of *Salmonella enterica*. *Plasmid.* 50(1): 12-27.
- Ruiz-Pérez F, León-Kempis R, Santiago-Machuca A, Ortega-Pierres G, Barry E, Levine M, González-Bonilla. 2002. Expression of the *Plasmodium falciparum* immunodominant epitope (NANP)(4) on the surface of *Salmonella enterica* using the autotransporter MisL. *Infect Immun.* 70(7):3611-3620.

- SAGARPA, 2014. Dirección de Servicios y Certificación pecuaria de productos químico farmacéuticos vigentes en México con registro SAGARPA y aprobados para uso veterinario. Última actualización Octubre de 2014. Disponible en: <http://www.senasica.gob.mx/includes/asp/download.asp?IdDocumento=26839&IdUrl=67834&down=true>
- Saenz SA, Noti M, Artis D. 2010a. Innate immune cell populations function as initiators and effectors in Th2 cytokine responses. *Trends Immunol.* 31(11):407-413.
- Saenz SA, Siracusa MC, Perrigoue JG, Spencer SP, Urban JF Jr, Tocker JE, Budelsky AL, Kleinschek MA, Kastelein RA, Kambayashi T, Bhandoola A, Artis D. 2010b. IL25 elicits a multipotent progenitor cell population that promotes T(H)2 cytokine responses. *Nature.* 464(7293):1362-1366.
- Scalfone LK, Nel HJ, Gagliardo LF, Cameron JL, Al-Shokri S, Leifer CA, Fallon PG, Appleton JA. 2013. Participation of MyD88 and interleukin-33 as innate drivers of Th2 immunity to *Trichinella spiralis*. *Infect Immun.* 81(4):1354-1363.
- Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A. 2004. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol.* 22:745-763.
- Sallusto F, Lanzavecchia A, Araki K, Ahmed R. From vaccines to memory and back. 2010. *Immunity.* 33(4):451-463.
- Sambrook J y Rusell DW. 2001. *Molecular cloning: A laboratory manual.* 3rd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York. Vol. 1, 2 y 3.
- Scales HE, Ierna MX, Lawrence CE. 2007. The role of IL-4, IL-13 and IL-4Ralpha in the development of protective and pathological responses to *Trichinella spiralis*. *Parasite Immunol.* 29(2):81-91.
- Scalfone LK, Nel HJ, Gagliardo LF, Cameron JL, Al-Shokri S, Leifer CA, Fallon PG, Appleton JA. 2013. Participation of MyD88 and interleukin-33 as innate drivers of Th2 immunity to *Trichinella spiralis*. *Infect Immun.* 81(4):1354-1363.
- Schorr J, Knapp B, Hundt E, Küpper HA, Amann E. 1991. Surface expression of malarial antigens in *Salmonella typhimurium*: induction of serum antibody response upon oral vaccination of mice. *Vaccine.* 9(9): 675-681.
- Schussek S, Trieu A, Doolan DL. 2014. Genome and proteome-wide screening strategies for Discovery and immunogen design. *Biotechnol Adv.* 32(2): 403-414.
- Secretaría de Salud. 2000. Información Epidemiológica de Morbilidad 2000. Disponible en <http://www.dgepi.salud.gob.mx/publicaciones/compest2000.htm>
- Servis C, Lambris JD. 1989. C3 synthetic peptides support growth of human CR2-positive lymphoblastoid B cells. *J Immunol.* 142(7): 2207-2212.
- Sette A, Rappuoli R. 2010. Reverse vaccinology: developing vaccines in the era of genomics. *Immunity.* 33(4):530-541.



- Sheela RR, Babu U, Mu J, Elankumaran S, Bautista DA, Raybourne RB, Heckert RA, Song W. 2003. Immune responses against *Salmonella enterica* serovar enteritidis infection in virally immunosuppressed chickens. *Clin Diagn Lab Immunol*. 10(4):670-679.
- Shibaki A, Katz SI. 2002. Induction of skewed Th1/Th2 T-cell differentiation via subcutaneous immunization with Freund's adjuvant. *Exp Dermatol*. 11(2):126-134.
- Spreng S, Dietrich G, Weidinger G. 2006. Rational design of *Salmonella*-based vaccination strategies. *Methods*. 38(2):133-143.
- Sun S, Xu W, He N, Sugane K. 1994. An antigenic recombinant fusion protein from *Trichinella spiralis* induces a protective response in BALB/c mice. *J Helminthol*. 68(1):89-91.
- Sun, J. B., C. Czerkinsky, and J. Holmgren. 2010. Mucosally induced immunological tolerance, regulatory T cells and the adjuvant effect by cholera toxin B subunit. *Scand. J. Immunol*. 71:1-11.
- Tacket CO, Sztein MB, Losonsky GA, Wasserman SS, Nataro JP, Edelman R, Pickard D, Dougan G, Tsokos SN, Levine MM. 1997. Safety of live oral *Salmonella typhi* vaccine strains with deletions in htrA and aroC aroD and immune response in humans. *Infect Immun*. 65(2):452-456.
- Tang F, Xu L, Yan R, Song X, Li X. 2012. Evaluation of the immune response induced by DNA vaccines expressing MIF and MCD-1 genes of *Trichinella spiralis* in BALB/c mice. *J Helminthol*. 86(4):430-439.
- Thompson RC. 2013. Parasite zoonoses and wildlife: One Health, spillover and human activity. *Int J Parasitol*. 43(12-13):1079-1088
- Toapanta FR, DeAlmeida DR, Dunn MD, Ross TM. 2010. C3d adjuvant activity is reduced by altering residues involved in the electronegative binding of C3d to CR2. *Immunol Lett*. 129(1):32-38.
- Tong T, Fan H, Tan Y, Xiao S, Ling J, Chen H, Guo A. 2006. C3d enhanced DNA vaccination induced humoral immune response to glycoprotein C of pseudorabies virus. *Biochem Biophys Res Commun*. 347(4):845-851.
- Tsokos GC, Lambris JD, Finkelman FD, Anastassiou ED, June CH. 1990. Monovalent ligands of complement receptor 2 inhibit whereas polyvalent ligands enhance anti-Ig-induced human B cell intracytoplasmic free calcium concentration. *J Immunol* 144(5): 1640-1645.
- Van den Broeck W, Derore A, Simoens P. 2006. Anatomy and nomenclature of murine lymph nodes: Descriptive study and nomenclatory standardization in BALB/cAnNCrI mice. *J Immunol Methods*. 312(1-2): 12-19.
- VanCott JL et al., 1996. Regulation of mucosal and systemic antibody responses by T helper cell subsets, macrophages, and derived cytokines. *J of Immunology* 156(4):1504-1514
- Vassilatis DK, Despommier D, Misek DE, Polvere RI, Gold AM, Van der Ploeg LH. 1992. Analysis of a 43-kDa glycoprotein from the intracellular parasitic nematode *Trichinella spiralis*. *J Biol Chem*. 267(26):18459-18465.

- Vassilatis DK, Polvere RI, Despommier DD, Gold AM, Van der Ploeg LH. 1996. Developmental expression of a 43-kDa secreted glycoprotein from *Trichinella spiralis*. *Mol Biochem Parasitol.* 78(1-2):13-23.
- Vega-Alarcón, N., Romero, V.A., 1992. Frecuencia de *Trichinella spiralis* en cerdos sacrificados en el rastro ABC de los Reyes, La Paz, Estado de México utilizando dos técnicas de diagnóstico. Memorias. In: II Congreso Nacional de Parasitología Veterinaria. Asociación Mexicana de Parasitología Veterinaria, A.C. Universidad Veracruzana, México.
- Vercruyse J, Knox DP, Schetters TP, Willadsen P. 2004. Veterinary parasitic vaccines: pitfalls and future directions. *Trends Parasitol.* 20(10):488-492.
- Vercruyse J, Schetters TP, Knox DP, Willadsen P, Claerebout E. 2007. Control of parasitic disease using vaccine: an answer to drug resistance? *Rev Sci Tech.* 26(1): 105-115.
- Viney M. 2002. How do host immune responses affect nematode infections?. *Trends in Parasitology.* 8 (2): 63-66.
- Wagner SD, Montalvo H Jr, Hauschild CL, Vanhose AM, Wang CH. 2004. Rapidity and multiplicity of synthesis and expression of immunoglobulin isotypes by B lymphocytes in the small intestine. *Front Biosci.* 9:1642-1653.
- Wakelin D. 2000. Helminths. *Curr Opin Infect Dis.* 13(5):465-469.
- Wakelin D. 1993. *Trichinella spiralis*: immunity, ecology, and evolution. *J Parasitol.* 79(4):488-494.
- Walters N, Trunkle T, Sura M, Pascual DW. 2005. Enhanced immunoglobulin A response and protection against *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium in the absence of the substance P receptor. *Infect Immunity.* 73(1): 317-324.
- Wang, C.H., Richards, E.M., Bell, R.G., 1999. Rapid anti-helminthic response of B lymphocytes in the intestinal mucosal tissues of rats. *Cell Immunol* 193(1): 59-70.
- Wang LX, Xu W, Guan QD, Chu YW, Wang Y, Xiong SD. 2004. Contribution of C3d-P28 repeats to enhancement of immune responses against HBV-preS2/S induced by gene immunization. *World J Gastroenterol.* 10(14): 2072-2077.
- Wang XL, Zhao XR, Yu M, Yuan MM, Yao XY, Li DJ. 2006. Gene conjugation of molecular adjuvant C3d3 to hCGbeta increased the anti-hCGbeta Th2 and humoral immune response in DNA immunization. *J Gene Med.* 8(4):498-505.
- Wang ZQ, Cui J, Wei HY, Han HM, Zhang HW, Li YL. 2006. Vaccination of mice with DNA vaccine induces the immune response and partial protection against *T. spiralis* infection. *Vaccine,* 24(8):1205-1212.
- Wang S, Zhu X, Yang Y, Yang J, Gu Y, Wei J, Hao R, Boireau P, Cui S. 2009. Molecular cloning and characterization of heat shock protein 70 from *Trichinella spiralis*. *Acta Trop,* 110(1):46-51.
- Wang S, Li Y, Shi H, Sun W, Roland KL, Curtiss R 3rd. 2011. Comparison of a regulated delayed antigen synthesis system with in vivo-inducible promoters for antigen delivery by live attenuated *Salmonella* vaccines. *Infect Immun,* 79(2):937-949.

- Wang L, Wang ZQ, Hu DD, Cui J. 2013a. Proteomic analysis of *Trichinella spiralis* muscle larval excretory-secretory proteins recognized by early infection sera. *Biomed Res Int*. 2013: 139745.
- Wang S, Kong Q, Curtiss R 3rd. 2013b. New technologies in developing recombinant attenuated *Salmonella* vaccine vectors. *Microb Pathog*. 58: 17-28.
- Weis JJ, Tedder TF, Fearon DT. 1984. Identification of a 145,000 Mr membrane protein as the C3d receptor (CR2) of human B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 81(3):881-885.
- Weiss R, Gabler M, Jacobs T, Gilberger TW, Thalhamer J, Scheiblhofer S. 2010. Differential effects of C3d on the immunogenicity of gene gun vaccines encoding *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium berghei* MSP1(42). *Vaccine*. 28(28): 4515-4522.
- WHO, 2012. Technical Report Series, No. 972, 2012. Research priorities for helminth Infections. Technical Report of the TDR Disease Reference Group on Helminth Infections. Disponible en: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75922/1/WHO\\_TRS\\_972\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75922/1/WHO_TRS_972_eng.pdf)
- Wisniewski N, McNeil M, Grieve RB, Wassom DL. 1993. Characterization of novel fucosyl- and tyvelosyl-containing glycoconjugates from *Trichinella spiralis* muscle stage larvae. *Mol Biochem Parasitol*. 61(1): 25-35.
- Wolstenholme AJ, Fairweather I, Prichard R, von Samson-Himmelstjerna G, Sangster NC. 2004. Drug resistance in veterinary helminths. *Trends Parasitol*. 20(10): 469-476.
- Wu Z, Nagano I, Nakada T, Takahashi Y. 2002. Expression of excretory and secretory protein genes of *Trichinella* at muscle stage differs before and after cyst formation. *Parasitol Int*. 51(2):155-161.
- Wu Z, Nagano I, Boonmars T, Takahashi Y. 2005. A spectrum of functional genes mobilized after *Trichinella spiralis* infection in skeletal muscle. *Parasitology*. 130(Pt 5):561-573.
- Wu Z, Sofronic-Milosavljevic Lj, Nagano I, Takahashi Y. 2008. *Trichinella spiralis*: nurse cell formation with emphasis on analogy to muscle cell repair. *Parasit Vectors*. 1(1):27.
- Xu GL, Zhang KQ, Guo B, Zhao TT, Yang F, Jiang M, Wang QH, Shang YH, Wu YZ. 2010. Induction of protective and therapeutic antitumor immunity by a DNA vaccine with C3d as a molecular adjuvant. *Vaccine*. 28(44):7221-7227.
- Wu Z, Nagano I, Takahashi Y. 2013. *Trichinella*: what is going on during nurse cell formation? *Vet Parasitol*. 194(2-4):155-159.
- Yamamoto M, Vancott JL, Okahashi N, Marinaro M, Kiyono H, Fujihashi K, Jackson RJ, Chatfield SN, Bluethmann H, McGhee JR. 1996. The role of Th1 and Th2 cells for mucosal IgA responses. *Ann N Y Acad Sci*. 778: 64-71.
- Yamamoto M, Rennert P, McGhee JR, Kweon MN, Yamamoto S, Dohi T, Otake S, Bluethmann H, Fujihashi K, Kiyono H. 2000. Alternate mucosal immune system: organized Peyer's patches are not required for IgA responses in the gastrointestinal tract. *J Immunol*. 164(10):5184-5191.

- Yang J, Yang Y, Gu Y, Li Q, Wei J, Wang S, Boireau P, Zhu X. 2008. Identification and characterization of a full-length cDNA encoding paramyosin of *Trichinella spiralis*. *Biochem Biophys Res Commun*, 365(3):528-533.
- Yang J, Gu Y, Yang Y, Wei J, Wang S, Cui S, Pan J, Li Q, Zhu X. 2010a. *Trichinella spiralis*: immune response and protective immunity elicited by recombinant paramyosin formulated with different adjuvants. *Exp Parasitol*. 124(4):403-408.
- Yang Y, Zhang Z, Yang J, Chen X, Cui S, Zhu X. 2010b. Oral vaccination with Ts87 DNA vaccine delivered by attenuated *Salmonella typhimurium* elicits a protective immune response against *Trichinella spiralis* larval challenge. *Vaccine*, 28(15):2735-2742.
- Yépez-Mulia L, Hernández-Bello R, Arizmendi-Puga N, Fonseca-Liñán R, Ortega-Pierres G. 2007. Contributions to the study of *Trichinella spiralis* TSL-1 antigens in host immunity. *Parasite Immunol*. 29(12):661-670.
- Yin G, Qin M, Liu X, Suo J, Tang X, Tao G, Han Q, Suo X, Wu W. 2013. An *Eimeria* vaccine candidate based on *Eimeria tenella* immune mapped protein 1 and the TLR-5 agonist *Salmonella typhimurium* FliC flagellin. *Biochem Biophys Res Commun*, 440(3):437-442.
- Yu X, Jia R, Huang J, Shu B, Zhu D, Liu Q, Gao X, Lin M, Yin Z, Wang M, Chen S, Wang Y, Chen X, Cheng A. 2012. Attenuated *Salmonella typhimurium* delivering DNA vaccine encoding duck enteritis virus UL24 induced systemic and mucosal immune responses and conferred good protection against challenge. *Vet Res*, 43:56.
- Yu YR, Deng MJ, Lu WW, Jia MZ, Wu W, Qi YF. 2013. Systemic cytokine profiles and splenic toll-like receptor expression during *Trichinella spiralis* infection. *Exp Parasitol*. 134(1):92-101.
- Yu LC, Shih YA, Wu LL, Lin YD, Kuo WT, Peng WH, Lu KS, Wei SC, Ni YH. 2014a. Enteric dysbiosis promotes antibiotic-resistant bacterial infection: systemic dissemination of resistant and commensal bacteria through epithelial transcytosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. *En prensa*.
- Yu YR, Deng MJ, Lu WW, Zhang JS, Jia MZ, Huang J, Qi YF. 2014b. Endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis is activated in intestines of mice with *Trichinella spiralis* infection. *Exp Parasitol*. 145C:1-6.
- Zarlenga DS, Rosenthal BM, La Rosa G, Pozio E, Hoberg EP. 2006. Post-Miocene expansion, colonization, and host switching drove speciation among extant nematodes of the archaic genus *Trichinella*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103(19):7354-7359.
- Zhang D, Xia Q, Wu J, Liu D, Wang X, Niu Z. 2011. Construction and immunogenicity of DNA Vaccines encoding fusion protein of murine complement C3d-p28 and GP5 gene of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vaccine*. 29(4): 629-635.
- Zhang Z, Yang J, Wei J, Yang Y, Chen X, Zhao X, Gu Y, Cui S, Zhu X. 2011. *Trichinella spiralis* paramyosin binds to C8 and C9 and protects the tissue-dwelling nematode from being attacked by host complement. *PLoS Negl Trop Dis*. 5(7):e1225.
- Zhang YL, Wang ZQ, Li LG, Cui J. 2013. Molecular characterization of *Trichinella spiralis* aminopeptidase and its potential as a novel vaccine candidate antigen against trichinellosis in BALB/c mice. *Parasit Vectors*. 6(1):246.

- Zhu XP, Garcia-Reyna P, Fu BQ, Yang J, Li CV, Yang YP, Liu MY, Ortega-Pierres G, Boireau P. 2005. A stage-specific open reading frame from three-day old adult worms of *Trichinella spiralis* encodes zinc-finger motifs. *Parasite*. 12(2):151-157.
- Zhu X, Cai J, Huang J, Jiang X, Ren D. 2010. The treatment and prevention of mouse melanoma with an oral DNA vaccine carried by attenuated *Salmonella typhimurium*. *J Immunother*, 33(5):453-460.



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

## Research in Veterinary Science

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/rvsc](http://www.elsevier.com/locate/rvsc)

## Protective immunity against enteral stages of *Trichinella spiralis* elicited in mice by live attenuated *Salmonella* vaccine that secretes a 30-mer parasite epitope fused to the molecular adjuvant C3d-P28

Ericka N. Pompa-Mera<sup>a,b,c</sup>, Pablo Arroyo-Matus<sup>a</sup>, Alicia Ocaña-Mondragón<sup>b</sup>, César R. González-Bonilla<sup>d</sup>, Lilián Yépez-Mulia<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Unidad de Investigación en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, Mexico City, Mexico

<sup>b</sup> Unidad de Investigación Médica en Inmunología e Infectología, Hospital de Infectología, Centro Médico Nacional La Raza, IMSS, Mexico City, Mexico

<sup>c</sup> Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

<sup>d</sup> Coordinación de Vigilancia Epidemiológica, IMSS, Mexico City, Mexico

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 17 April 2014

Accepted 15 September 2014

## Keywords:

*Trichinella spiralis*

Ag30

Attenuated *Salmonella*

C3d

P28 adjuvant

## ABSTRACT

The development of a veterinary vaccine against *T. spiralis* infection is an alternative strategy to control trichinellosis. In an effort to develop an efficient vaccine, BALB/c mice were immunized with attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium SL3261 that expresses a 30-mer peptide (Ag30) derived from the gp43 of *T. spiralis* muscle larvae fused to three copies of the molecular adjuvant P28 (Ag30-P28<sub>3</sub>) and it was either displayed on the surface or secreted by recombinant *Salmonella* strains. *Salmonella* strain secreting Ag30-P28<sub>3</sub>, reduced the adult worm burden 92.8% following challenge with *T. spiralis* muscle larvae compared to 42% achieved by recombinant *Salmonella* displaying Ag30-P28<sub>3</sub> on the surface. The protection induced by secreted Ag30-P28<sub>3</sub> was associated with a mixed Th1/Th2 with predominance of Th2 phenotype, which was characterized by the production of IgG1, intestinal IgA antibodies and IL-5 secretion. This finding could provide an efficient platform technology for the design of novel vaccination strategies.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

Trichinellosis is a worldwide zoonosis caused by nematodes of the genus *Trichinella*, which infect domestic and wild animal species and man (Cui et al., 2011; Ribicich et al., 2010). The wide geographical distribution of human trichinellosis affects both industrialized and non-industrialized countries (Pozió, 2007), and it is estimated that up to 11 million people may be infected with the parasite (Dupouy-Camet, 2000). Humans acquire *T. spiralis* infection by the ingestion of raw or undercooked meat contaminated with muscle larvae. Larvae moult to the adult stage, mate, and reproduce in the host's small intestine. The parasite's life cycle is completed when newborn larvae invade the host's striated muscle cells and differentiate to muscle larvae, transforming muscle cells into a structure called the nurse cell (Capó and Despommier, 1996).

The clinical features of trichinellosis vary from mild to severe disease, depending on several factors, such as the number and localization of the parasites and the intensity of the inflammatory reaction. Gastroenteritis, diarrhea, abdominal pain, cutaneous rash,

facial and periorbital edema, fever, myalgia and persistent fatigue are the most common symptoms (Bruschi and Dupouy-Camet, 2014; Gottstein et al., 2009). The disease is associated with infiltrating inflammatory cells such as mast cells, eosinophils, monocytes, and lymphocytes. Besides, IgE production is responsible for allergic manifestations typical of trichinellosis and the presence of lactate dehydrogenase and creatinine phosphokinase in serum suggests muscle damage (Bruschi and Dupouy-Camet, 2014).

Although control of trichinellosis can be achieved with sanitary measures, such as epidemiological surveillance, adequate marketing systems, and good farming practices, the economic conditions in some developing countries prevent the implementation of these practices. In addition, the emergence of parasite resistance to traditional anthelmintic drugs has motivated the search for alternative strategies to control this zoonosis (Ortega-Pierres et al., 2000). Among these strategies, the development of a vaccine against trichinellosis has become an attractive and promising approach, especially in the veterinary field.

In the past, various efforts to develop effective vaccines against trichinellosis have included antigenic preparations such as attenuated irradiated larvae (Agye-Frempong and Catty, 1983; Nakayama et al., 1998), crude homogenate from *T. spiralis* muscle larvae and parasite synthetic peptides (McGuire et al., 2002; Robinson et al.,

\* Corresponding author. Tel.: +52(55) 56276940; fax: +52(55) 56276949.  
E-mail address: [lilianyepz@yahoo.com](mailto:lilianyepz@yahoo.com) (L. Yépez-Mulia).

1995a, 1995b), and excretory–secretory (ES) products from muscle larvae (Dea-Ayuela et al., 2006). DNA vaccines coding for different muscle larvae antigens have been also explored (Tang et al., 2012; Wang et al., 2006a; Yang et al., 2010) and more recently parasite specific antigens by phage display technology (Cui et al., 2013). However, only partial protection against *T. spiralis* infection has been obtained with these approaches.

Among the most promising technologies for inducing immune protection against enteric pathogens are live *Salmonella*-based vaccine systems (Cheminay and Hensel, 2008; Galen et al., 2010; Petavy et al., 2008). We recently developed an attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium SL3261 that expressed a 30-mer peptide (named Ag30) on its surface, which was derived from *T. spiralis* gp43 (Pompa-Mera et al., 2011). This recombinant *Salmonella* vaccine (*Salmonella* pAg30) developed significant protection in mice against intestinal stage of *T. spiralis* (61.8%), producing low titres of IgG1 and IL-5. The enhancement of humoral and cellular antigen-specific immune response could contribute to enhance protection against *T. spiralis* infection. To improve the efficacy of *Salmonella* pAg30, MisL autotransporter was used instead of ShdA, in combination with an intraperitoneal boost with the recombinant protein. This vaccine induced a higher level of protection (76%) against the enteral phase of *T. spiralis* infection (Castillo-Alvarez et al., 2013).

It is well accepted that in addition to surface display, an alternative strategy to enhance the immune response to heterologous antigens is their secretion out of recombinant *Salmonella*, facilitating the exposure of recombinant antigen to antigen-presenting cells for processing (Gómez-Duarte et al., 2001; Hess et al., 1996; Spreng et al., 2006). In fact, the high immunogenicity of heterologous antigens secreted by *Salmonella* vaccines has been demonstrated (Dietrich et al., 2003; Kang and Curtiss, 2003; Kang et al., 2002).

In addition, several studies showed that the fusion of multiple copies of C3d (or its minimum binding domain, P28) to an antigen improved antigen-specific immune responses by directly interacting with complement receptor 2 (CR2/CD21) on B cells (Bower and Ross, 2006; Dempsey et al., 1996). Proteins fused to multiple copies of C3d/P28 induced a Th2 immune response characterized by high levels of IL-4 (Liu et al., 2010; Mitchell et al., 2003; Ross et al., 2001; Wang et al., 2006b).

In this study, in order to enhance the protection elicited by *Salmonella* pAg30 against *T. spiralis* infection, Ag30 was fused to three copies of P28 (Ag30-P28<sub>3</sub>) and it was either expressed on the surface or secreted to the external milieu by recombinant *Salmonella* strains.

The protection induced by these recombinant strains against the enteral stages of *T. spiralis* infection was evaluated. In addition, the humoral and cellular immune responses elicited by these recombinant carriers were characterized.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Bacterial strains, plasmids, and genetic engineering

*Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (*supE44 lac169 80lacZ M15 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1*) was used as the host strain for the construction of plasmid vectors encoding the fusion proteins of interest. Attenuated *Salmonella enterica* serovar TyphimuriumSL3261 (*aroA::Tn10*) (Hoiseh and Stocker, 1981) was transformed with the plasmids and used for the delivery of the recombinant proteins.

All plasmids used in this study were derived from plasmid pAg30 (3511 bp), which encodes a fusion protein (a 30-mer epitope of *T. spiralis* muscle larvae) that is translocated and expressed on the surface of *Salmonella* by the autotransporter ShdA (Pompa-Mera et al., 2011).

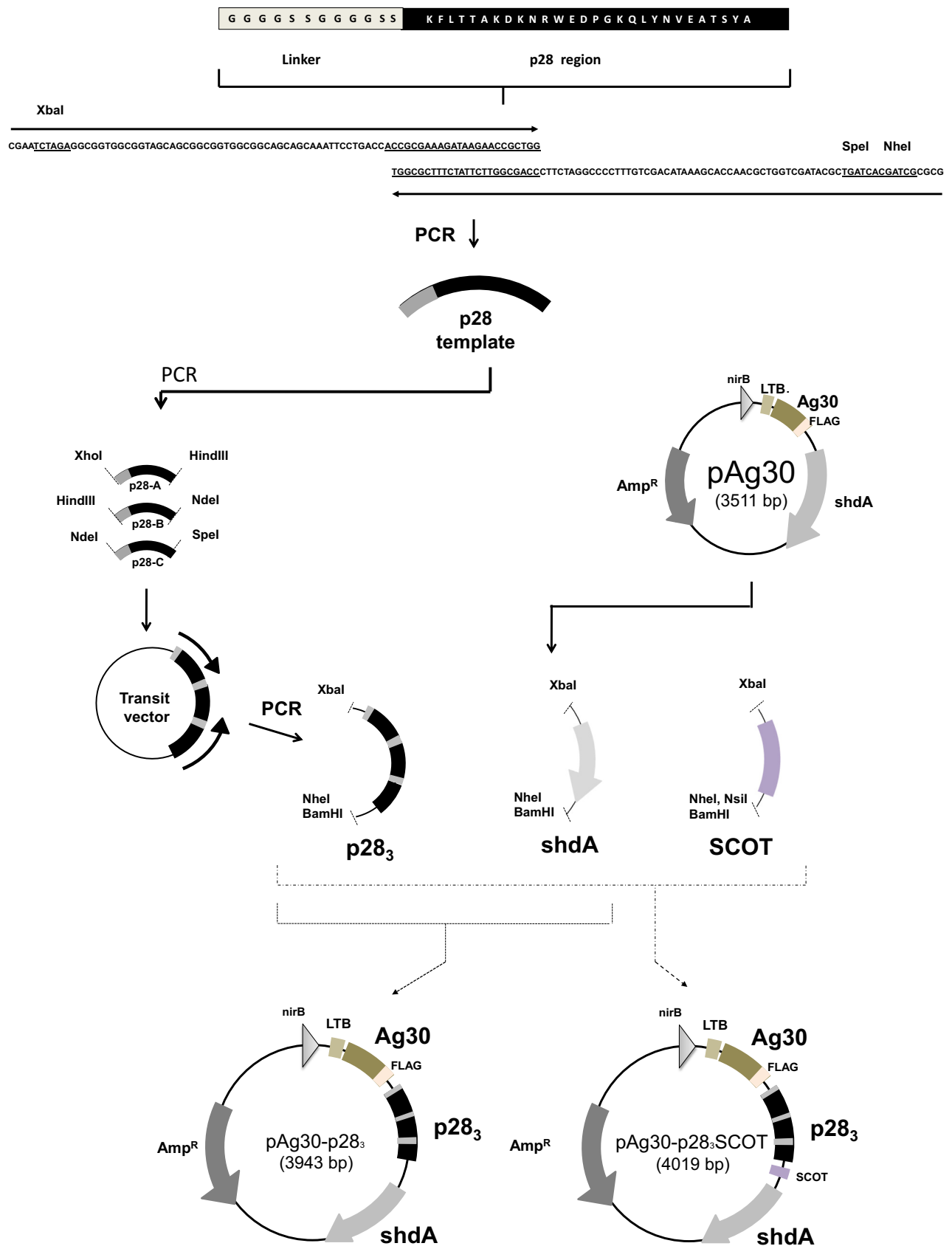
Three copies of the gene sequence encoding the murine CR2 binding domain of C3d (p28) corresponding to amino acids 1187–1214 (KFLTTAKDKNRWEDPGKQLYNVEATSYA) were fused to the 3' end of the Ag30 sequence in plasmid pAg30. The construction of plasmids encoding the fusion protein Ag30-P28<sub>3</sub> was achieved as described in Sambrook and Russell (2001). Briefly, a DNA fragment encoding a single copy of a synthetic p28 gene (p28 template) was generated by PCR using oligonucleotides p28-1 and p28-2. The resultant amplicon included a linker composed of two repeats of four glycines and two serines (G<sub>4</sub>S<sub>2</sub>)<sub>2</sub> and a p28 sequence, as described by Bower and Ross (2006). DNA fragments p28-A, p28-B and p28-C were amplified by PCR from the p28 template using the primers shown in Table 1.

The p28-A, p28-B and p28-C sequences were cut with XhoI and HindIII, HindIII and NdeI, NdeI and SpeI restriction enzymes, respectively, and cloned into the transit vector pRL-null (Promega). Oligonucleotides Null-SEQ-1 and Null-CDS-2 were employed in a second round of PCR to obtain the p28<sub>3</sub> cassette (three tandem repeats of p28 adjuvant). It contained an upstream XbaI, downstream NheI and the BamHI restriction sites used to link with the pAg30 plasmid. The shdA gene from pAg30 plasmid was excised, purified and then reinserted into the pAg30-p28<sub>3</sub> plasmid (3943 bp) (Fig. 1). A secreted version of Ag30 or Ag30-P28<sub>3</sub> proteins was

**Table 1**  
List of oligonucleotides used to amplify three copies of p28 and SCOT sequences.

Fragment	Name	Sense	Sequence	Restriction endonuclease <sup>a</sup>	Size (bp)
p28 template	p28-1	Foward	5'CGAATCTAGAGGCGGTGGCGGTAGCAGCGGCGGTGGCGGCA GCAGCAAATTCCTGACCACCGGAAAGATAAGAACCCTGG3'	XbaI	144
	p28-2	Reverse	5'CGCGGCTAGCACTAGTCGCATAGCTGGTCGCAACCACGAAATA CAGCTGTTCCCGGATCTCCACGCGGTTCTTATCTTCCGGG3'	NheI, SpeI	
p28-A	p28-a	Foward	5'TATCCTCGAGGCGGTGGCGGTAGC3'	XhoI	144
	p28-b	Reverse	5'GGCCAAGCTTCGCATAGCTGGTCG3'	HindIII	
p28-B	p28-c	Foward	5'ATAGAAGCTTGGCGGTGGCGGTAGC3'	HindIII	144
	p28-d	Reverse	5'GGCCATATGCGCATAGCTGGTCGC3'	NdeI	
p28-C	p28-e	Foward	5'AATTCATATGCTCGAGGCGGTGGCGGT3'	NdeI	144
	p28-f	Reverse	5'GGCAACTAGTCGCATAGCTGGTCGC3'	SpeI	
p28 <sub>3</sub> (tandem repeats)	Null-SEQ-1	Foward	5'TGCTAGAACAGATCTCGAGGGCG3'	XbaI	432
	Null-CDS2	Reverse	5'AGGATCCATGCATGCTAGCCGCATAGCTGGTCGCTCCAC3'	BamHI, NsiI, NheI	
SCOT	Scot-E1	Foward	5'CTAGAAAACGCCCGGGCGGTGGCGGTGGCAAACCGCGG	XbaI	76
	Scot-E2	Reverse	GGTGGCGGTGGCCGAAACCGCTAGCATGCATG3' 5'GATCCATGCATGCTAGCGGCTTTCGGGCCACCGCCCGG GTTGCCACCGCCACCGCCGGCGT3'	BamHI, NsiI, NheI	

<sup>a</sup> Restriction enzyme sites underlined.



**Fig. 1.** Schematic representation of plasmid constructions. Synthetic p28 DNA template encoding amino acid corresponding to the murine CR2 binding site of C3d was obtained by PCR. p28 template was used to generate p28-A, p28-B and p28-C copies with restriction enzyme sites XhoI, HindIII, NdeI and SpeI and then inserted into the transit vector. A second round of PCR was performed in order to amplify the cassette p28<sub>3</sub> with XbaI and BamHI restriction enzymes sites and finally inserted into pAg30 plasmid, creating the pAg30-p28<sub>3</sub> plasmid. A modified plasmid containing a sequence encoding proteolytic cleavage sites for the OmpT protease (SCOT) was constructed using the isoschizomers NheI and XbaI, generating the pAg30-p28<sub>3</sub>-SCOT plasmid.



generated by inserting a short DNA sequence (SCOT) encoding proteolytic cleavage sites for Omp T protease (KRPGGGGKRGGGGPKR) (Ruiz-Olvera et al., 2003 and Luria-Perez et al., 2007) between the junction of sequences encoding ShdA autotransporter and P28<sub>3</sub> adjuvant (Fig. 1).

All restriction enzymes were purchased from New England Biolabs (Beverly, MA, USA). PCR reagents and plasmid preparation kits were purchased from Invitrogen (Palo Alto, CA, USA) and Qiagen (Qiagen, México), respectively. *Salmonella* preferential codon usage was taken into account during the design of the oligonucleotides (Miller, 1992).

In this study, all engineered constructs derived from pAg30 plasmid were confirmed by Sanger sequencing using the BigDye<sup>®</sup> Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and the pNirI primer (5'TTC AGG TAA ATT TGA TAC ATC AAA 3'). Sequencing reactions were run on an ABI Prism 310 genetic analyzer (Applied Biosystems). Subsequently, the sequenced plasmids were electroporated into strains of attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium SL3261.

## 2.2. Culture and induction conditions

*Escherichia coli* DH5 $\alpha$  was cultured on brain heart infusion (BHI) agar plates at 37 °C with 100  $\mu$ g/mL of ampicillin. The *Salmonella* strains were cultured by supplementing the medium with 0.01% 2, 3-dihydroxybenzoic acid (DHB; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). When the culture reached the late logarithmic growth phase (Optical density [OD]<sub>600</sub> = 1.0), 1.5  $\times$  10<sup>9</sup> cells (100  $\mu$ L) were transferred to 250 mL of thioglycolate medium (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) supplemented with 100  $\mu$ g/mL of ampicillin and DHB to induce the nirB promoter (Oxer et al., 1991). Bacteria were incubated anaerobically at 37 °C in a BBL Gas Pak Anaerobic System (Becton Dickinson Microbiology Systems, Cockeysville, MD, USA) until [OD]<sub>600</sub> = 1.0 was reached (approximately 6 h).

## 2.3. Analysis of Ag30 fusion proteins in *Salmonella* total extracts and supernatants by western and dot blot analyses

Expression of the fusion proteins was analyzed by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) of whole-cell lysate of *Salmonella* strains. *Salmonella* transformed with pAg30 and pENP (empty vector that expresses ShdA-FLAG) (Pompa-Mera et al., 2011) were included as controls. The samples were electrophoresed under reducing conditions (1% SDS, 140 mM 2-mercaptoethanol, 95 °C, 10 min) in 10% acrylamide gels and then stained with Coomassie blue dye or transferred onto nylon membranes (Millipore, Bedford, MA, USA). Immuno-blotting of the fusion proteins was performed with a monoclonal anti-FLAG antibody conjugated to biotin (biotinylated M2 AntiFLAG<sup>®</sup>, Sigma) and diluted at 1:250 in PBS-5% skim milk. After washing, an HRP-Streptavidin conjugate (Zymed<sup>®</sup>) diluted at 1:500 was applied. The immune reaction was revealed with 4-chloro-1-naphthol-30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in PBS (pH 7.4).

For the dot-blot analysis, bacterial culture supernatants (100 mL) were collected and centrifuged at 13,000g and then membrane filtered (0.22  $\mu$ m). Supernatants were precipitated with saturated trichloroacetic acid solution (TCA) that was supplemented with acetone 10% (v/v). The suspensions were centrifuged at 13,000g for 1 h at 4 °C, and the pellets were collected and re-suspended in 200  $\mu$ L of saturated Tris-base buffer. The protein concentration was measured, and 50  $\mu$ g was dropped and dried directly onto nitrocellulose membranes. Immuno-detection was performed as described earlier.

## 2.4. Indirect immunofluorescence assays (IFA) and flow cytometry analysis of recombinant *Salmonella* strains

The surface expression of fusion proteins was evaluated by flow cytometry of *Salmonella* transformed with pAg30-SCOT, pAg30-p28<sub>3</sub> or pAg30-p28<sub>3</sub>-SCOT plasmids and pAg30 and pENP (empty vector that expresses ShdA-FLAG), (Pompa-Mera et al., 2011) were included as controls. In order to induce the expression of the fusion proteins, bacteria were cultured under anaerobic conditions for 6 h. After induction, the bacterial strains were harvested, washed twice with PBS, incubated with the monoclonal anti-FLAG antibody conjugated to biotin diluted at 1:50 in PBS for 60 min at room temperature with agitation. Bacteria were washed twice with PBS and incubated with FITC-Streptavidin conjugate (Zymed<sup>®</sup> Laboratories, Invitrogen, CA, USA) at 1:100 for 30 min at room temperature in the dark. Bacteria were observed using a fluorescence microscope (BX-40; Olympus) and analyzed in a flow cytometer (van der Waaij et al., 1994) (Becton Dickinson, Bedford, MA, USA).

## 2.5. Parasite antigens

*T. spiralis* (MSUS/MEX/91/CM-91) was maintained in Sprague-Dawley rats that were orally infected with 3000 muscle larvae. Muscle larvae were recovered from muscle of infected rats at 28 days post infection by the artificial digestion method, using 1% pepsin/HCl solution for 3 h at 37 °C in a shaker incubator and muscle larvae were recovered by sedimentation. Parasites were washed several times with PBS and crude homogenate antigen (CHA) was obtained by homogenization at 4 °C with a glass grinder in PBS. After homogenization, samples were centrifuged at 600g for 30 min at 4 °C.

## 2.6. Animals and immunization schedules

Male BALB/c mice weighing 20–25 g and aged 4–6 weeks were used throughout the study. Animal experiments were performed according to Norma Oficial Mexicana (NOM-062-Z00-1999) published on August 22, 2009. In addition, animal protocols were approved by the Ethics Committee of the Mexican Institute of Social Security. Mice were maintained under specific pathogen-free conditions with positive-pressure filtered air and sterilized food and water. Routine stool examinations were performed to determine the presence of intestinal parasites.

On day 0, five groups of 17 animals each were immunized with attenuated *Salmonella* transformed with pENP, pAg30, pAg30-SCOT, pAg30-p28<sub>3</sub> or pAg30-p28<sub>3</sub>-SCOT plasmids. A PBS-administered group was included as the control. All bacterial strains were cultured under anaerobic conditions and harvested in the late logarithmic growth phase. Mice received three doses of 10<sup>9</sup> CFU of recombinant strains in 20  $\mu$ L of PBS by intranasal route (Galen et al., 1997), at 3-week intervals and maintained with 0.6 mg of ampicillin/mL in their drinking water.

## 2.7. In vivo colonization of *Salmonella* strains and permanence of recombinant plasmids

In order to evaluate the colonization of recombinant *Salmonella* strains, two mice per group were sacrificed 5 days after each immunization (on days 5, 25 and 47), and their spleens were recovered. Spleen homogenates were obtained according to Kramer et al. (2003), and they were incubated overnight in BHI plates in the presence of 100  $\mu$ g of ampicillin/mL and CFU were counted. Plasmid permanence was demonstrated by PCR using FLAG-SEQ-1 (5' GAT TAC AAG GAT GAC GAC 3') and ShdA-Rv (5'GAG GGT CTG CAT TTG CAG 3') primers.

## 2.8. Protection assays

To assess protection, groups of 10 immunized animals were challenged at day 53 (10 days after the last immunization) with 300 *T. spiralis* muscle larvae. Adult worms were recovered from the intestine 8 days after infection, as described by McGuire et al. (2002). Adult parasites/mouse were counted and the mean  $\pm$  S.D. for each group was calculated. Percentage of load reduction was calculated with respect to the infection control.

## 2.9. Collection of sera

Blood samples from the non-immunized and *Salmonella*-immunized animals were collected on days 15, 30 and 45 and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  in order to determine IgG and IgG1 antibodies by ELISA. Pre-immune serum was collected from all the groups. Briefly, mice from all groups were anesthetized and blood was sampled from the retro orbital puncture. Serum was separated by centrifugation at 1500g.

## 2.10. Intestinal lavage

Intestinal secretions were collected according to Ben-Smith et al. (1999), with some modifications. Two mice from each of the immunized groups and the non-immunized control group were sacrificed on days 5, 25 and 47, and the small intestine was removed. PBS with *N*-alpha-tosyl-L-lysinyll-chloromethylketone (TLCK) (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (Sigma) and *N*-tosyl-L-phenylalanine-chloromethylketone (TPCK) (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (Sigma) was flushed through the intestine, which was gently massaged before the fluid was recovered. The samples were pooled and centrifuged at 650g for 10 min at  $4^{\circ}\text{C}$ , further clarified by centrifugation at 27,000g, and then supplemented with 1% of sodium azide (Sigma). The collected samples were stored at  $-70^{\circ}\text{C}$ .

## 2.11. Measurement of antibodies

Specific total IgG and IgG1 systemic antibodies and local IgA against *T. spiralis* muscle larvae CHA were determined by ELISA. Flat-bottom well microtiter plates (Nunc) were coated with CHA at 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  in 100  $\mu\text{L}$  of carbonate buffer (pH 9.5) overnight at  $4^{\circ}\text{C}$ . The plates were then blocked with 3% BSA-PBS plus 0.05%-Tween 20 and incubated with serum samples at 1:100 dilution or intestinal lavage neat for 2 h at  $37^{\circ}\text{C}$ . Goat anti-mouse IgG conjugated to peroxidase (Zymed Laboratories Inc., San Francisco, CA, USA) (0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and goat anti-mouse IgA conjugated to peroxidase (ABD Serotec, Oxford, UK) were added and incubated for 2 h at  $37^{\circ}\text{C}$ . The sera and secondary antibodies were diluted in 3% BSA-PBS 0.05%-Tween 20. Between incubations, the plates were washed three times with PBS-0.05% Tween 20. Peroxidase activity was visualized with tetramethylbenzidine- $\text{H}_2\text{O}_2$  (R&D Systems). The reaction was stopped with 50  $\mu\text{L}$  of 2N  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , and  $\text{OD}_{450}$  was determined using an ELISA reader (ELx808 Ultra Microplate Reader, Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, USA).

## 2.12. Indirect fluorescent assay (IFA)

The recognition of *T. spiralis* native gp43 by IgA present in the intestine of animals immunized with *Salmonella* carrying pENP, pAg30, pAg30-SCOT, pAg30-p28<sub>3</sub> or pAg30-p28<sub>3</sub>-SCOT plasmids was determined by IFA. Intestinal lavage fluid from non-immunized mice (treated only with PBS) was used as control. Muscle larvae were fixed in 10% formaldehyde solution in PBS and further incubated with intestinal lavages (1:10 dilution) obtained at day 47 (5 days after third immunization) for 2 h at  $37^{\circ}\text{C}$ , followed by five washes with PBS-0.1% Tween 20 and one wash with PBS. The parasite preparations were incubated with goat anti-mouse IgA-FITC (Cat Number M31101,

Invitrogen, CA, USA) at 1:1000 dilution for 90 min. Five washes were performed, and the slides were observed using a fluorescence microscope (BX-40; Olympus).

## 2.13. Cytokines assays and cell supernatants

Cells from spleens and Peyer's patches (PP) were harvested on day 54 from non-immunized and *Salmonella*-immunized mice that were not challenged with *T. spiralis* muscle larvae. Cell suspensions were prepared as previously recommended (Grencis et al., 1991). In order to lyse erythrocytes, splenocytes were treated with 0.15 M  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 10 mM  $\text{NaHCO}_3$ , and 0.12 mM EDTA for 10 min at  $4^{\circ}\text{C}$ . The cell suspension was centrifuged at 240g at  $4^{\circ}\text{C}$  for 10 min. Cell pellets were washed twice in RPMI-1640 medium. Pooled suspensions of spleen and PP were cultured in 96-well, flat-bottom tissue-culture plates (Nunc-Immuno™ MaxiSorp) at a density of  $1 \times 10^6$  cells/well in RPMI-1640 supplemented with penicillin (100 U/mL), streptomycin (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), 2 mM L-glutamine, 1 mM HEPES, and 10% fetal bovine serum (FBS). The cells were stimulated with CHA (50  $\mu\text{g}$ ) and incubated for 48 h at  $37^{\circ}\text{C}$  in a humidified atmosphere of 5%  $\text{CO}_2$ . Non-stimulated cells were included as the negative control. Supernatants were collected, aliquoted, and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . IL-5 and IFN-gamma were quantified in duplicate samples of pooled supernatants obtained from stimulated spleen and PP, using a Quantikine kit (R&D System) for mouse IL-5 (Cat. no. M5000) and mouse IFN-gamma (Cat. no. MIF00), following the manufacturer's instructions. Assay sensitivity was  $<7$  pg/mL for IL-5 and  $<2$  pg/mL for IFN-gamma.

## 2.14. Statistical analysis

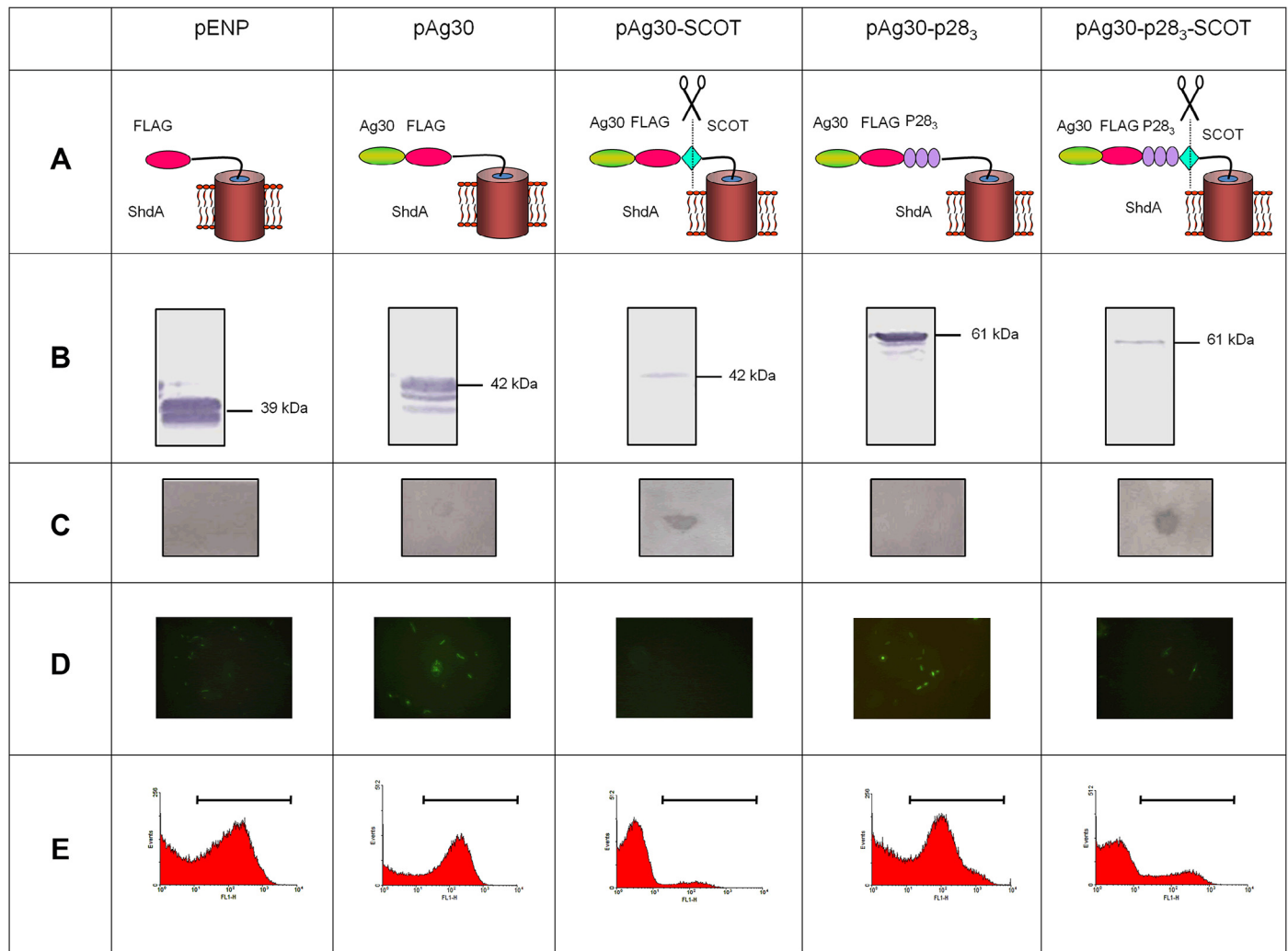
Intra- and intergroup statistical analyses were performed using the nonparametric Kruskal-Wallis ANOVA. Post hoc comparisons were made using the Mann-Whitney *U* test and the Tukey post-hoc test (Prism 4 for Windows®). Differences were considered significant at  $P < 0.05$ .

## 3. Results

### 3.1. Construction and in vitro characterization of recombinant *Salmonella* vaccines against *Trichinella spiralis*

Three expression vectors were constructed (Fig. 1): (a) pAg30-SCOT, in which a sequence encoding a proteolytic cleavage site for *Omp T* protease (SCOT) was subcloned downstream of the Ag30 sequence that allowed the secretion of Ag30 to the external milieu; (b) pAg30-p28<sub>3</sub>, where p28<sub>3</sub> cassette was subcloned downstream of Ag30 and expressed the 30-mer epitope fused to P28<sub>3</sub> on the outer membrane of *Salmonella*; (c) pAg30-p28<sub>3</sub>-SCOT, in which a p28<sub>3</sub> cassette was subcloned downstream of Ag30 and upstream of the SCOT sequence, encoding for a secretory form of Ag30 fused to P28<sub>3</sub> adjuvant. Figure 2A shows the fusion proteins expressed by the different systems. *Salmonella* transformed with plasmids pAg30 and pENP were included as controls (Pompa-Mera et al., 2011).

The functionality of these expression systems was confirmed before the vaccination experiments by analyzing the presence of the fusion proteins in bacterial total extracts and supernatants using western blot and dot blot (Fig. 2B,C, respectively). The ability of attenuated *Salmonella* strains to express the fusion proteins was analyzed by flow cytometry and immunofluorescence (Fig. 2D,E, respectively). In all assays, an anti-FLAG antibody was used as the primary antibody. The western-blot analyses revealed bands with the expected sizes of 39 kDa, 42 kDa and 61 kDa, which corresponded to the fusion proteins produced by *Salmonella* transformed



**Fig. 2.** Autodisplay and secretion of Ag30 epitope by *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* SL3261. (A) Model of the fusion protein either expressed on the bacterial surface or secreted to the external milieu by *Salmonella* pAg30 strains and expression of the fusion protein ShdA-FLAG by *Salmonella* pENP, (B) western blot analysis of crude bacterial extracts from *Salmonella* transformed with the indicated plasmids and reacted with anti-FLAG. Bands correspond to fusion protein anchored to the outer membrane of *Salmonella*; (C) dot-blot assay of proteins delivered to supernatants, precipitated with TCA and reacted with anti-FLAG; (D) indirect immunofluorescence assay analysis; (E) flow cytometry of *Salmonella* transformed with the different plasmids.

with pENP, pAg30 and pAg30-p28<sub>3</sub>, respectively (Fig. 2B). Weak bands of 42 kDa and 61 kDa were evident in total extracts from *Salmonella* strains transformed with pAg30-SCOT and pAg30-p28<sub>3</sub>-SCOT. However, their fusion proteins were detected in the bacterial supernatants by dot-blot analysis (Fig. 2C). IFA (Fig. 2D) and flow cytometry (Fig. 2E) confirmed that fusion proteins encoded by pENP, pAg30 and pAg30-p28<sub>3</sub> plasmids were expressed on the bacterial surface through the autotransporter ShdA. The flow-cytometry analysis showed that the expression of these fusion proteins reached a 2-log, relative-light-unit displacement, compared to the controls. Similar protein expression kinetics between the recombinant strains was also demonstrated (data not shown). As expected, flow cytometry and IFA did not detect the target protein on *Salmonella* strains pAg30-SCOT and pAg30-p28<sub>3</sub>-SCOT because they expressed the secreted form of Ag30 antigen. In addition, the functionality of the cleavage site for OmpT protease (SCOT) in these constructs was further demonstrated using *E. coli* BL21-DE3 (*OmpT*<sup>-</sup>) and *E. coli* XL-10 GOLD (*OmpT*<sup>+</sup>) strains transformed with the plasmids pAg30-SCOT and pAg30-p28<sub>3</sub>-SCOT by means of flow cytometry using anti-FLAG antibody (data not shown).

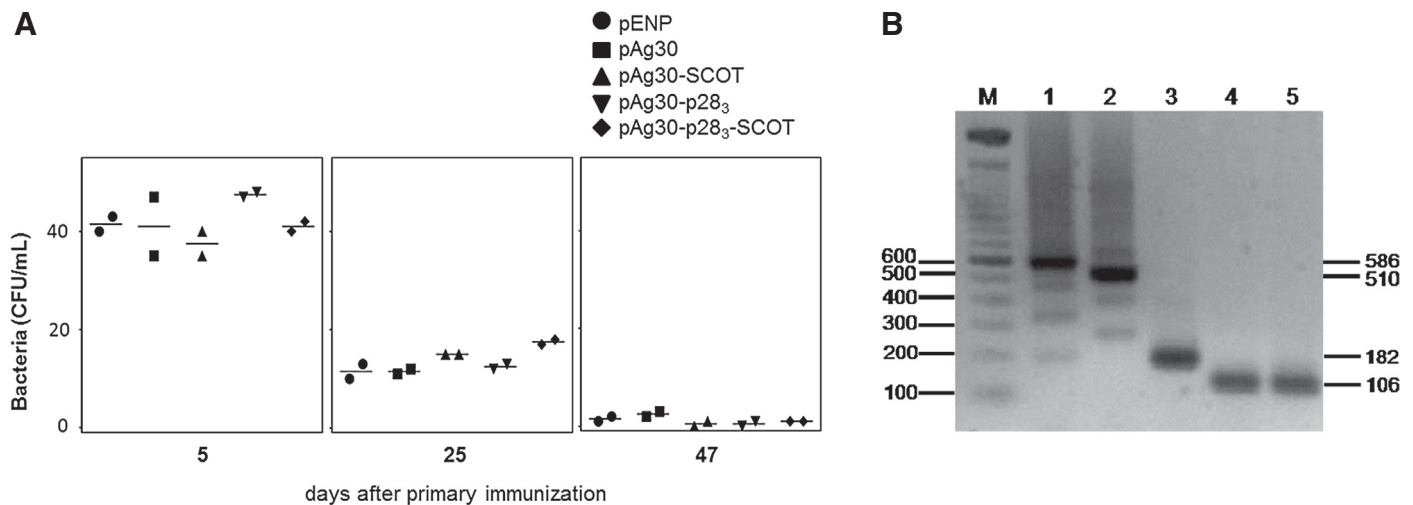
### 3.2. Spleen colonization by recombinant *Salmonella* strains and plasmid permanence

Spleen colonization by recombinant *Salmonella* strains was analyzed at 5, 25 and 47 days after primary immunization. Recombinant bacteria were recovered in all *Salmonella*-immunized groups, however, a gradual reduction in the number of viable recombinant bacteria was observed from day 5 to 47. The average of CFU recovered from spleen at day 5 was 35–43, decreasing to 10–18 at day 25 and a maximum of 3 CFU at day 47 (Fig. 3A). Furthermore, the permanence of the recombinant plasmids in isolated bacteria was demonstrated by PCR in all the immunized groups (Fig. 3B).

### 3.3. Protective immunity induced by *Salmonella* strains against *T. spiralis* infection

Adult worm burden from mice immunized with *Salmonella* pAg30 vaccines was significantly different compared to the infection control and *Salmonella* pENP group ( $P < 0.05$ ). *Salmonella* transformed with pAg30 and pAg30-SCOT reduced the adult worm burden 75% and



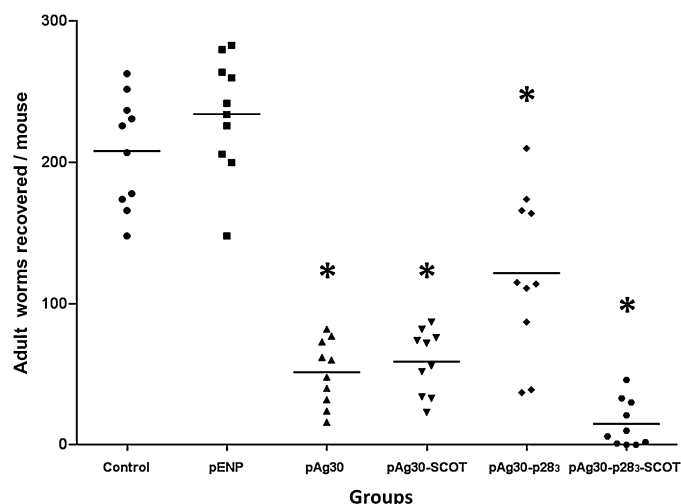


**Fig. 3.** In vivo colonization of *Salmonella* strains and permanence of recombinant plasmids analyzed at different days after the primary immunization. (A) Bacteria recovered from spleen of immunized mice at days 5, 25 and 47 after primary immunization and grown in BHI broth in the presence of ampicillin. The horizontal line represents the mean of each data set. (B) Amplification by PCR of the DNA sequence encoding for fusion proteins, using FLAG-SEQ-1 and ShdA-Rv primers described in Section 2. Plasmids used as template were obtained from *Salmonella* strains recovered at day 25 after primary immunization. (1) pAg30-p28<sub>3</sub>-SCOT; (2) pAg30-p28<sub>3</sub>; (3) pAg30-SCOT; (4) pAg30 and (5) pENP.

72%, respectively. Interestingly, *Salmonella* pAg30-p28<sub>3</sub>-SCOT induced the highest level of local protection against *T. spiralis* adult worm (92.8%). In contrast, *Salmonella* pAg30-p28<sub>3</sub> induced the lowest level of protection (42%) (Fig. 4).

#### 3.4. Characterization of the immune response elicited by *Salmonella* strains

The humoral immune response induced by recombinant *Salmonella* vaccines was evaluated. It is worth noting that *Salmonella* carrying pAg30-SCOT and pAg30-p28<sub>3</sub>-SCOT elicited high levels of antigen-specific IgA at days 5 and 25, but a slight decrease was



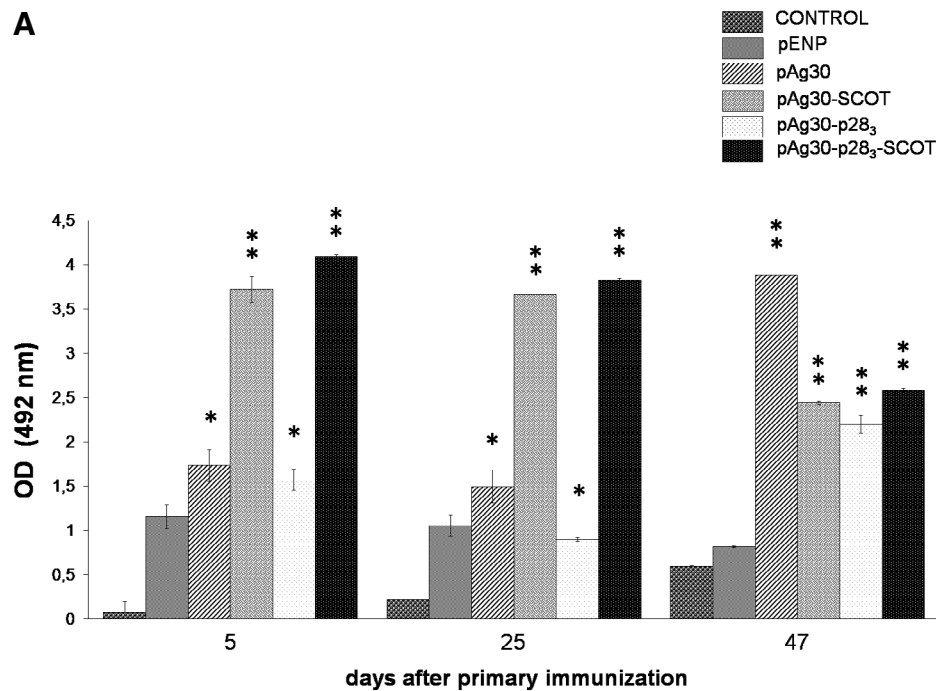
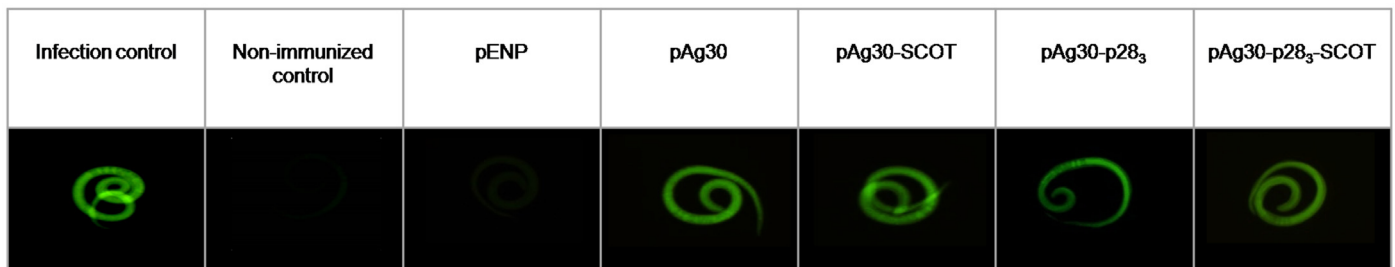
**Fig. 4.** Protection in mice induced by the different *Salmonella* strains against the challenge with *Trichinella spiralis* muscle larvae. BALB/c mice were immunized by intranasal route with three doses of 10<sup>9</sup> UFC of *Salmonella* transformed with pENP, pAg30, pAg30-SCOT, pAg30-p28<sub>3</sub> or pAg30-p28<sub>3</sub>-SCOT plasmids. A PBS-administered group was included as control. Animals were challenged at day 53 with 300 *T. spiralis* muscle larvae. Adult worms were recovered at day 8 after challenge. Adult worm reduction in all immunized groups was significantly different with respect to control and *Salmonella* pENP group ( $P < 0.05$ ). The horizontal line represents the mean of each data set ( $n = 10$ ). Significant differences between groups are indicated (\* $P < 0.05$ ).

detected by day 47. On the contrary, IgA levels induced by *Salmonella* carrying pAg30 and pAg30-p28<sub>3</sub> increased until day 47 (Fig. 5A). At day 47, IgA levels induced by *Salmonella* pAg30 vaccines were statistically different compared to the non-immunized control and *Salmonella* pENP group ( $P < 0.0001$ ). Importantly, it was demonstrated by IFA that local IgA antibodies raised against Ag30 fusion proteins (day 47) recognized native gp43 on the surface of *T. spiralis* muscle larvae (Fig. 5B). No reactivity was observed with intestinal lavage collected from non-immunized and *Salmonella* pENP vaccinated mice.

Regarding the systemic immune response induced by *Salmonella* strains carrying pAg30, pAg30-p28<sub>3</sub>, and pAg30-p28<sub>3</sub>-SCOT, an increase of antigen-specific total IgG (Fig. 6A) and IgG1 (Fig. 6B) were observed until day 45. The highest IgG1 levels were induced by *Salmonella* pAg30, followed by *Salmonella* pAg30-p28<sub>3</sub> and *Salmonella* pAg30-p28<sub>3</sub>-SCOT, all of them were statistically different with respect to the non-immunized and *Salmonella* pENP control groups ( $P < 0.0001$ ). Notably, when the mice were immunized with *Salmonella* pAg30-SCOT, very low levels of IgG1 were detected ( $P > 0.05$ , compared to the non-immunized and *Salmonella* pENP control groups).

#### 3.5. Cytokine production from antigen-stimulated spleen and Peyer's patches cells of vaccinated mice

To investigate the cytokine production elicited by the *Salmonella* strains, spleen and PP cells were recovered from non-immunized and immunized mice and further stimulated in vitro with CHA. Cells without stimulation were included as the negative control. Supernatants were collected 48 h later, and IFN-gamma and IL-5 were quantified by ELISA. The analysis of IFN-gamma levels revealed that PP cells from mice immunized with the different *Salmonella* pAg30 strains produced low amounts of this cytokine, which was not significantly different with respect to the negative control and *Salmonella* pENP group ( $P > 0.05$ ). Spleen cells produced higher levels of IFN-gamma than the PP cells. In relation to mice immunized with *Salmonella* pAg30 strains, spleen cells produced IFN-gamma levels (22–31 pg/mL) significantly higher with respect to the negative control (11–13 pg/mL) and *Salmonella* pENP group (14–18 pg/mL) ( $P < 0.05$ ) (Fig. 7A). Regarding IL-5, spleen and PP cells from mice

**B**

**Fig. 5.** Parasite specific IgA. Intestinal lavages were recovered from mice immunized as in Fig. 4 with recombinant *Salmonella* strains at different times. (A) Specific IgA antibodies against crude homogenate antigen from *T. spiralis* muscle larvae were determined by ELISA. \*\*Significantly different with respect to control and *Salmonella* pENP group ( $P < 0.0001$ ). \*Significantly different with respect to control group ( $P < 0.01$ ). Data are presented as the mean  $\pm$  S.D. B. Recognition of muscle larvae surface by local IgA antibodies demonstrated by IFA.

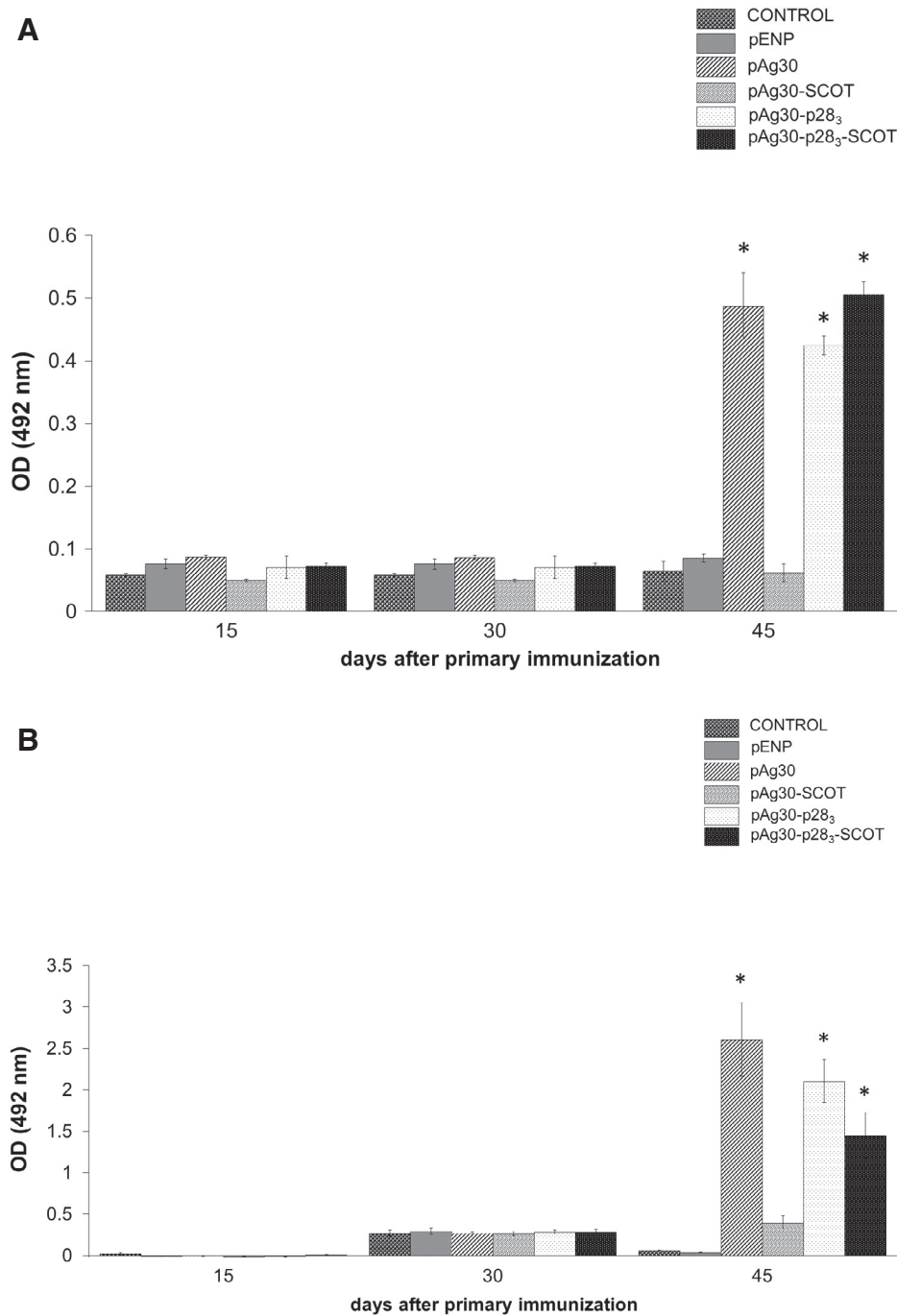
immunized with *Salmonella* pAg30 strains, with the exception of spleen cells from *Salmonella* pAg30-p28<sub>3</sub>-vaccinated mice, produced significantly higher amounts compared to the negative control and *Salmonella* pENP vaccinated group ( $P < 0.05$ ) (Fig. 7B). It is worth noting that PP cells from mice immunized with the secreted form of Ag30 either fused or not fused to P28<sub>3</sub> produced the highest levels of IL-5 (182–205 pg/mL). *Salmonella* pAg30-p28<sub>3</sub> induced the lowest levels of IL-5 in both types of immune cells (58–78 pg/mL).

#### 4. Discussion

Ideally, successful vaccines against pathogenic enteric parasites must activate mucosal defenses in the intestinal tract. Numerous live vectors and adjuvant-based approaches have been employed to achieve effective vaccination by mucosal routes, with varying degrees of success (Abdul-Wahid and Faubert, 2007; Chabalgoity et al., 2000; Petavy et al., 2008; Pompa-Mera et al., 2011; Wallach et al., 2008; Yang et al., 2010). Live attenuated *Salmonella* strains have been used to deliver heterologous antigens that elicit an immune response and protection against a number of viral, bacterial, and parasite pathogens in a variety of hosts (Cazorla et al., 2008; Chinchilla et al., 2007; Konjufca et al., 2006; Petavy et al., 2008). The

delivery of recombinant proteins by live vectors allows inducible, stable protein expression and efficient secretion (Chen and Schifferli, 2007; Garmory et al., 2003; Luria-Perez et al., 2007). In this regard, recombinant *Salmonella typhimurium* SL3261 and *S. typhi* CVD 908-htrA strains secreting *Plasmodium falciparum* SSP-2 antigen based on the hemolysin secretion system induced protection against the parasite infection. However, low protection was achieved when parasite antigen remained intracellularly in the vaccine strain (Gómez-Duarte et al., 2001). Moreover, *Salmonella*-based vaccine systems are among the most advanced and promising technologies developed to induce immunological protection against enteric pathogens because of their ability to both colonize the small intestine and invade non-phagocytic epithelial cells, thus allowing access to the underlying lymphoid tissue (Jazayeri et al., 2012).

The use of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium SL3261 has been previously evaluated by us as a carrier vehicle of *T. spiralis* antigens (Pompa-Mera et al., 2011). This system allowed the autodisplay of the Ag30 epitope of *T. spiralis* muscle larvae on the bacterial surface through the use of the autotransporter ShdA, which maintained the antigen conformation and immunological properties against the enteral phase of *T. spiralis*. Recombinant *Salmonella* vaccine elicited a mixed Th1/Th2 immune response with predominance of

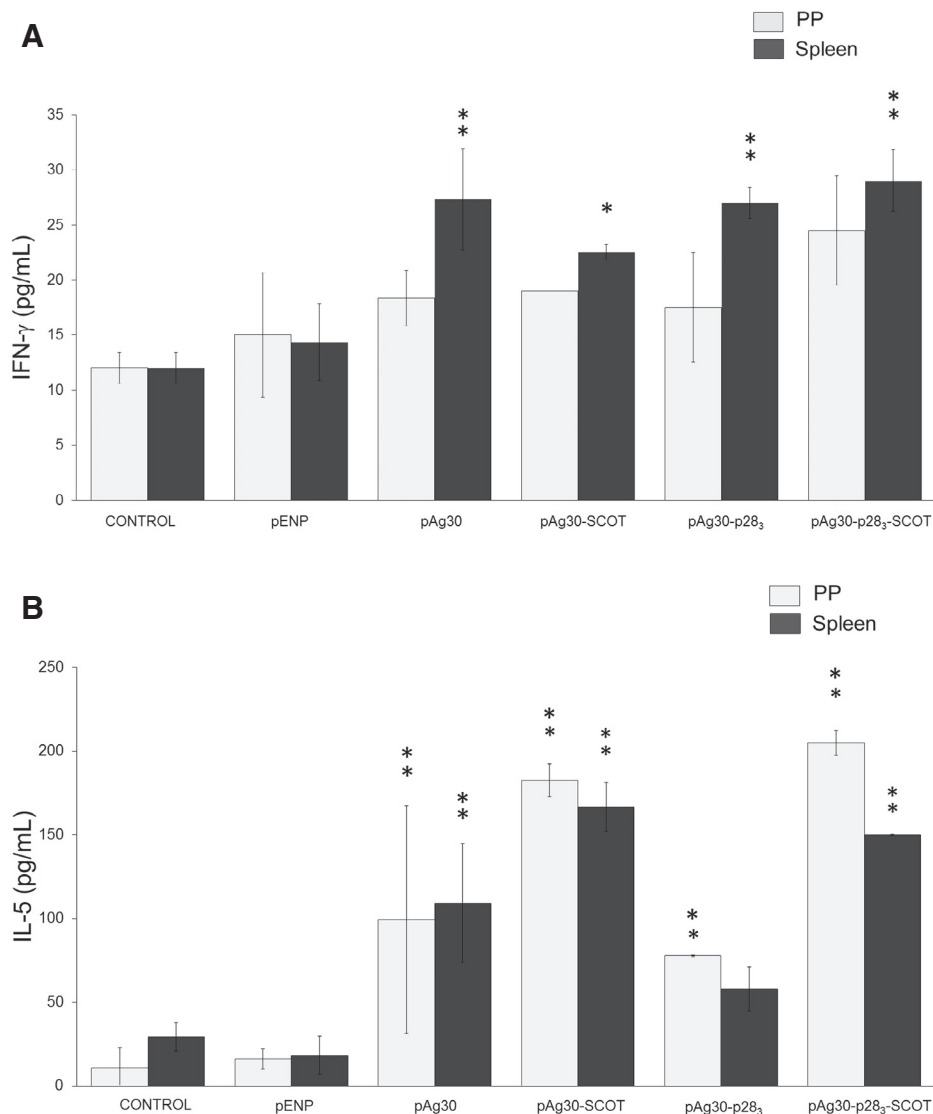


**Fig. 6.** IgG (A) and IgG1 (B) response elicited by recombinant *Salmonella* strains. Mice were immunized as in Fig. 4 and serum samples were collected at days 15, 30 and 45 after first immunization. Antibodies against *T. spiralis* muscle larvae crude homogenate antigen were determined by ELISA. \*Significantly different with respect to control and *Salmonella* pENP group ( $P < 0.0001$ ). Data are presented as the mean  $\pm$  S.D.

Th2 response and conferred protection against the enteral stage of *T. spiralis*.

Aiming to improve the protection conferred by *Salmonella* pAg30 (Pompa-Mera et al., 2011), herein, the use of a molecular adjuvant was investigated. In this regard, C3d, the final degradation product of the complement C3 component, was defined as a powerful molecular adjuvant that enhanced the generation of protective immunity against pathogens (Bergmann-Leitner et al., 2006; Bhardwaj et al., 2010; Carroll and Isenman, 2012; Dempsey et al., 1996). C3d adjuvant activity involves mainly binding to its receptor CR2 (CD21), which is located on B cells and follicular dendritic cells (FDC). On

B cells, C3d-coated antigen interacts with CD21, CD19, and CD81 surface molecules. Simultaneously, C3d-tagged antigens are cross-linked with surface-anchoring immunoglobulin (B-cell receptor, BCR). Thus, this co-engagement lowers the threshold of B-cell activation, and only antigen-specific B-cells become activated and start secreting antibodies. Notably, it has been reported that C3d-tagged antigens induce higher titers of antigen specific antibodies (Toapanta and Ross, 2006). Evidence has also shown that C3d polarizes the immune response toward a Th2 phenotype (Movsesyan et al., 2008; Wang et al., 2006b), with IgG1 as the predominant isotype (Dunn et al., 2010). It has been shown to be



**Fig. 7.** IFN-gamma and IL-5 elicited by recombinant *Salmonella* strains. Animals were immunized as in Fig.4 and Peyer's patches (PP) and spleen cells were obtained at day 54 after first immunization and further cultured for 48 h in the presence of *T. spiralis* crude homogenate antigen (50 µg). Cells from non-treated mice were included as negative control. Levels of IFN-gamma (A) and IL-5 (B) were determined in supernatants by ELISA. \*Statistically different with respect to control ( $P < 0.05$ ). \*\*Statistically different with respect to control and *Salmonella* pENP group ( $P < 0.05$ ). Data are presented as the mean  $\pm$  S.D.

an efficient adjuvant at the mucosal level (Bower and Ross, 2006). The C3d receptor binding site, defined as a 28 amino acid peptide (P28), has been shown to have adjuvant properties similar to the entire C3d molecule when used in multiple copies (Bergmann-Leitner et al., 2007; Bower and Ross, 2006; Zhang et al., 2011).

Hence, the *Salmonella* pAg30 vaccine was engineered to express the Ag30 peptide from *T. spiralis* fused to three copies of P28 adjuvant, and was either expressed on the bacterial surface or secreted to the milieu. The secretion of heterologous antigens by recombinant *Salmonella* can be achieved by different approaches such as the use of type I secretion systems or by the use of proteolytic cleavage sites for Omp T protease (SCOT sequence) (Gómez-Duarte et al., 2001; Ruiz-Olvera et al., 2003 and Luria-Perez et al., 2007). The data obtained in this study showed that high levels of protection were elicited against *T. spiralis* enteral stage (72% and 92.8%) when Ag30 was secreted in vivo by *Salmonella* pAg30-SCOT and *Salmonella* pAg30-p28<sub>3</sub>-SCOT, respectively. The protection induced by *Salmonella* pAg30-SCOT was slightly lower than that obtained with *Salmonella* pAg30 (72% vs. 75%). However, the lowest protection was achieved by *Salmonella* pAg30-p28<sub>3</sub> (42%), suggesting that in this

case the fusion of Ag30 to P28<sub>3</sub> was not sufficient to induce significant protection against *T. spiralis* infection.

It is worth noting that the C-terminus of the multiple copies of P28 in pAg30-p28<sub>3</sub> was flanked by the ShdA autotransporter anchoring the fusion protein to the bacterial outer membrane, which could interfere with their capacity to bind CD21, thus explaining the low protection induced by *Salmonella* pAg30-p28<sub>3</sub>. The protection conferred by *Salmonella* pAg30-p28<sub>3</sub>-SCOT (92.8%) supports this observation. In this expression system, the fusion protein is released and the C-terminus of P28<sub>3</sub> is exposed. In fact, Zhang et al. (2011) obtained protection against porcine reproductive and respiratory syndrome virus using a DNA vaccine that encoded for GP5 antigen fused to multiple p28 copies, in which the C-terminus of the adjuvant was free. Several studies have reported the use of C3d or P28-antigen complexes maintaining the C-terminus of the adjuvant exposed (Bower and Ross, 2006; Weiss et al., 2010).

In general terms, the systemic humoral immune response elicited by the *Salmonella* vaccines that expressed Ag30 and Ag30-P28<sub>3</sub> on the bacterial surface showed higher levels of IgG1 in comparison to *Salmonella* strains that secrete Ag30. With respect



to local IgA, *Salmonella* pAg30-SCOT and *Salmonella* pAg30-p28<sub>3</sub>-SCOT elicited high levels of IgA from day 5. However, the non-secreted forms of Ag30 took longer to induce high levels of IgA. These results highlighted the importance of the in vivo secretion of Ag30 for the induction of a local IgA response against *T. spiralis* infection. All *Salmonella* pAg30 vaccines elicited intestinal IgA antibodies that recognized the surface of *T. spiralis* muscle larvae. It is well recognized that IgG1 antibodies play a major role in the control of *T. spiralis* infection during the intestinal phase of the parasite because they interfere with parasite molting and thus inhibit the muscle larvae invasion of epithelial cells (McVay et al., 1998, 2000; Wang et al., 1999). There is also evidence that local IgA reduces the female fecundity, the size of adult worms and inhibits the establishment of *T. spiralis* muscle larvae in the intestinal niche (Inaba et al., 2003a, 2003b). However, when protection data and IgA and IgG1 levels elicited by *Salmonella* vaccines were analyzed, no strong correlation was observed. In this regard, *Salmonella* pAg30-p28<sub>3</sub>-SCOT strain that conferred the highest protection (92.8%) did not show the highest IgG1 levels and the same was true for IgA (day 47). Besides, *Salmonella* strains pAg30-SCOT and pAg30-p28<sub>3</sub> that reduced 72% and 42% the parasite load elicited a similar IgA response and *Salmonella* pAg30-p28<sub>3</sub> elicited higher IgG1 levels than *Salmonella* pAg20-p28<sub>3</sub>-SCOT. On the other hand, protection induced by *Salmonella* vaccines was indeed strongly related to IL-5 production. However, it should be considered that IgG1 and IgA levels were not analyzed in *Salmonella*-immunized animals after *T. spiralis* challenge, so it cannot be rule out that their levels could have increased at the time that protection was determined (8 days after challenge). Indeed, it has been demonstrated that *T. spiralis* challenge enhances the antibody, cytokines and cellular responses in the intestinal environment of vaccinated animals (Cui et al., 2013; Martínez-Gómez et al., 2009; Yang et al., 2010, 2013).

In this study, the immune protection elicited by *Salmonella* strains against *T. spiralis* infection was associated with a mixed Th1/Th2 with predominance of Th2 phenotype. It is worth mentioning that PP cells from *Salmonella* vaccinated mice produced higher IL-5 amounts than spleen cells; the opposite was true for IFN- $\gamma$ , evidencing the role of local Th2 immune response in the protection elicited by the recombinant vaccines. IL-5 production elicited by Ag30 peptide could promote mucosal immunity with the production of IgA. In this regard, the role of IL-5, IL-6 and IL-10 in the induction of secretory IgA has been previously demonstrated (Marinaro et al., 1997). It is worth mentioning that a Th1/Th2 response with predominance of the Th2 phenotype is also observed during *T. spiralis* infection (Yu et al., 2013). Besides, the induction of a Th1/Th2-mixed type of immune response in vaccinated animals against *T. spiralis* infection has also been reported by other authors (Cui et al., 2013; Feng et al., 2013; Li et al., 2013; Yang et al., 2010, 2013).

The modulation of immune responses by helminthic infection can be achieved by the induction of Treg, regulatory B cells, alternative activated macrophages and modulation of dendritic cells (Ashour, 2013). Further studies are required to determine the mechanisms underlying the predominance of Th2 immune response in *Salmonella*-immunized animals, focusing on the production of immuno-modulatory cytokines such as IL-10, which reinforces Treg and inhibits cytokine production by Th1 and Th17 (Beiting et al., 2007; Liu et al., 2011).

Many different approaches have been used to achieve protection against *T. spiralis* infection. Recently, DNA vaccines coding for different *T. spiralis* muscle larvae antigens (TspE1, Ts87, MIF and MCD-1, Tsp10 polypeptide) and phage-displayed parasite specific antigens have been developed, inducing protection in a range of 36–78.6% (Cui et al., 2013; Tang et al., 2012; Wang et al., 2006a; Yang et al., 2010). Protection induced by *Salmonella* pAg30-p28<sub>3</sub>-SCOT vaccine is to our knowledge the highest so far obtained. However, *T. spiralis* vaccine can be improved by the use of another delivery systems and

administration routes (i.e. sublingual), as well as the use of other adjuvant such as Th2 cytokines and the construction of a polyvalent vaccine including epitopes from different stages of *T. spiralis* life cycle. All these alternatives represent attractive and potentially important strategies for the future development of vaccine against *T. spiralis* infection.

### Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

### Acknowledgments

We would like to thank Dr. Aída Jiménez-Corona and Dr. Flavio Terán Rosales for their assistance in the statistical analyses. This work was approved by the IMSS Local Research and Bioethics Committee and was supported by grant from the IMSS-FIS (FIS/IMSS/PROT/534). Ericka Nelly Pompa-Mera was a PhD student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México and was supported by a Ph.D. Fellowship from CONACYT (#49342).

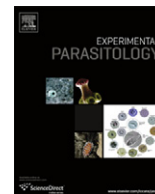
### References

- Abdul-Wahid, A., Faubert, G., 2007. Mucosal delivery of a transmission-blocking DNA vaccine encoding *Giardia lamblia* CWP2 by *Salmonella typhimurium* bactofection vehicle. *Vaccine* 25, 8372–8383.
- Agye-Frempong, M., Catty, D., 1983. The measurement of antigens released by radiation-attenuated *Trichinella spiralis* larvae. *Parasite Immunology* 5, 289–303.
- Ashour, D.S., 2013. *Trichinella spiralis* immunomodulation: an interactive multifactorial process. *Expert Review of Clinical* 9, 669–675. doi:10.1586/1744666X.2013.811187.
- Beiting, D.P., Gagliardo, L.F., Hesse, M., Bliss, S.K., Meskill, D., Appleton, J.A., 2007. Coordinated control of immunity to muscle stage *Trichinella spiralis* by IL-10, regulatory T cells, and TGF- $\beta$ . *Journal of Immunology* 178, 1039–1047.
- Ben-Smith, A., Wahid, F.N., Lammas, D.A., Behnke, J.M., 1999. The relationship between circulating and intestinal *Heligmosomoides polygyrus*-specific IgG1 and IgA and resistance to primary infection. *Parasite Immunology* 21, 383–395.
- Bergmann-Leitner, E.S., Leitner, W.W., Tsokos, G.C., 2006. Complement 3d: from molecular adjuvant to target of immune escape mechanisms. *Clinical Immunology* 121, 177–185.
- Bergmann-Leitner, E.S., Duncan, E.H., Leitner, W.W., Neutzner, A., Savranskaya, T., Angov, E., et al., 2007. C3d-defined complement receptor-binding peptide p28 conjugated to circumsporozoite protein provides protection against *Plasmodium berghei*. *Vaccine* 25, 7732–7736.
- Bhardwaj, N., Heise, M.T., Ross, T.M., 2010. Vaccination with DNA plasmids expressing Gn coupled to C3d or alphavirus replicons expressing Gn protects mice against Rift Valley fever virus. *PLoS Neglected Tropical Disease* 4, e725.
- Bower, J.F., Ross, T.M., 2006. A minimum CR2 binding domain of C3d enhances immunity following vaccination. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 586, 249–264.
- Bruschi, F., Dupouy-Camet, J., 2014. Trichinellosis. In: Bruschi, F. (Ed.), *Helminth Infections and their Impact on Global Public Health*. Springer-Verlag, Wien, pp. 229–273. doi:10.1007/978-3-7091-1782-88.
- Capó, V., Despommier, D.D., 1996. Clinical aspects of infection with *Trichinella* spp. *Clinical Microbiology Reviews* 9, 47–54.
- Carroll, M.C., Iseman, D.E., 2012. Regulation of humoral immunity by complement. *Immunity* 37, 199–207. doi:10.1016/j.immuni.2012.08.002.
- Castillo-Alvarez, A.M., Vaquero-Vera, A., Fonseca-Liñán, R., Ruiz-Pérez, F., Villegas-Sepúlveda, N., Ortega-Pierres, G., 2013. A prime-boost vaccination of mice with attenuated *Salmonella* expressing a 30-mer peptide from the *Trichinella spiralis* gp43 antigen. *Veterinary Parasitology* 194, 202–206. doi:10.1016/j.vetpar.2013.01.056.
- Cazorla, S.I., Becker, P.D., Frank, F.M., Ebensen, T., Sartori, M.J., Corral, R.S., et al., 2008. Oral vaccination with *Salmonella enterica* as a cruzipain-DNA delivery system confers protective immunity against *Trypanosoma cruzi*. *Infection and Immunity* 76, 324–333.
- Chabalgoity, J.A., Moreno, M., Carol, H., Dougan, G., Hormaeche, C.E., 2000. *Salmonella typhimurium* as a basis for a live oral *Echinococcus granulosus* vaccine. *Vaccine* 19, 460–469.
- Cheminay, C., Hensel, M., 2008. Rational design of *Salmonella* recombinant vaccines. *International Journal of Medical Microbiology* 298, 87–98.
- Chen, H., Schifferli, D.M., 2007. Comparison of a fimbrial versus an autotransporter display system for viral epitopes on an attenuated *Salmonella* vaccine vector. *Vaccine* 25, 1626–1633.
- Chinchilla, M., Pasetti, M.F., Medina-Moreno, S., Wang, J.Y., Gomez-Duarte, O.G., Stout, R., et al., 2007. Enhanced immunity to *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein (PfCSP) by using *Salmonella enterica* serovar Typhi expressing PfCSP and



- a PfCSP-encoding DNA vaccine in a heterologous prime-boost strategy. *Infection and Immunity* 75, 3769–3779.
- Cui, J., Wang, Z.Q., Xu, B.L., 2011. The epidemiology of human trichinellosis in China during 2004–2009. *Acta Tropica* 118, 1–5.
- Cui, J., Ren, H.J., Liu, R.D., Wang, L., Zhang, Z.F., Wang, Z.Q., 2013. Phage-displayed specific polypeptide antigens induce significant protective immunity against *Trichinella spiralis* infection in BALB/c mice. *Vaccine* 31, 1171–1177. doi:10.1016/j.vaccine.2012.12.070.
- Dea-Ayuela, M.A., Rama-Iñiguez, S., Bolas-Fernández, F., 2006. Vaccination of mice against intestinal *Trichinella spiralis* infections by oral administration of antigens microencapsulated in methacrylic acid copolymers. *Vaccine* 24, 2772–2780.
- Dempsey, P.W., Allison, M.E., Akkaraju, S., Goodnow, C.C., Fearon, D.T., 1996. C3d of complement as a molecular adjuvant: bridging innate and acquired immunity. *Science* 271, 348–350.
- Dietrich, G., Viret, J.F., Gentschev, I., 2003. Haemolysin A and listeriolysin – two vaccine delivery tools for the induction of cell-mediated immunity. *International Journal of Parasitology* 33, 495–505.
- Dunn, M.D., Rossi, S.L., Carter, D.M., Vogt, M.R., Mehlhop, E., Diamond, M.S., et al., 2010. Enhancement of anti-DIII antibodies by the C3d derivative P28 results in lower viral titers and augments protection in mice. *Virology Journal* 7, 95–108. doi:10.1186/1743-422X-7-95.
- Dupouy-Camet, J., 2000. Trichinellosis, a worldwide zoonosis. *Veterinary Parasitology* 93, 191–200.
- Feng, S., Wu, X., Wang, X., Bai, X., Shi, H., Tang, B., et al., 2013. Vaccination of mice with an antigenic serine protease-like protein elicits a protective immune response against *Trichinella spiralis* infection. *Journal of Parasitology* 99, 426–432. doi:10.1645/12-46.1.
- Galen, J.E., Gomez-Duarte, O.G., Losonsky, G.A., Halpern, J.L., Lauderbaugh, C.S., Kaintuck, S., et al., 1997. 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* 15, 700–708.
- Galen, J.E., Wang, J.Y., Chinchilla, M., Vindurampulle, C., Vogel, J.E., Levy, H., et al., 2010. A new generation of stable, non-antibiotic, low-copy-number plasmids improves immune responses to foreign antigens in *Salmonella enterica* serovar Typhi live vectors. *Infection and Immunity* 78, 337–347. doi:10.1128/IAI.00916-09.
- Garmory, H.S., Leary, S.E., Griffin, K.F., Williamson, E.D., Brown, K.A., Titball, R.W., 2003. The use of live attenuated bacteria as a delivery system for heterologous antigens. *Journal of Drug Targeting* 11, 471–479.
- Gómez-Duarte, O.G., Pasetti, M.F., Santiago, A., Szein, M.B., Hoffman, S.L., Levine, M.M., 2001. Expression, extracellular secretion, and immunogenicity of the *Plasmodium falciparum* sporozoite surface protein 2 in *Salmonella* vaccine strains. *Infection and Immunity* 69, 1192–1198.
- Gottstein, B., Pozio, E., Nöckler, K., 2009. Epidemiology, diagnosis, treatment, and control of trichinellosis. *Clinical Microbiology Reviews* 22, 127–145. doi:10.1128/CMR.00026-08.
- Grencis, R.K., Hültner, L., Else, K.J., 1991. Host protective immunity to *Trichinella spiralis* in mice: activation of Th cell subsets and lymphokine secretion in mice expressing different response phenotypes. *Immunology* 74, 329–332.
- Hess, J., Gentschev, I., Miko, D., Welzel, M., Ladell, C., Goebel, W., et al., 1996. Superior efficacy of secreted over somatic antigen display in recombinant *Salmonella* vaccine induced protection against listeriosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 1458–1463.
- Hoiseth, S.K., Stocker, B.A., 1981. Aromatic-dependent *Salmonella typhimurium* are non-virulent and effective as live vaccines. *Nature* 291, 238–239.
- Inaba, T., Sato, H., Kamiya, H., 2003a. Monoclonal IgA antibody-mediated expulsion of *Trichinella* from the intestine of mice. *Parasitology* 126, 591–598.
- Inaba, T., Sato, H., Kamiya, H., 2003b. Impeded establishment of the infective stage of *Trichinella* in the intestinal mucosa of mice by passive transfer of an IgA monoclonal antibody. *The Journal of Veterinary Medical Science* 65, 1227–1231.
- Jazayeri, S.D., Ideris, A., Zakaria, Z., Omar, A.R., 2012. Attenuated *Salmonella typhimurium* SV4089 as a potential carrier of oral DNA vaccine in chickens. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2012, 264986. doi:10.1155/2012/264986.
- Kang, H.Y., Curtiss, R., 3rd., 2003. Immune responses dependent on antigen location in recombinant attenuated *Salmonella typhimurium* vaccines following oral immunization. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 37, 99–104.
- Kang, H.Y., Srinivasan, J., Curtiss, R., 3rd., 2002. Immune responses to recombinant pneumococcal PspA antigen delivered by live attenuated *Salmonella enterica* serovar typhimurium vaccine. *Infection and Immunity* 70, 1739–1749.
- Konjufca, V., Wanda, S.Y., Jenkins, M.C., Curtiss, R., 3rd., 2006. A recombinant attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium vaccine encoding *Eimeria acervulin* antigen offers protection against *E. acervulina* challenge. *Infection and Immunity* 74, 6785–6796.
- Kramer, U., Rizos, K., Apfel, H., Autenrieth, I.B., Lattemann, C.T., 2003. Autodisplay: development of an efficacious system for surface display of antigenic determinants in *Salmonella* vaccine strains. *Infection and Immunity* 71, 1944–1952.
- Li, X., Yao, J.P., Pan, A.H., Liu, W., Hu, X.C., Wu, Z.D., et al., 2013. An antigenic recombinant serine protease from *Trichinella spiralis* induces protective immunity in BALB/c mice. *Parasitology Research* 112, 3229–3238. doi:10.1007/s00436-013-3500-6.
- Liu, B., Tonkonogy, S.L., Sartor, R.B., 2011. Antigen-presenting cell production of IL-10 inhibits T-helper 1 and 17 cell responses and suppresses colitis in mice. *Gastroenterology* 141, 653–662.
- Liu, D., Wang, J., Niu, Z.X., 2010. Contribution of Chinese Pekin duck complement component C3d-P29 repeats to enhancement of Th2-biased immune responses against NDV F gene induced by DNA immunization. *Immunopharmacology and Immunotoxicology* 32, 297–306.
- Luria-Perez, R., Cedillo-Barron, L., Santos-Argumedo, L., Ortiz-Navarrete, V.F., Ocaña-Mondragon, A., Gonzalez-Bonilla, C.R., 2007. A fusogenic peptide expressed on the surface of *Salmonella enterica* elicits CTL responses to a dengue virus epitope. *Vaccine* 25, 5071–5085.
- Marinero, M., Boyaka, P.N., Finkelman, F.D., Kiyono, H., Jackson, R.J., Jirillo, E., et al., 1997. Oral but not parenteral interleukin (IL)-12 redirects T helper 2 (Th2)-type responses to an oral vaccine without altering mucosal IgA responses. *Journal of Experimental Medicine* 185, 415–427.
- Martínez-Gómez, F., Santiago-Rosales, R., Bautista-Garfias, R.C., 2009. Effect of *Lactobacillus casei* Shirota strain intraperitoneal administration in CD1 mice on the establishment of *Trichinella spiralis* adult worms and on IgA anti-*T. spiralis* production. *Veterinary Parasitology* 162, 171–175.
- McGuire, C., Chan, W.C., Wakelin, D., 2002. Nasal immunization with homogenate and peptide antigens induces protective immunity against *Trichinella spiralis*. *Infection and Immunity* 70, 7149–7152.
- McVay, C.S., Tsung, A., Appleton, J., 1998. Participation of parasite surface glycoproteins in antibody-mediated protection of epithelial cells against *Trichinella spiralis*. *Infection and Immunity* 66, 1941–1945.
- McVay, C.S., Bracken, P., Gagliardo, L.F., Appleton, J., 2000. Antibodies to tyvelose exhibit multiple modes of interference with the epithelial niche of *Trichinella spiralis*. *Infection and Immunity* 68, 1912–1918.
- Miller, J.H., 1992. The genetic code and codon usage in selected organisms. In: Miller, J.H. (Ed.), *A Short Course in Bacterial Genetics: A Laboratory Manual and Handbook for Escherichia coli and Related Bacteria*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, USA, pp. 19.1–19.4.
- Mitchell, J.A., Green, T.D., Bright, R.A., Ross, T.M., 2003. Induction of heterosubtypic immunity to influenza A virus using a DNA vaccine expressing hemagglutinin-C3d fusion proteins. *Vaccine* 21, 902–914.
- Movsesyan, N., Mkrtchyan, M., Petrushina, I., Ross, T.M., Cribb, D.H., Agadjanyan, M.G., et al., 2008. DNA epitope vaccine containing complement component C3d enhances anti-amyloid-beta antibody production and polarizes the immune response towards a Th2 phenotype. *Journal of Neuroimmunology* 205, 57–63. doi:10.1016/j.jneuroim.2008.08.016.
- Nakayama, H., Inaba, T., Nargis, M., Chisty, M., Ito, M., Kamiya, H., 1998. Immunization of laboratory animals with ultraviolet-attenuated larvae against homologous challenge infection with *Trichinella britovi*. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 29, 563–566.
- Ortega-Pierres, M.G., Arriaga, C., Yépez-Mulia, L., 2000. Epidemiology of trichinellosis in Mexico, Central and South America. *Veterinary Parasitology* 93, 201–225.
- Oxer, M.D., Bentley, C.M., Doyle, J.G., Peakman, T.C., Charles, I.G., Makoff, A.J., 1991. High level heterologous expression in *E. coli* using the anaerobically-activated nirB promoter. *Nucleic Acids Research* 19, 2889–2892.
- Petavy, A.F., Hormaeche, C., Lahmar, S., Ouhelli, H., Chabalgoity, A., Marchal, T., et al., 2008. An oral recombinant vaccine in dogs against *Echinococcus granulosus*, the causative agent of human hydatid disease: a pilot study. *PLoS Neglected Tropical Disease* 2, e125.
- Pompa-Mera, E.N., Yépez-Mulia, L., Ocaña-Mondragón, A., García-Zepeda, E.A., Ortega-Pierres, G., González-Bonilla, C.R., 2011. *Trichinella spiralis*: intranasal immunization with attenuated *Salmonella enterica* carrying a gp43 antigen-derived 30mer epitope elicits protection in BALB/c mice. *Experimental Parasitology* 129, 393–401. doi:10.1016/j.exppara.2011.08.013.
- Pozio, E., 2007. World distribution of *Trichinella* spp. infections in animals and humans. *Veterinary Parasitology* 149, 3–21.
- Ribicich, M., Gamble, H.R., Bolpe, J., Scialfa, E., Krivokapich, S., Cardillo, N., et al., 2010. *Trichinella* infection in wild animals from endemic regions of Argentina. *Parasitology Research* 107, 377–380.
- Robinson, K., Bellaby, T., Chan, W.C., Wakelin, D., 1995a. High levels of protection induced by a 40-mer synthetic peptide vaccine against the intestinal nematode parasite *Trichinella spiralis*. *Immunology* 86, 495–498.
- Robinson, K., Bellaby, T., Wakelin, D., 1995b. Oral and parenteral vaccination against *Trichinella spiralis* infections in high- and low-responder mice. *International Journal for Parasitology* 25, 989–992.
- Ross, T.M., Xu, Y., Green, T.D., Montefiori, D.C., Robinson, H.L., 2001. Enhanced avidity maturation of antibody to human immunodeficiency virus envelope: DNA vaccination with gp120-C3d fusion proteins. *AIDS Research and Human Retroviruses* 17, 829–835.
- Ruiz-Olvera, P., Ruiz-Pérez, F., Sepulveda, N.V., Santiago-Machuca, A., Maldonado-Rodríguez, R., Garcia-Ellorriaga, G., et al., 2003. Display and release of the *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein using the autotransporter MisL of *Salmonella enterica*. *Plasmid* 50, 12–27.
- Sambrook, J., Russell, D.W., 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, third ed. Cold Spring Harbor, New York.
- Spreng, S., Dietrich, G., Weidinger, G., 2006. Rational design of *Salmonella*-based vaccination strategies. *Methods (San Diego, Calif.)* 38, 133–143.
- Tang, F., Xu, L., Yan, R., Song, X., Li, X., 2012. Evaluation of the immune response induced by DNA vaccines expressing MIF and MCD-1 genes of *Trichinella spiralis* in BALB/c mice. *Journal of Helminthology* 86, 430–439. doi:10.1017/S0022149X11000654.
- Toapanta, F.R., Ross, T.M., 2006. Complement-mediated activation of the adaptive immune responses: role of C3d in linking the innate and adaptive immunity. *Immunologic Research* 36, 197–210.

- van der Waaij, L.A., Mesander, G., Limburg, P.C., van der Waaij, D., 1994. Direct flow cytometry of anaerobic bacteria in human feces. *Cytometry* 16, 270–279.
- Wallach, M.G., Ashash, U., Michael, A., Smith, N.C., 2008. Field application of a subunit vaccine against an enteric protozoan disease. *PLoS ONE* 3, e3948.
- Wang, C.H., Richards, E.M., Bell, R.G., 1999. Rapid anti-helminthic response of B lymphocytes in the intestinal mucosal tissues of rats. *Cellular Immunology* 193, 59–70.
- Wang, X.L., Zhao, X.R., Yu, M., Yuan, M.M., Yao, X.Y., Li, D.J., 2006b. Gene conjugation of molecular adjuvant C3d3 to hCG beta increased the anti-hCGbeta Th2 and humoral immune response in DNA immunization. *The Journal of Gene Medicine* 8, 498–505.
- Wang, Z.Q., Cui, J., Wei, H.Y., Han, H.M., Zhang, H.W., Li, Y.L., 2006a. Vaccination of mice with DNA vaccine induces the immune response and partial protection against *T. spiralis* infection. *Vaccine* 24, 1205–1212.
- Weiss, R., Gabler, M., Jacobs, T., Gilberger, T.W., Thalhamer, J., Scheibhofer, S., 2010. Differential effects of C3d on the immunogenicity of gene gun vaccines encoding *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium berghei* MSP1 (42). *Vaccine* 28, 4515–4522. doi:10.1016/j.vaccine.2010.04.054.
- Yang, Y., Zhang, Z., Yang, J., Chen, X., Cui, S., Zhu, X., 2010. Oral vaccination with Ts87 DNA vaccine delivered by attenuated *Salmonella typhimurium* elicits a protective immune response against *Trichinella spiralis* larval challenge. *Vaccine* 28, 2735–2742.
- Yang, Y., Yang, X., Gu, Y., Wang, Y., Zhao, X., Zhu, X., 2013. Protective immune response induced by co-immunization with the *Trichinella spiralis* recombinant Ts87 protein and a Ts87 DNA vaccine. *Veterinary Parasitology* 194, 207–210.
- Yu, Y.R., Deng, M.J., Lu, W.W., Jia, M.Z., Wu, W., Qi, Y.F., 2013. Systemic cytokine profiles and splenic toll-like receptor expression during *Trichinella spiralis* infection. *Experimental Parasitology* 134, 92–101. doi:10.1016/j.exppara.2013.02.014.
- Zhang, D., Xia, Q., Wu, J., Liu, D., Wang, X., Niu, Z., 2011. Construction and immunogenicity of DNA vaccines encoding fusion protein of murine complement C3d-p28 and GP5 gene of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vaccine* 29, 629–635. doi:10.1016/j.vaccine.2010.11.046.



## *Trichinella spiralis*: Intranasal immunization with attenuated *Salmonella enterica* Carrying a gp43 antigen-derived 30mer epitope elicits protection in BALB/c mice

E.N. Pompa-Mera<sup>a,b</sup>, L. Yépez-Mulia<sup>b</sup>, A. Ocaña-Mondragón<sup>a</sup>, E.A. García-Zepeda<sup>c</sup>, G. Ortega-Pierres<sup>d</sup>, C.R. González-Bonilla<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Unidad de Investigación Médica en Inmunología e Infectología, Hospital de Infectología, Centro Médico Nacional La Raza, IMSS, Mexico City, Mexico

<sup>b</sup>Unidad de Investigación en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, Mexico City, Mexico

<sup>c</sup>Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

<sup>d</sup>Departamento de Genética y Biología Molecular, Centro de Investigación y Estudios Avanzados-Instituto Politécnico Nacional, Mexico City, Mexico

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 27 June 2008

Received in revised form 26 July 2011

Accepted 16 August 2011

Available online 31 August 2011

#### Keywords:

*Trichinella spiralis*  
gp43 Antigen  
Attenuated *Salmonella*  
Vaccines  
ShdA  
Autotransporters

### ABSTRACT

Trichinellosis is a public health problem and is considered an emergent/re-emergent disease in various countries. The etiological agent of trichinellosis is the nematode *Trichinella*, which infects domestic animals such as pigs and horses, as well as wild animals and humans. A veterinary vaccine could be an option to control the disease in domestic animals. Although several vaccine candidates have shown promising results, a vaccine against trichinellosis remains unavailable to date. Attenuated *Salmonella* strains are especially attractive live vectors because they elicit mucosal immunity, which is known to be important for the control of *Trichinella spiralis* infection at the intestinal level and can be administered by oral or intranasal routes. In this study, the autotransporter ShdA was used to display, on the surface of the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium SL3261, the 210–239 amino acid epitope, (designated as Ag30) derived from the 43 kDa glycoprotein of *T. spiralis* muscle larvae. The fusion protein elicited antibodies in BALB/c mice that were able to recognize the native epitope on the surface of *T. spiralis* muscle larvae. Mice immunized by intranasal route with the recombinant *Salmonella* induced a protective immune response against the *T. spiralis* challenge, reducing by 61.83% the adult burden at day eight post-infection. This immune response was characterized by the induction of antigen-specific IgG1 and of IL-5 production. This study demonstrates the usefulness of *Salmonella* as a carrier of nematode epitopes providing a surface display system for intestinal parasite vaccine applications.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

### 1. Introduction

Trichinellosis is caused by nematodes of the genus *Trichinella*, which are widespread throughout the world and infect many animal species, including humans (Gajadhar and Gamble, 2000). Human trichinellosis has been documented to date in 55 countries (27.8%) worldwide, including industrialized and non-industrialized countries (Pozio, 2007) and is considered as an emergent/re-emergent disease (Dupouy-Camet, 2000; Gajadhar and Gamble, 2000; Murrell and Pozio, 2000). The global prevalence of trichinellosis is unknown, but it is estimated that ca. 11 million people may be infected with the parasite. Trichinellosis is mainly acquired by ingestion of the meat of domestic animals such as pigs and horses; however, several outbreaks have been caused by the ingestion of

the meat of wild animals especially wild boar and bears (Gamito-Santos et al., 2009; Ribicich et al., 2010; Cui et al., 2011) *Trichinella spiralis*, the main species affecting humans, is acquired by ingestion of meat containing viable infective larvae enclosed in a structure called the “nurse cell”.

Gastric fluid allows the release of muscle larvae (ML) from nurse cells and once released, the parasites develop into adults in the duodenum and jejunum. The adult worms mate and the females produce large numbers of newborn larvae, which penetrate the intestinal wall, enter the lymphatic system, and travel through the bloodstream into striated muscle. Once the parasites reach this tissue, the larvae develop into ML and induce the transformation of muscle cells to the nurse-cell complex, which eventually calcifies. The clinical features of trichinellosis vary from mild to severe disease depending on parasite numbers, their localization, and the intensity of the inflammatory reaction. Fever, myalgia, and persistent fatigue are the most common symptoms, which often associated with marked eosinophilia. The disease often causes neurologic and cardiac dysfunction due to the arteriolar microthrombi that lead to cerebral and myocardial infarction.

\* Corresponding author. Address: Unidad de Investigación Médica en Inmunología e Infectología, Hospital de Infectología, Centro Médico Nacional La Raza, IMSS, Vallejo esq. Seris sn, Col. La Raza, 02200 Mexico, D.F., Mexico.

E-mail addresses: [crgb@prodigy.net.mx](mailto:crgb@prodigy.net.mx), [cesar.gonzalezzb@imss.gob.mx](mailto:cesar.gonzalezzb@imss.gob.mx) (C.R. González-Bonilla).

In many developing countries, swine trichinellosis is associated with the traditional practice of raising animals at home in backyards; therefore, the control and prevention of human trichinellosis depends on the success of measures intended to avoid the consumption of infected undercooked meat. These include improvement of general sanitary conditions; epidemiological surveillance, and adequate marketing systems, as well as regulation and good farming practises (Gajadhar and Gamble, 2000). Nevertheless, because of the economic difficulties involved in the implementation of such measures in many areas of the world, a vaccine for veterinary use is an attractive alternative for preventing the disease in humans, especially if the vaccine could be administered by inclusion in baits or animal feed.

Different parasite molecules have been proposed as vaccine candidates, among these, the 30mer peptide (RLEMVGS-FLAKVMVNMRIWAVTDNTLQTT) (210–239 aminoacid strand) derived from the 43 kDa glycoprotein (gp43), an excretory/secretory (E/S) molecule produced by *T. spiralis* ML that conferred protection against the enteral phase of the parasite (McGuire et al., 2002). Protective immune responses elicited in *T. spiralis*-infected hosts are type 2-derived responses characterized by intestinal mastocytosis, as well as the production of specific IgG1 and IgE antibodies and the cytokines IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, and IL-13 (Grencis, 1997). It is also known that antibodies directed against E/S components of *T. spiralis* ML interfere with parasite molting and inhibit the invasion of larvae into epithelial cells (McVay et al., 1998, 2000; Wang et al., 1999). In addition, the presence of IL-4 and TNF $\alpha$  cytokines, during the initial inflammatory response observed in the *T. spiralis* host, have been related with enteropathy (TNF and IL-4) and with parasite expulsion (IL-4), a major component of defense against infection (Lawrence et al., 1998).

Although some vaccine candidates against *Trichinella* infection are protective in experimental models, a veterinary vaccine for general use remains unavailable. Because mucosal immunity is important for controlling *T. spiralis* infection (Tuohy et al., 1990; Urban et al., 2000; Miller and Pemberton, 2002; Lawrence, 2003), a vaccine strategy to induce this type of response comprises the use of live bacterial vectors, a promising option for veterinary use because these would be relatively easy to administer and stable at room temperature. Attenuated *Salmonella* strains are especially attractive as live vectors because they can be administered by oral or intranasal route and elicit not only systemic but also mucosal immunity (González et al., 1994; Galen et al., 1997; Shroff et al., 1999; Medina and Guzmán, 2001; Abd El et al., 2007). An important aspect that influences the induction of antibody response is the bacterial subcellular location of the passenger antigen expressed on live vectors. Indeed, antigens located in the periplasm and on the bacterial surface or secreted antigens may elicit better antibody responses by facilitating adequate folding and exposure to antigen-presenting cells (Kang and Curtiss, 2003). The autodisplay system of autotransporters (Henderson et al., 2004) is an alternative method used to display foreign antigens on the bacterial surface, providing a simple way to translocate large heterologous immunogens to the bacterial surface (Chen and Schifferli, 2007; Jose and Meyer, 2007).

In this study, we evaluated a *Salmonella* vaccine candidate expressing a *T. spiralis* antigen on the surface as a strategy to induce a protective immune response against the intestinal phase of the parasite. For this, the autotransporter ShdA (Kingsley et al., 2002, 2004) was employed to translocate the 30mer peptide derived from gp43 (aminoacid residues 210–239, designated here as Ag30) from *T. spiralis* ML to the surface of *S. enterica* serovar Typhimurium SL3261. Herein, we describe the protection induced in BALB/c mice against *T. spiralis* infection when the recombinant *Salmonella* vaccine was administered by nasal route. Additionally,

the immune response induced by the recombinant live vector was characterized.

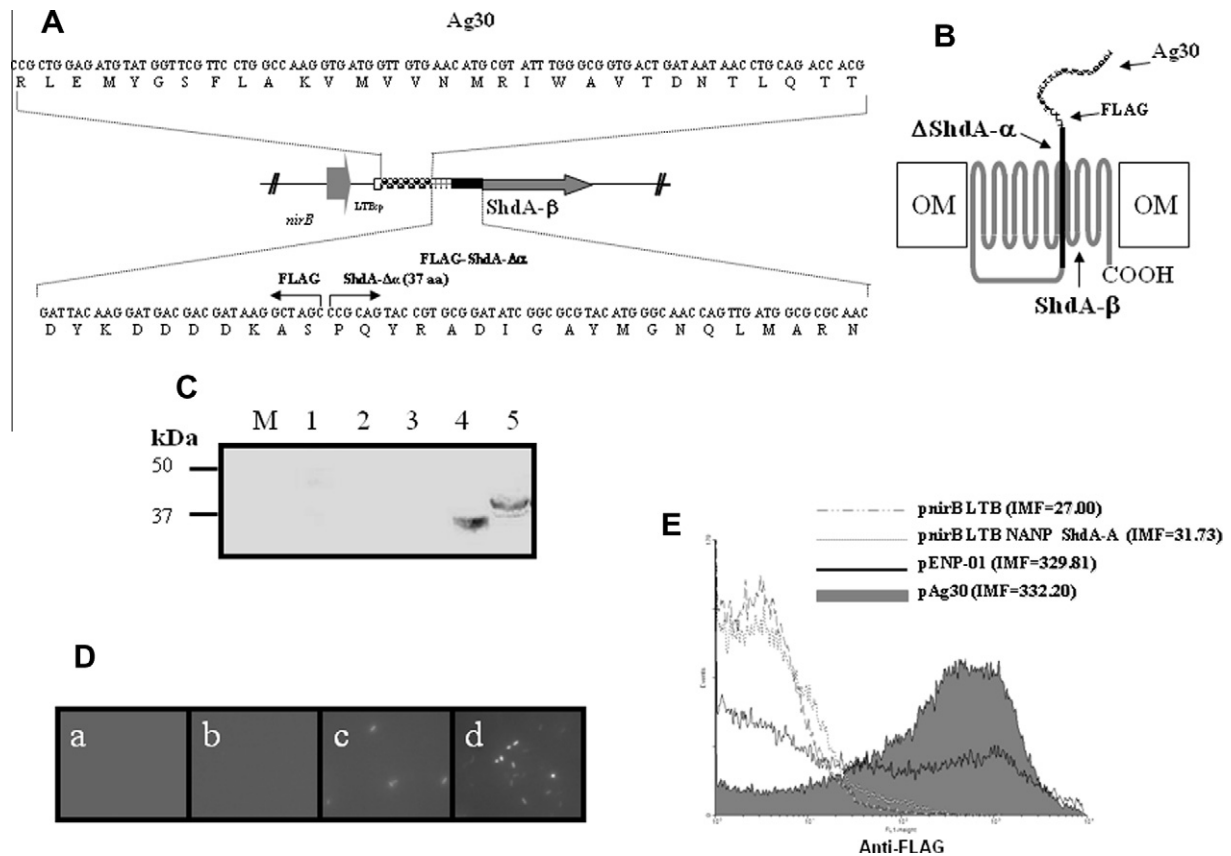
## 2. Materials and methods

### 2.1. Bacterial strains, plasmids, and genetic engineering *Escherichia coli*

DH5 $\alpha$  (*supE44 lac169 80lacZ M15 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1*) was used as the host strain for construction of plasmid vector encoding recombinant *T. spiralis* Ag30 antigen. Attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium SL3261 (*aroA::Tn10*) (Hoiseh and Stocker, 1981) were transformed with the plasmid and utilized for the delivery of recombinant Ag30 antigen.

All plasmids used in this study were derived from plasmid pnrB-LTB (2425 bp), which contains the nirB promoter (inducible under anaerobic conditions) (Chatfield et al., 1992), and the sequence encoding LTB signal peptide for translocation of the fusion protein to the periplasmic space, as previously reported (Ruiz-Pérez et al., 2002; Ruiz-Olvera et al., 2003). Plasmids pnrB-LTB- $\beta$ ShdA-A (3415 bp), pENP (3415 bp) and pAg30 (3511 bp) contain a sequence encoding a truncated  $\alpha$ -domain and the entire  $\beta$ -domain of the ShdA autotransporter protein, allowing the translocation of the passenger domain (*T. spiralis* Ag30 antigen) (Fig. 1A) through the central pore and its display on the surface of *Salmonella* (Fig. 1B). DNA manipulations were carried out as described by Sambrook and Russell (2001). All restriction enzymes were purchased from New England Biolabs (Beverly, MA, USA). PCR reagents and plasmid preparation kits were purchased from Invitrogen (Palo Alto, CA, USA) and Qiagen (Qiagen, México), respectively. The ShdA autotransporter putative  $\Delta\alpha$ - $\beta$  domain was predicted by alignment with the MisL autotransporter (ALIGN 2.0) and amplified by PCR using genomic DNA from *S. enterica* serovar Typhimurium SL3261 as template. Primers sense **shda-a-1** (5' GGC TAA GCT AGC CCG CAG TAC CGT GCG GAT ATC 3') and antisense **shda-a-2** (5' GCT AAG GGA TCC AGT TAT AGC GCA GAT TGA GGC TAC 3'), containing *NheI* and *BamHI* restriction sites (underlined) were designed based on GenBank sequence accession number AF140550. The 942 bp amplicon obtained encodes 314 amino acids (1721–2035) corresponding to the truncated ShdA  $\alpha$  domain and the entire  $\beta$  domain (ShdA  $\Delta\alpha$ - $\beta$  domain). The amplicon was restricted using *Nhe I* and *BamHI* enzymes and inserted into the pnrB-LTB-NANP- $\beta$ MisL vector, which was previously digested with same restriction enzymes. This strategy allows the replacement of MisL by ShdA and generates the pnrB-LTB- $\beta$ ShdA-A plasmid (3415 bp). A sequence encoding peptide FLAG reporter was generated by PCR using oligonucleotides **Flag-1** (5' CT AGA GAT TAC AAG GAT GAC GAC GAT AAG GCT AGC ATG CAT G 3') and antisense **Flag-2** (5' GA TCC ATG CAT GCT AGC GTT TGG ATT AGC GTT AGG ATT TGC GTT TGG ATT GGC GTT AGG ATT AGC GTT TGG T 3'), which contained *XbaI*, *NheI*, *NsiI*, and *BamHI* restriction sites (underlined). This sequence was incorporated into the plasmid, generating the pnrB-LTB-ShdA-A-FLAG plasmid (3442 bp). In addition, oligonucleotide sense **linker-1** (5' GCT AGG ACT AGT GTC GAC CTC GAG CAT TAC AAG GAT GAC GAC GAT AAG GCT 3') and **linker-2** (5' GCT AGG ACT AGT AAG CTT TCT AGA TCC GTG TGC ACA TAG AGA GGA TAG TAA 3') containing *XbaI*, *HindIII*, *SpeI*, *Sall*, and *XhoI* restriction sites (underlined) were employed to create a multiple cloning site downstream of the LTB signal sequence and upstream of fusion FLAG-ShdA autotransporter, utilizing the pnrB-ShdA-A-FLAG plasmid as template. The 3460 bp PCR product was digested with *SpeI* and ligated to generate the pENP plasmid (3415 bp). Finally, the pAg30 plasmid (3511 bp), which contains a sequence encoding the *T. spiralis* antigen Ag30 and fused to the FLAG and ShdA  $\Delta\alpha$ - $\beta$  sequence, was constructed as follows: briefly, a





**Fig. 1.** *Trichinella spiralis* Ag30 is displayed on the surface of attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium SL3261. (A) The sequence encoding amino acids 210–239 from gp43 (Ag30) was inserted into plasmid pENP, and the resulting plasmid (pAg30) produces a fusion protein with the following elements from the N-terminus: LTB signal peptide; Ag30, and the tag sequence FLAG, a truncated ShdA  $\alpha$  domain. (B) Model of the fusion protein designed for autodisplay of Ag30 epitope. (C) Western blot analysis of crude bacterial extracts from *Salmonella* transformed with the following plasmids: (1) pnirB-LTB; (2) pnirB-LTB-ShdA; (3) pnirB LTB-NANP-ShdA; (4) pENP, and (5) pAg30. (D) IFA analysis of *Salmonella* transformed with the following: (a) pnirB-LTB-ShdA; (b) pnirB-LTB-NANP-ShdA; (c) pENP, and (d) pAg30. (E) Flow cytometry of *Salmonella* transformed with the different plasmids.

synthetic DNA sequence encoding *T. spiralis* Ag30 antigen (amino acids 210–239) was obtained by PCR using the primers sense **Triqui-1** (5' CTC TAG AAG CTI CGC CTG GAG ATG TAT GGT TCG TTC CTG GCC AAG GTG ATG GTT GTG AAC ATG CGT ATT T 3') and anti-sense **Triqui-2** (5' CGC CGC CTC GAG GAG CTC CGT GGT CTG CAG GGT ATT ATC AGT CAC CGC CCA AAT ACG CAT GTT CAC AAC C 3') containing *HindIII* and *XhoI* sites (underlined) and designed for *Salmonella* preferential codon usage (Miller, 1992). The PCR product (120 bp) was restricted with *HindIII* and *XhoI* enzymes and inserted in the pENP plasmid, creating the pAg30 plasmid. All constructs engineered in this study were confirmed by nucleotide sequencing using the Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and the **pNirI** primer (5' TTC AGG TAA ATT TGA TAC ATC AAA 3'). Sequencing reactions were run on an ABI Prism 310 genetic analyzer (Applied Biosystems). Plasmids from verified clones were electroporated into strains of attenuated *S. enterica* serovar Typhimurium SL3261.

## 2.2. Culture and induction conditions

*Escherichia coli* DH5 $\alpha$  was cultured on brain heart infusion (BHI) agar plates at 37 °C with 100  $\mu$ g/mL of ampicillin. For the culture of *Salmonella* strains, the medium was supplemented with 0.01% 2,3-dihydroxybenzoic acid (DHB; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). Once the culture reached the late logarithmic growth phase (Optical density [OD]<sub>600</sub> = 1.0), 100  $\mu$ L ( $1.5 \times 10^9$  cells) were transferred to 250 mL of thioglycolate medium (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) supplemented with antibiotic and DHB and, to in-

duce the nirB promoter (Oxer et al., 1991), bacteria were incubated anaerobically at 37 °C in a BBL GasPak Anaerobic System (Becton Dickinson Microbiology Systems, Cockeysville, MD, USA) until OD<sub>600</sub> = 1.0 was reached (approximately 6 h).

## 2.3. Expression of the Ag30 fusion protein and Western blot analysis

Expression of the fusion protein was analyzed by sodium dodecylsulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS–PAGE) of whole-cell lysates of *S. enterica* serovar Typhimurium. The samples were electrophoresed under reducing conditions (1% SDS, 140 mM 2-mercaptoethanol, 95 °C, 10 min) in 10% gels and then stained with Coomassie blue dye or transferred onto nylon membranes (Millipore, Bedford, MA, USA). Immunoblotting of the fusion protein was performed with a monoclonal anti-FLAG antibody conjugated to biotin (biotinylated M2 AntiFLAG<sup>®</sup>, Sigma) diluted 1:250 in PBS-5% skim milk. After washing, an HRP–Streptavidin conjugate (Zymed<sup>®</sup>) diluted 1:500 was applied. The immune reaction was revealed with 4-chloro-1-naphthol-30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in PBS (pH 7.4).

## 2.4. Indirect Immunofluorescence assay (IFA) and flow cytometry analysis

Surface expression of the ShdA-FLAG-Ag30 (recombinant Ag30) and ShdA-FLAG fusion proteins was evaluated by flow cytometry of *S. enterica* serovar Typhimurium SL3261 transformed with plasmid pAg30 or pENP, respectively. After induction, the bacterial strains were harvested, washed twice with PBS, and incubated with the

monoclonal anti-FLAG antibody conjugated to biotin at a 1:50 dilution in PBS for 60 min at room temperature with agitation. They were washed twice with PBS and incubated with a goat anti-mouse FITC-Streptavidin conjugate (Zymed<sup>®</sup> Laboratories, Invitrogen, CA, USA) 1:100 for 30 min at room temperature in the dark. The samples were observed using a fluorescence microscope (BX-40; Olympus) and analyzed in a flow cytometer (van der Waaij et al., 1994) (Becton Dickinson, Bedford, MA, USA).

*Salmonella* transformed with pnrB-LTB, pnrB-LTB-ShdA, and pnrB-LTB-NANP-ShdA were included as negative controls. Plasmids pnrB-LTB-ShdA and pnrB-LTB-NANP ShdA were kindly provided by Dr. F. Ruiz-Pérez.

### 2.5. Recognition of *T. spiralis* native gp43

An indirect Immunofluorescence assay (IFA) was employed to evaluate the recognition of the native protein (gp43) on the surface and internal structures of *T. spiralis* ML by IgG antibodies raised against the Ag30 fusion protein. The recombinant Ag30 was excised from preparative SDS-PAGE gels and utilized to immunize groups of five BALB/c mice according to the method described by Igarashi et al. (2000). Sera from these mice were tested for the presence of antibodies to native *T. spiralis* gp43 by Western blot analysis of ML soluble antigen using goat antimouse IgG conjugated to HRP as the second antibody. The sera were further analyzed for their ability to recognize the surface of *T. spiralis* ML by IFA. For this, whole parasites and 5- $\mu$ m cryosections of ML fixed in 4% *p*-formaldehyde in PBS were incubated with 1:20 dilutions of sera in a humid chamber for 2 h at 37 °C, followed by five washes with PBS-0.1% Tween 20 and one wash with PBS. The parasite preparations were incubated with an anti-mouse IgG-FITC conjugate (10  $\mu$ g/mL) for 90 min, the washes were repeated, and the slides were observed using a fluorescence microscope (BX-40; Olympus).

### 2.6. Animals and immunization schedules

Male BALB/c mice weighing 20–25 g and aged 4–6 weeks were used throughout the study. All animals were maintained and treated according to local and federal regulations. The mice were maintained under specific pathogen-free conditions with positive-pressure filtered air and sterilized food and water. Routine stool examinations were performed to determine the presence of intestinal parasites.

Animals were immunized with attenuated pENP- or pAg30-transformed *Salmonella*. All bacterial strains were cultured under inducing conditions of the nirB promoter (Luria-Perez et al., 2007), harvested in the late logarithmic growth phase, adjusted to 10<sup>9</sup> cells/mL and inoculated intranasally (the animals were inoculated with two successive 20- $\mu$ L applications) (Galen et al., 1997). Mice received three doses at 3-week intervals and maintained with 0.6 mg of ampicillin/mL in their drinking water.

### 2.7. Protection assays

To assess protection, groups of eight immunized animals were challenged at day 53 (10 days after last immunization) with 300 *T. spiralis* ML. A PBS-inoculated group was included as control. Adult worms were recovered from the intestine on day 8 postinfection, as described by McGuire et al. (2002). Adult parasites were counted in each group and the percentage of load reduction was calculated with respect to the infection control.

### 2.8. Serum collection

Serum samples from mice immunized with the recombinant bacterial strains were collected on days 0, 15, 30, and 45 of the immunization schedule.

### 2.9. Antibodies determination

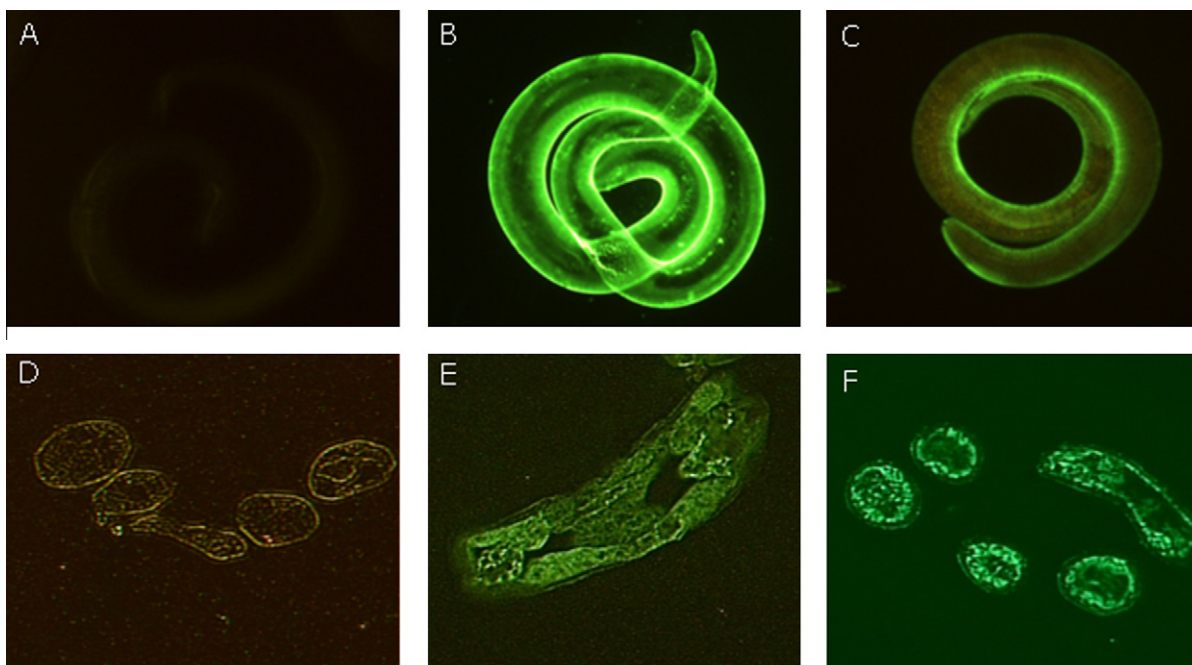
Specific total IgG, IgG1, IgG2a, and IgG2b antibodies against the Ag30 synthetic peptide (Anaspec, San Jose, CA, USA) and the crude homogenate from *T. spiralis* ML (CHA) were determined by ELISA. Flat-bottom-well microtiter plates (Nunc) were coated with 5  $\mu$ g/mL of Ag30 synthetic peptide or CHA at 20  $\mu$ g/mL in 100  $\mu$ L of carbonate buffer (pH 9.5) overnight at 4 °C. Then, the plates were blocked with 3% BSA-PBS plus 0.05% Tween 20 and incubated with serial dilutions (1:10–1:1000) of sera collected from non-immunized or immunized animals for 2 h at 37 °C. Goat anti-mouse IgG conjugated to peroxidase (Zymed Laboratories Inc., San Francisco, CA, USA) (0.5  $\mu$ g/mL) were added and incubated for 2 h at 37 °C. The sera and secondary antibodies were diluted in 3% BSA-PBS 0.05% Tween 20. Between incubations, the plates were washed three times with PBS-0.05% Tween 20. Peroxidase activity was visualized with tetramethylbenzidine-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (R&D Systems). The reaction was stopped with 50  $\mu$ L of 2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and OD450 was determined using an ELISA reader (ELx808 Ultra Microplate Reader, Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, USA). The antibody response against *Salmonella* was determined as previously described (González et al., 1998).

### 2.10. Cell supernatants

Cells from spleens, Peyer's patches (PP), and Mesenteric lymph nodes (MLN) were harvested from mice that were non-immunized, *T. spiralis*-infected, or immunized with *Salmonella* carrying pENP or pAg30 on day 54 of the immunization schedule. Cell suspensions were prepared as previously recommended (Else and Grecis, 1991). In order to lyse erythrocytes, splenocytes were treated with 0.14 M NH<sub>4</sub>Cl for 10 min at 4 °C and cells were separated by centrifugation (1200 rpm) at 4 °C and washed with sterile PBS. Pooled suspensions of spleen, PP, and MLN cells were cultured in 96-well, flat-bottom tissue-culture plates (Nunc-Immuno<sup>TM</sup> MaxiSorp) at a density of 1  $\times$  10<sup>6</sup> cells/well in RPMI-1640 supplemented with penicillin (100 U/mL), streptomycin (100  $\mu$ g/mL), 2 mM L-glutamine, 1 mM HEPES, and 10% Fetal bovine serum (FBS). Cells were stimulated with CHA (50  $\mu$ g) and incubated for 48 h at 37 °C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. Non-stimulated cells were included as a control. Supernatants were collected, aliquoted, and stored at –80 °C until cytokine assays were performed.

### 2.11. Cytokine analysis

IL-5 and IFN- $\gamma$  were quantified in duplicate samples of pooled supernatants of stimulated spleen, PP, and MLN cells using a Quantikine kit (R&D System) for mouse IL-5 (Cat. No. M5000) and mouse IFN- $\gamma$  (Cat. No. MIF00) following manufacturer instructions. Briefly, the plates provided were pre-coated with capture anti-mouse IL-5 or anti-mouse IFN- $\gamma$  and were incubated overnight at 4 °C with 100  $\mu$ L of supernatants for 2 h at room temperature. Plates were washed four times with Wash Buffer; after this, 100  $\mu$ L of anti-mouse IL-5 or anti-mouse IFN- $\gamma$  were conjugated with horseradish peroxidase and incubated for 2 h at room temperature. The plates were washed four times with Wash Buffer and hydrogen peroxidase/Tetramethyl benzidine (TMB) solution was added to develop color reaction at room temperature. Reaction was interrupted by the addition of 100  $\mu$ L/well of hydrochloric acid SDS. Assay sensitivity was < 7 pg/mL for IL-5 and < 2 pg/mL for IFN- $\gamma$ . Absorbance



**Fig. 2.** Antibodies raised against Ag30 fusion protein recognize the surface and internal structures of *Trichinella spiralis* muscle larva. Whole parasite or parasite cryosections (5- $\mu$ m) were incubated with mice pre-immune sera (A, D); sera from *T. spiralis*-infected mice (B, E), or sera from mice immunized with recombinant Ag30 (C, F). A dilution of 1:20 is presented.

was measured at 450 nm using an ELISA reader (EL $\times$ 808 Ultra Microplate Reader; Bio-Tek Instruments).

### 2.12. Statistical analysis

Intra- and intergroup statistical analyses were performed with nonparametric Kruskal–Wallis ANOVA, which allowed us to make post hoc comparisons utilizing the Mann–Whitney *U* test, and Tukey post hoc (Prism 4 $\copyright$  for Windows $\copyright$ ), with differences considered significant when *P* was < 0.05.

## 3. Results

### 3.1. Expression of Ag30 fusion protein

Bacterial extracts derived from anaerobically induced cultures of *S. enterica* serovar Typhimurium SL3261 transformed with pENP (*Salmonella* pENP) and pAg30 (*Salmonella* pAg30) were analyzed by Western blot analysis. The recombinant protein was traced using antibodies to the FLAG peptide, which was followed downstream by the Ag30 epitope. Expected bands of 39 and 42.24 kDa, were observed in *Salmonella* pENP and *Salmonella* pAg30, respectively (Fig. 1C).

### 3.2. ShdA mediates autodisplay of the Ag30 peptide on the bacterial surface of *Salmonella*

The ability of the recombinant ShdA  $\Delta\alpha$ – $\beta$  domain to translocate the Ag30 passenger antigen to the bacterial surface was analyzed by IFA and flow cytometry. Anaerobically induced cultures of the recombinant *Salmonella* strains were traced with a biotinylated anti-FLAG monoclonal antibody and a streptavidin-FITC conjugate (Fig. 1D and E). Indeed, the surface exposure of Ag30 showed high expression, reaching 2-log, relative-light-unit displacement with respect to the controls. In contrast, pENP strain appeared to display two populations, one expressing FLAG and the other not expressing FLAG. Nevertheless, the positive population

also presented a 2-log, relative-light-unit displacement with respect to the controls (Fig. 1E).

### 3.3. Antibodies raised against Ag30 fusion protein recognize native gp43 on the surface of *T. spiralis* ML

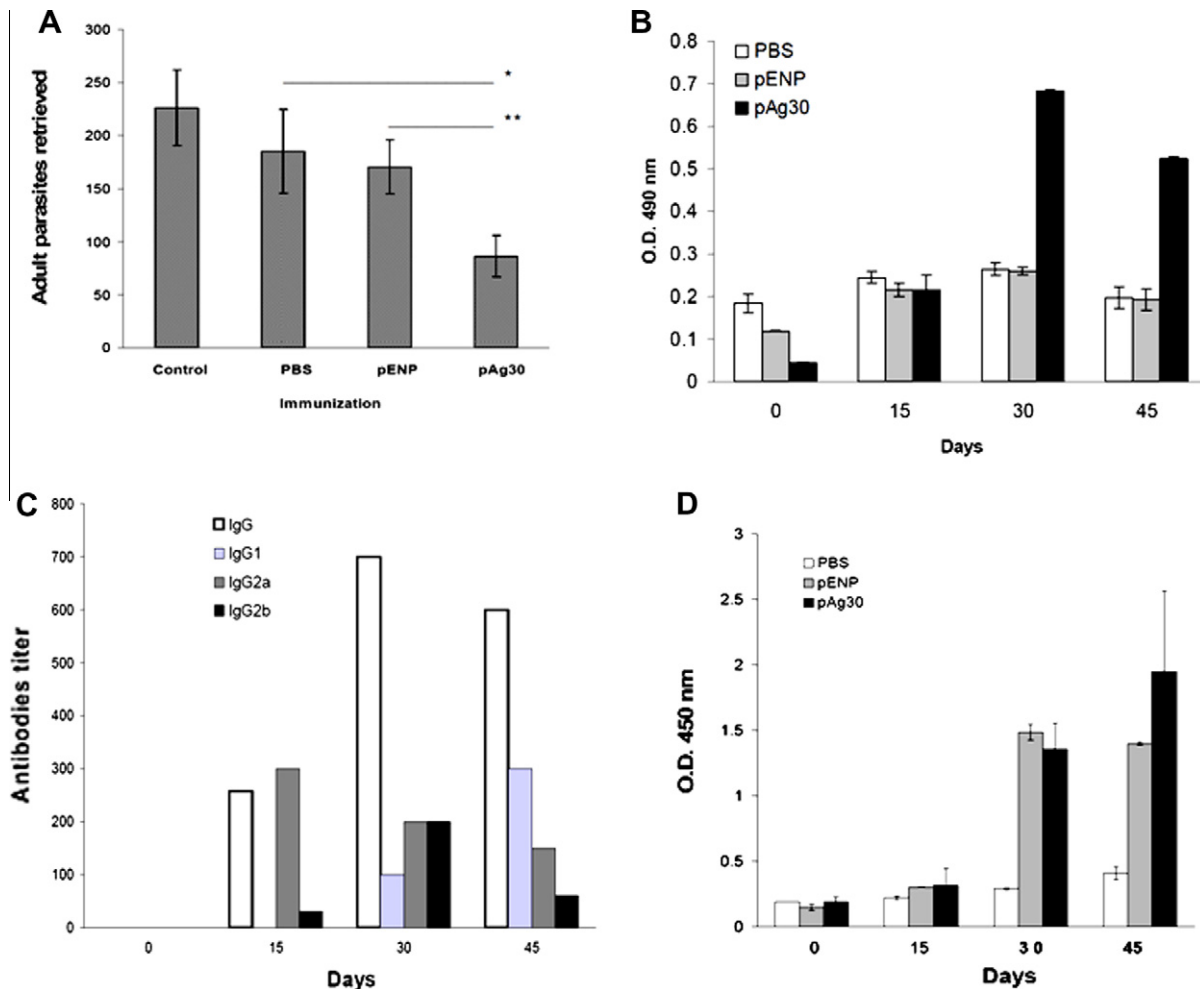
IFA analysis of *T. spiralis* ML confirmed that serum IgG antibodies from immunized mice recognized the native protein (gp43) on the parasite surface (Fig. 2C). Because antibody titers were low (weak at 1:80), the fluorescence observed was lower than that observed with the serum obtained from *T. spiralis*-infected mice (Fig. 2B). In this regard, it must be considered that these antibodies were raised against a single epitope. As gp43 is synthesised by  $\alpha$ -stichocytes of ML, we investigated whether antibodies raised against recombinant Ag30 were able to recognize internal organelles of the parasite. In fact, internal structures of the parasite were recognized by the anti-Ag30 serum (Fig. 2F). Similar internal recognition was exhibited by sera from infected mice (Fig. 2E). In addition, serum antibodies from recombinant Ag30-immunized mice recognized a protein band of 43 kDa by Western blot analysis of ML soluble extract (data not shown).

### 3.4. Immunization with *Salmonella* pAg30 protected against *T. spiralis* infection

Mice immunized with *Salmonella* pENP presented an 18.14% reduction of parasite burden with respect to infection control (*P* = 0.06). Interestingly, in mice immunized with *Salmonella* pAg30, adult load reduction was 61.83% (*P* < 0.005) (Fig. 3A). The bacterial strain bearing plasmid pAg30 was recovered from spleen and lung of immunized animals 5 days after each of the three immunizations performed (data not shown).

### 3.5. The Ag30 passenger peptide displayed on the *Salmonella* surface induces a type 2 immune response

High levels of antigen specific total IgG was elicited by *Salmonella* pAg30 at day 30, which decreased at day 45; however, this



**Fig. 3.** *Salmonella* pAg30 elicits protection against the challenge with *Trichinella spiralis* ML and specific Ag30 antibody responses. Groups of eight BALB/c mice were immunized intranasally with attenuated *Salmonella* pENP or pAg30 and challenged at day 54 with 300 *T. spiralis* Muscle larvae (ML); a control group received PBS only. (A) Adult worms were recovered eight days after challenge. A statistically significant reduction in the intestinal parasite burden was found in the following groups: pAg30 vs. PBS (\*) ( $P < 0.05$ ), and pAg30 vs. pENP (\*\*\*) ( $P < 0.005$ ). (B) Serum levels of total IgG, assayed by ELISA against the synthetic Ag30 peptide in mice immunized with *Salmonella* pENP and pAg30 from day 0 to day 45 after immunization. (C) Serum titers of IgG1, IgG2a, and IgG2b assayed by ELISA against the synthetic Ag30 peptide in mice immunized with *Salmonella* pAg30 from day 0 to day 45 after immunization. (D) Total IgG antibody response against crude *Salmonella* extracts assayed by ELISA in mice immunized with *Salmonella* transformed with pENP and pAg30.

induction was not observed with *Salmonella* pENP (Fig. 3B). Antigen specific IgG1 slowly increased at day 30 and reached its highest titers at day 45 (Fig. 3C). In contrast, IgG2a titers rose earlier and were observed from day 15; however, these decreased from day 30 to day 45. Low titers of IgG2b were observed at day 15, increased at day 30, and further decreased at day 45. Similar results were obtained when *T. spiralis* crude extract was used (not shown). Similar antibody responses to the *Salmonella* live vector were elicited by *Salmonella* pAg30 and *Salmonella* pENP (Fig. 3D).

IL-5 production by PP, MLN, and spleen cells from mice immunized with *Salmonella* Ag30 was 138.4, 93.55, and 88.6 pg/mL, respectively. Cells from *T. spiralis*-infected mice produced high amounts of IL-5 (PP = 73.3, MLN = 117.55, and spleen = 174.05 pg/mL). IL-5 production by the *T. spiralis*-infected and *Salmonella* Ag30 groups was statistically different with respect to control ( $P < 0.05$ ). In contrast, cells from *Salmonella* pENP immunized animals produced very low amounts of IL-5 (19.95–24.7 pg/mL). No statistically significant differences were found with respect to control ( $P > 0.05$ ) (Fig. 4A).

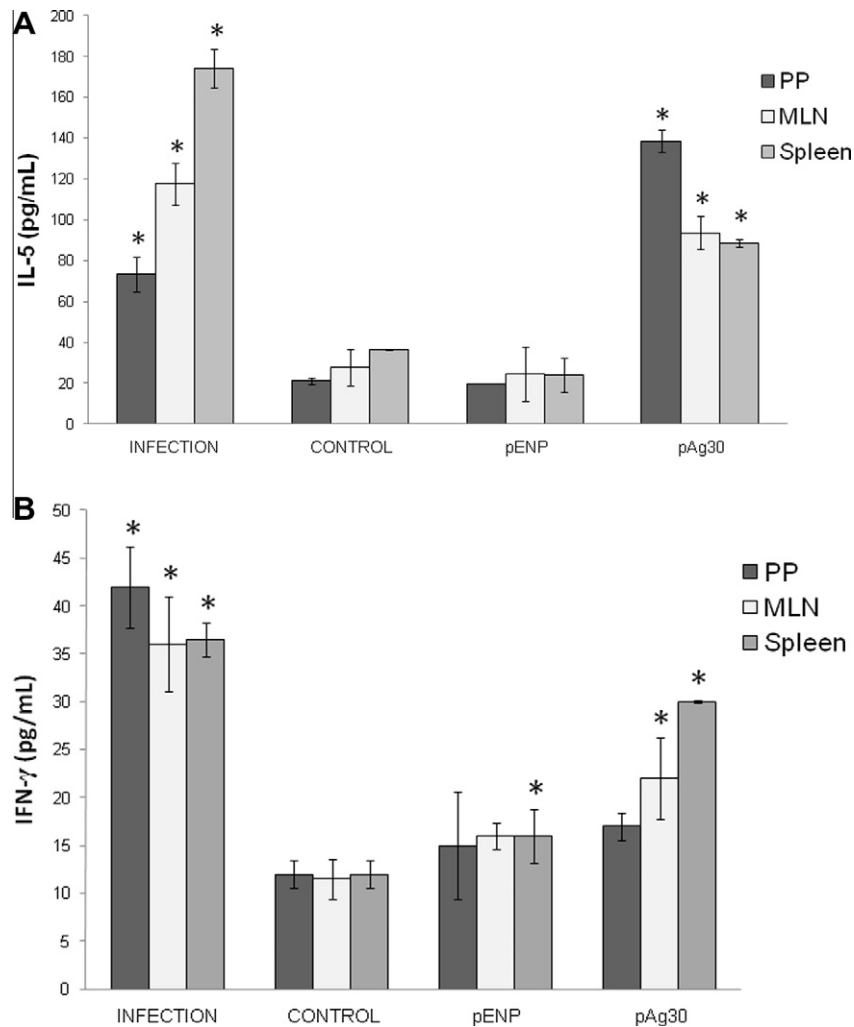
Regarding IFN- $\gamma$  production, *T. spiralis*-infected mice produced IFN- $\gamma$ , in PP (42 pg/mL), MLN (36 pg/mL), and spleen (36.5 pg/mL). Statistically significant differences were found with respect

to control ( $P < 0.05$ ). Very low amounts of IFN- $\gamma$  were also induced by PP cells from mice immunized with *Salmonella* carrying pAg30 or pENP (17 and 15 pg/mL), and no statistically significant differences were found with respect to control ( $P > 0.05$ ). Although IFN- $\gamma$  produced by spleen cells from *Salmonella* pAg30 (30 pg/mL)- and *Salmonella* pENP (16 pg/mL)-immunized animals was low; significant differences were found with respect to control ( $P < 0.05$ ) (Fig. 4B).

#### 4. Discussion

Some experimental vaccines against trichinellosis are based on complete larvae that have been autoclaved or attenuated by irradiation or ultraviolet light (Eissa et al., 2003), and others contain crude larval extracts or parasite products (Goyal and Wakelin, 1993), synthetic peptides (Robinson et al., 1995; McGuire et al., 2002), specific phage-displayed epitopes (Gu et al., 2008), and plasmid DNA (Wang et al., 2006). These have been applied in combination with a variety of adjuvants and delivery systems, such as complete Freund's adjuvant, BCG, alum, ISCOMs, and microcapsules (Robinson et al., 1995; Deville et al., 2005; Dea-Ayuela et al., 2006).





**Fig. 4.** IL-5 and IFN- $\gamma$  *Salmonella* pAg30 levels of IL-5 (A) and IFN- $\gamma$  (B) determined in supernatants of Peyer's patches (PP), Mesenteric lymphoid nodes (MLN), and spleen cells of mice intranasally immunized (*Salmonella enterica* carrying pAg30 or pENP). Immune cells from untreated or *Trichinella spiralis*-infected mice were also included. Cells obtained at day 54 of the immunization schedule were cultured for 48 h in the presence of *T. spiralis* crude homogenate antigen (50  $\mu$ g) and the cytokines released were quantified by ELISA. Statically significant differences ( $P < 0.05$ ) are indicated by (\*) compared with control.

Special attention has been paid to the glycoproteins of *T. spiralis* ML that originate in the stichosome of the parasite and that are abundant in both the E/S components and cuticular surface of the parasite (Yépez-Mulia et al., 2007). They share a unique carbohydrate epitope, tyvelose (Denkers et al., 1990; Wisniewski et al., 1993; Reason et al., 1994; Bolás-Fernández and del Corral-Bezara, 2006), which confers their immunodominance and recognition by a wide range of hosts (Robinson et al., 1991; Yépez-Mulia et al., 1996; Ortega-Pierres et al., 2000). Extensive research has been done in relation to the E/S gp43 that immunolocalizes within the  $\alpha$ -stichocyte of ML (Despommier, 1998; Wu et al., 2002; Robinson and Connolly, 2005). This immunodominant glycoprotein was sequenced and two main protective epitopes were identified: the 40–80 (ANMNTDSGHALVQTLAEWMG) and the 210–239 (RLEMYGSFLAKVMV VNMRIWAVTDNTLQTT) aminoacid strands (Vassilatis et al., 1992; Robinson et al., 1995). The gp43-derived 30- and 40-mer peptides induced protection against the intestinal phase of *T. spiralis* infection when they were administered intranasally or subcutaneously with the subunit B of cholera toxin or incomplete Freund's adjuvant, respectively (Robinson et al., 1995; McGuire et al., 2002). In the case of the 30-mer synthetic peptide (amino acids 210–239, Ag30), it reduced *T. spiralis* adult load at the intestinal level (ca. 40% at day 8 postinfection) and induced antigen-

specific IgG1, intestinal IgA, and a type 2 cytokine profile (McGuire et al., 2002).

Based on these observations, we decided to investigate whether Ag30 could also be protective as a fusion protein displayed on the bacterial surface of a live attenuated *S. enterica* vector. We have previously reported the use of the autotransporter MisL to display and release passenger antigens from the surface of *S. enterica* (Ruiz-Perez et al., 2002; Ruiz-Olvera et al., 2003; Luria-Perez et al., 2007) and employed different tags to trace fusion proteins when antibodies to passenger antigen were unavailable. Here, using a similar approach, the autotransporter ShdA was employed to autodisplay the Ag30 epitope and a molecular tag (FLAG) in order to track the fusion protein. The LTB signal peptide was utilized to translocate the fusion protein to the periplasmic space (Ruiz-Pérez et al., 2002; Ruiz-Olvera et al., 2003). It is noteworthy that the autotransporter ShdA plays an important role in the adhesion of the bacteria to the intestinal epithelium (Kingsley et al., 2002; Kingsley et al., 2004); however, the truncated form of ShdA ( $\Delta\alpha$ - $\beta$ ShdA) used in this study does not affect the bacteria expression and exposition of the recombinant antigen to immune system.

The expression of Ag30 as fusion protein on the surface of *S. enterica* serovar Typhimurium SL3261 was confirmed by IFA and flow

cytometry; however, in the case of the pENP strain, flow cytometry analysis showed two populations: one expressing FLAG, and the other not expressing FLAG. Nevertheless, the positive population also presented 2-log, relative-light-unit displacement with respect to the controls. This result can be explained by the fact that the FLAG peptide may be too short for efficient translocation. Our data confirmed that ShdA can be used to express passenger antigens on the surface of *S. enterica*. In addition, it was demonstrated that sera raised against the recombinant Ag30 recognized the native protein on the surface and internal organelles of *T. spiralis* ML, indicating that Ag30 epitope in the fusion protein maintained its conformational and antigenic properties.

Importantly, mice immunized with *Salmonella* pAg30 and challenged with *T. spiralis* ML showed a significant adult load reduction (61.83%), which is higher than that previously reported following immunization with the synthetic 30-mer peptide and the subunit B of cholera toxin as adjuvant (McGuire et al., 2002). Additionally, the *Salmonella* pAg30 strain induced higher protection than a DNA vaccine coding for the immunodominant antigen Ts87 of *T. spiralis* ML delivered by *Salmonella typhimurium* by oral administration (29.8% reduction of adult burden) (Yang et al., 2010). An important aspect to take into account is that it has been accepted that intranasal immunization elicits a stronger mucosal response than oral immunization (Galen et al., 1997); in conjunction with the antigen employed (Ag30), this may account for the protection observed with *Salmonella* pAg30. Our results strongly support the use of recombinant *Salmonella* pAg30 for inducing a protective immune response against the enteral phase of *T. spiralis* infection.

Protection was mainly associated with a type-2 immune response characterized by Ag30-specific IgG1 antibody response and high production of IL-5. It is noteworthy that *Salmonella* pENP elicited no significant increase in IL-5 with respect to the control group. *Salmonella* pAg30-immunized mice elicited no significant production of IFN- $\gamma$  in PP cells, however, in MLN and spleen, low but significant production of IFN- $\gamma$  was induced. In contrast, in *T. spiralis*-infected mice, IFN- $\gamma$  was produced in the three tissues. In this regard, it is well known that during *T. spiralis* infection, an early type-1 response is elicited and once the infection is established, there is a type-2 immune response that is characterized by intestinal mastocytosis, specific IgG1 and IgE responses, and the release of IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, and IL-13 cytokines (Grencis, 1997). A balanced Th1/Th2 immune response has been reported by Yang et al. (2010) using *S. typhimurium* to deliver a DNA vaccine coding for the immunodominant antigen Ts87 of *T. spiralis* ML. Our data also show the presence of a Th1/Th2 immune response in *Salmonella* pAg30-immunized mice, characterized by significant IL-5 production and low production of IFN- $\gamma$ .

Recently, recombinant attenuated *Salmonella* vaccine strains have been developed and pilot studies are being performed for their use as vectors for delivery of protozoal and helminth antigens to the gastrointestinal mucosa and other lymphoid tissues. These vaccines have been reported to induce both humoral- and cell-mediated immune responses that lead to significant protection against parasite challenge (Konjufca et al., 2006; Petavy et al., 2008). Therefore, this study should open new perspectives for vaccine design against *T. spiralis* infection.

In summary, an attenuated *Salmonella* vaccine strain carrying Ag30 epitope derived from the gp43 of *T. spiralis* ML, fused to the autotransporter ShdA and expressed on the bacterial surface, was able to induce significant protection against parasite challenge (61.83% reduction of adult load), eliciting epitope-specific IgG1 antibodies and IL-5 production. It will be of interest to determine in further studies whether *Salmonella* pAg30 can induce long-lasting host protection against *T. spiralis* infection.

## Acknowledgments

ENP-M was the recipient of a fellowship from the IMSS and CONACyT-México (Grant 49342). This work was approved by the IMSS Local Research and Bioethics Committee and was supported by grants from the IMSS-FOFOI (2005-785-014) and CONACyT-México (G38523-M). The authors are grateful to Leticia Damasio and Cynthia Paola López-Pacheco for their technical assistance.

## References

- Abd El, G.M., Jansen, A., Clare, S., Hall, L., Pickard, D., Kingsley, R.A., Dougan, G., 2007. Candidate live, attenuated *Salmonella enterica* serotype Typhimurium vaccines with reduced fecal shedding are immunogenic and effective oral vaccines. *Infection and Immunity* 75, 1835–1842.
- Bolás-Fernández, F., del Corral-Bezara, L., 2006. TSL-1 antigens of *Trichinella*: an overview of their potential role in parasite invasion, survival and serodiagnosis of trichinellosis. *Research in Veterinary Science* 81, 297–303.
- Cui, J., Wang, Z.Q., Xu, B.L., 2011. The epidemiology of human trichinellosis in China during 2004–2009. *Acta Tropica* 118, 1–5.
- Chatfield, S.N., Charles, I.G., Makoff, A.J., Oxer, M.D., Dougan, G., Pickard, D., Slater, D., Fairweather, N.F., 1992. 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* 10, 888–892.
- Chen, H., Schifferli, D.M., 2007. Comparison of a fimbrial versus an autotransporter display system for viral epitopes on an attenuated *Salmonella* vaccine vector. *Vaccine* 25, 1626–1633.
- Dea-Ayuela, M.A., Rama-Íñiguez, S., Bolás-Fernández, F., 2006. Vaccination of mice against intestinal *Trichinella spiralis* infections by oral administration of antigens microencapsulated in methacrylic acid copolymers. *Vaccine* 24, 2772–2780.
- Denkers, E.Y., Wassom, D., Krco, C., Hayes, C.E., 1990. The mouse antibody response to *Trichinella spiralis* defines a single immunodominant epitope shared by multiple antigens. *Journal of Immunology* 144, 3152–3159.
- Despommier, D.D., 1998. How does *Trichinella spiralis* make itself at home? *Parasitology Today* 14, 318–323.
- Deville, S., Pooter, A., Aucouturier, J., Lainé-Prade, V., Cote, M., Boireau, P., Vallée, I., 2005. Influence of adjuvant formulation on the induced protection of mice 567 immunized with total soluble antigen of *Trichinella spiralis*. *Veterinary Parasitology* 132, 75–80.
- Dupouy-Camet, J., 2000. Trichinellosis: a worldwide zoonosis. *Veterinary Parasitology* 93, 191–200.
- Eissa, M.M., el-Azzouni, M.Z., Baddour, N.M., Boulos, L.M., 2003. Vaccination trial against experimental trichinellosis using autoclaved *Trichinella spiralis* larvae vaccine (ATSLV). *Journal of Egyptian Society of Parasitology* 33, 219–228.
- Else, K.J., Grecnis, R.K., 1991. Cellular immune responses to the murine nematode parasite *Trichuris muris*. I. Differential cytokine production during acute or chronic infection. *Immunology* 72, 508–513.
- Gajadhar, A.A., Gamble, H.R., 2000. Historical perspectives and current global challenges of *Trichinella* and trichinellosis. *Veterinary Parasitology* 93, 183–189.
- Galen, J.E., Gómez-Duarte, O.G., Losonsky, G.A., Halpern, J.L., Lauderbaugh, C.S., Kaintuck, S., Reymann, M.K., Levine, M.M., 1997. 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* 15, 700–708.
- Gamito-Santos, J.A., Gómez, L., Calero-Bernal, R., Rol-Díaz, J.A., González-Ruibal, L., Gómez-Blázquez, M., Pérez-Martín, J.E., 2009. Histopathology of trichinellosis in wild boar. *Veterinary Parasitology* 165, 165–169.
- González, C., Hone, D., Noriega, F.R., Tacket, C.O., Davis, J.R., Losonsky, G., Nataro, J.P., Hoffman, S., Malik, A., Nardin, E., Szein, M.B., Heppner, D.G., Fouts, T.R., Isibasi, A., Levine, M.M., 1994. *Salmonella typhi* vaccine strain CVD 908 expressing the circumsporozoite protein of *Plasmodium falciparum*: strain construction and safety and immunogenicity in humans. *The Journal of Infection Disease* 169, 927–931.
- González, C.R., Noriega, F., Huerta, S., Santiago, A., Vega, M., Paniagua, J., Ortiz-Navarrete, V., Isibasi, A., Levine, M.M., et al., 1998. Immunogenicity of a *Salmonella typhi* CVD908 candidate vaccine strain expressing the major surface protein gp63 of *Leishmania mexicana mexicana*. *Vaccine* 16, 1043–1052.
- Goyal, P.K., Wakelin, D., 1993. Vaccination against *Trichinella spiralis* in mice using antigens from different isolates. *Parasitology* 107, 311–317.
- Grencis, R.K., 1997. Th2-mediated host protective immunity to intestinal nematode infections. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 352, 1377–1384.
- Gu, Y., Li, J., Zhu, X., Yang, J., Li, Q., Liu, Z., Yu, S., Li, Y., 2008. *Trichinella spiralis*: characterization of phage-displayed specific epitopes and their protective immunity in BALB/c mice. *Experimental Parasitology* 118, 66–74.
- Henderson, I.R., Navarro-García, F., Desvaux, M., Fernández, R.C., Ala'Aldeen, D., 2004. Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 68, 692–744.
- Hoise, S.K., Stocker, B.A., 1981. Aromatic-dependent *Salmonella typhimurium* are non-virulent and effective as live vaccines. *Nature* 291, 238–239.

- Igarashi, I., Asaba, U., Xuan, X., Omata, Y., Saito, A., Nagasawa, H., Fujisaki, K., Suzuki, N., Iwakura, Y., Mikami, T., 2000. Immunization with recombinant surface antigens p26 with Freund's adjuvants against *Babesia rodhaini* infection. The Journal of Veterinary Medical Science 62, 717–723.
- Jose, J., Meyer, T.F., 2007. The autodisplay story, from discovery to biotechnical and biomedical applications. Microbiology and Molecular Biology Reviews 71, 600–619.
- Kang, H.Y., Curtiss III, R., 2003. Immune responses dependent on antigen location in recombinant attenuated *Salmonella typhimurium* vaccines following oral immunization. FEMS. Immunology Medical Microbiology 37, 99–104.
- Kingsley, R.A., Abi, G.D., Puebla-Osorio, N., Keestra, A.M., Berghman, L., Baumler, A.J., 2004. Fibronectin binding to the *Salmonella enterica* serotype Typhimurium ShdA autotransporter protein is inhibited by a monoclonal antibody recognizing the A3 repeat. Journal of Bacteriology 186, 4931–4939.
- Kingsley, R.A., Santos, R.L., Keestra, A.M., Adams, L.G., Baumler, A.J., 2002. *Salmonella enterica* serotype Typhimurium ShdA is an outer membrane fibronectin binding protein that is expressed in the intestine. Molecular Microbiology 43, 895–905.
- Konjufca, V., Wanda, S.Y., Jenkins, M.C., Curtiss, R.A.III., 2006. Recombinant attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium vaccine encoding *Eimeria acervulina* antigen offers protection against *E. acervulina* challenge. Infection and Immunity 74, 6785–6796.
- McVay, C.S., Tsung, A., Appleton, J., 1998. Participation of parasite surface glycoproteins in antibody-mediated protection of epithelial cells against *Trichinella spiralis*. Infection and Immunity 66, 1941–1945.
- McVay, C.S., Bracken, P., Gagliardo, L.F., Appleton, J., 2000. Antibodies to tyvelose exhibit multiple modes of interference with the epithelial niche of *Trichinella spiralis*. Infection and Immunity 68, 1912–1918.
- McGuire, C., Chan, W.C., Wakelin, D., 2002. Nasal immunization with homogenate and peptide antigens induces protective immunity against *Trichinella spiralis*. Infection and Immunity 70, 7149–7152.
- Medina, E., Guzmán, C.A., 2001. Use of live bacterial vaccine vectors for antigen delivery: potential and limitations. Vaccine 19, 1573–1580.
- Miller, H.R., Pemberton, A.D., 2002. Tissue-specific expression of mast cell granule serine proteinases and their role in inflammation in the lung and gut. Immunology 105, 375–390.
- Miller, J.H., 1992. The genetic code and codon usage in selected organisms. In: Miller, J.H. (Ed.), A short course in bacterial genetics: a laboratory manual and handbook for *Escherichia coli* and related bacteria. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY USA, pp. 19.1–19.4.
- Murrell, K.D., Pozio, E., 2000. Trichinellosis: the zoonosis that won't go quietly. International Journal for Parasitology 30, 1339–1349.
- Lawrence, C.E., Paterson, J.C., Higgins, L.M., MacDonald, T.T., Kennedy, M.W., Garside, P., 1998. IL-4 regulated enteropathy in an intestinal nematode infection. European Journal of Immunology 28, 2672–2684.
- Lawrence, C.E., 2003. Is there a common mechanism of gastrointestinal nematode expulsion? Parasite Immunology 25, 271–281.
- Luria-Perez, R., Cedillo-Barron, L., Santos-Argumedo, L., Ortiz-Navarrete, V.F., Ocaña-Mondragón, A., González-Bonilla, C.R., 2007. A fusogenic peptide expressed on the surface of *Salmonella enterica* elicits CTL responses to a dengue virus epitope. Vaccine 25, 5071–5085.
- Ortega-Pierres, M.G., Arriaga, C., Yépez-Mulia, L., 2000. Epidemiology of trichinellosis in Mexico, Central and South America. Veterinary Parasitology 93, 201–225.
- Oxer, M.D., Bentley, C.M., Doyle, J.G., Peakman, T.C., Charles, I.G., Makoff, A.J., 1991. High level heterologous expression in *E. coli* using the anaerobically-activated nirB promoter. Nucleic Acids Research 19, 2889–2892.
- Petavy, A.N., Hormaeche, C., Lahmar, S., Ouhellil, H., Chabalgoity, A., Marchal, T., Azzouz, S., Schreiber, F., Alvite, G., Sarciron, M.E., Maskell, D., Esteves, A., Bosquet, G., 2008. An oral recombinant vaccine in dogs against *Echinococcus granulosus*, the causative agent of human hydatid disease: a pilot study. PLoS. Neglected Tropical Diseases 2, e125.
- Pozio, E., 2007. World distribution of *Trichinella* spp infections in animals and humans. Veterinary Parasitology 149, 3–21.
- Reason, A.J., Ellism, L.A., Appleton, J.A., Wisniewski, N., Grieve, R.B., McNeil, M., Wassom, D.L., Morris, H.R., Dell, A., 1994. Novel tyvelose-containing tri- and tetra antennary N-glycans in the immunodominant antigens of the intracellular parasite *Trichinella spiralis*. Glycobiology 4, 593–603.
- Ribicich, M., Gamble, H.R., Bolpe, J., Scialfa, E., Krivokapich, S., Cardillo, N., Betti, A., Holzmann, M.L., Pasqualetti, M., Fariña, F., Rosa, A., 2010. Trichinella infection in wild animals from endemic regions of Argentina. Parasitology Research 107, 377–380.
- Robinson, M., Krco, C.J., Beito, T.G., David, C.S., 1991. Genetic control of the immune response to *Trichinella spiralis*: recognition of muscle larval antigens. Parasite Immunology 13, 391–340.
- Robinson, K., Bellaby, T., Chan, W.C., Wakelin, D., 1995. High levels of protection induced by a 40-mer synthetic peptide vaccine against the intestinal nematode parasite *Trichinella spiralis*. Immunology 86, 495–498.
- Robinson, M.W., Connolly, B., 2005. Proteomic analysis of the excretory-secretory proteins of the *Trichinella spiralis* L1 larva, a nematode parasite of skeletal muscle. Proteomics 5, 4525–4532.
- Ruiz-Olvera, P., Ruiz-Pérez, F., Sepúlveda, N.V., Santiago-Machuca, A., Maldonado-Rodríguez, R., García-Elorriaga, G., González-Bonilla, C., 2003. Display and release of the *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein using the autotransporter MisL of *Salmonella enterica*. Plasmid 50, 12–27.
- Ruiz-Pérez, F., León-Kempis, R., Santiago-Machuca, A., Ortega-Pierres, G., Barry, E., Levine, M., González-Bonilla, C., 2002. Expression of the *Plasmodium falciparum* immunodominant epitope (NANP)(4) on the surface of *Salmonella enterica* using the autotransporter MisL. Infection and Immunity 70, 3611–3620.
- Sambrook, J., Russell, D.W., 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3rd ed. Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Press.
- Shroff, K.E., Marcucci-Borges, L.A., de Bruin, S.J., Winter, L.A., Tiberio, L., Pachuk, C., Snyder, L.A., Satishchandran, C., Ciccarelli, R.B., Higgins, T.J., 1999. Induction of HSV-gD2 specific CD4(+) cells in Peyer's patches and mucosal antibody responses in mice following DNA immunization by both parenteral and mucosal administration. Vaccine 18, 222–230.
- Tuohy, M., Lammis, D.A., Wakelin, D., Huntley, J.F., Newlands, G.F.J., Miller, H.R., 1990. Functional correlations between mucosal mast cell activity and immunity to *Trichinella spiralis* in high and low responder mice. Parasite Immunology 12, 675–685.
- Urban Jr., J.F., Schopf, L., Morris, S.C., Orekhova, T., Madden, K.B., Betts, C.J., Gamble, H.R., Byrd, C., Donaldson, D., Else, K., Finkelman, F.D., 2000. Stat6 signaling promotes protective immunity against *Trichinella spiralis* through a mast cell and T cell- dependent mechanism. Journal of Immunology 164, 2046–2052.
- van der Waaij, L.A., Mesander, G., Limburg, P.C., van der, W.D., 1994. Direct flow cytometry of anaerobic bacteria in human feces. Cytometry 16, 270–279.
- Vassiliatis, D.K., Despommier, D., Misesk, D.E., Polvere, R.I., Gold, A.M., Van der Ploeg, L.H., 1992. Analysis of a 43-kDa glycoprotein from the intracellular parasitic nematode *Trichinella spiralis*. The Journal of Biological Chemistry 267, 18459–18465.
- Wang, C.H., Richards, E.M., Bell, R.G., 1999. Rapid anti-helminthic response of B lymphocytes in the intestinal mucosal tissues of rats. Cellular Immunology 193, 59–70.
- Wang, Z.Q., Cui, J., Wei, H.Y., Han, H.M., Zhang, H.W., Li, Y.L., 2006. Vaccination of mice with DNA vaccine induces the immune response and partial protection against *T. spiralis* infection. Vaccine 24, 1205–1212.
- Wisniewski, N., McNeil, M., Grieve, R.B., Wassom, D.L., 1993. Characterization of novel fucosyl containing glycoconjugates from *Trichinella spiralis* muscle stage larvae. Molecular and Biochemical Parasitology 61, 25–35.
- Wu, Z., Nagano, I., Nakada, T., Takahashi, Y., 2002. Expression of excretory and secretory protein genes of *Trichinella* at muscle stage differs before and after cyst formation. Parasitology International 51, 155–161.
- Yépez-Mulia, L., Arriaga, C., Peña, M.A., Gual, F., Ortega-Pierres, G., 1996. Serologic survey of trichinellosis in wild mammals kept in a Mexico City Zoo. Veterinary Parasitology 67, 237–246.
- Yépez-Mulia, L., Hernández-Bello, R., Arizmendi-Puga, N., Fonseca-Liñán, R., Ortega-Pierres, G., 2007. Contributions to the study of *Trichinella spiralis* TSL-1 antigens in host immunity. Parasite Immunology 29, 661–670.
- Yang, Y., Zhang, Z., Yang, J., Chen, X., Cui, S., Zhu, X., 2010. Oral vaccination with Ts87 DNA vaccine delivered by attenuated *Salmonella typhimurium* elicits a protective immune response against *Trichinella spiralis* larval challenge. Vaccine 28, 2735–2742.