



UNIVERSIDAD DE GRANADA

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

**Inmunoprotección de un antígeno recombinante y del
lipopéptido derivado del mismo frente a nematodos
intestinales: estudios de la inmunomodulación**

MARÍA MERCEDES GÓMEZ SAMBLÁS

TESIS DOCTORAL

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autora: María Mercedes Gómez Samblas
ISBN: 978-84-9163-174-3
URI: <http://hdl.handle.net/10481/45853>



UNIVERSIDAD DE GRANADA
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA



**Inmunoprotección de un antígeno recombinante y del
lipopéptido derivado del mismo, frente a nematodos
intestinales: estudios de la inmunomodulación**

Memoria presentada por la licenciada en Biología
María Mercedes Gómez Samblás
para optar al título de Doctor (con mención internacional)
por la Universidad de Granada

Director:
Dr. Antonio Osuna Carrillo de Albornoz

Granada 2017

La doctoranda María Mercedes Gómez Samblás y el director de Tesis Antonio Osuna

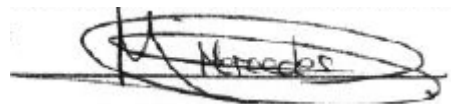
Garantizamos, al firmar esta Tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por la doctoranda bajo la dirección del director de Tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Granada 15/12/2016

Antonio Osuna

Handwritten signature of Antonio Osuna in blue ink. The signature is stylized, with a large 'A' and 'O' that are connected. Below the main signature, the name 'osuna' is written in a smaller, simpler font.

María Mercedes Gómez Samblás

Handwritten signature of María Mercedes Gómez Samblás in blue ink. The signature is enclosed within a large, horizontal oval shape. The name 'Mercedes' is clearly visible within the oval.

Parte de los resultados de la presente Tesis doctoral se encuentran bajo revisión para ser publicados en la revista científica Open Biology:

M. Gomez Samblas, JJ. García Rodríguez, M Trelis, D. Bernal, FJ Lopez-Jaramillo, F Santoyo Gonzalez, S. Vichez, AM Espino, F. Bolás Fernandez, A. Osuna. Self-Adjuvanting C18 Lipid Vinilsulfone-PP2A vaccine: study of the induced immunomodulation against *Trichuris muris* infection.

Presentados en:

- 13th International Congress of Parasitology. Mexico City, Mexico. 2014.
- XII Congreso Centroamericano y del Caribe de Parasitología y Medicina Tropical. Punta Cana, República Dominicana, 2015.
- XIX Congreso de la Sociedad Española de Parasitología II Encuentro Internacional de Parasitólogos de España, Francia, Italia y Portugal. Vitoria-Gasteiz, España. 2015.

*“Camina hacia el futuro, abriendo nuevas puertas
y probando cosas nuevas,
sé curioso... porque nuestra curiosidad
siempre nos conduce por nuevos caminos”*

Walt Disney

Agradecimientos

Llegado este momento, me gustaría aprovechar este espacio para agradecer a todas las personas que me han ayudado y han hecho posible la realización de la presente tesis doctoral.

En primer lugar agradecer a mi director, el profesor Catedrático Antonio Osuna por darme la oportunidad de iniciar mi carrera investigadora en el grupo de investigación que él dirige, dentro del departamento de Parasitología de la Universidad de Granada, y depositar en mí su confianza plena. Es increíble que tras su extensa y exitosa vida en esta profesión aún sigue con las mismas ganas y el entusiasmo de alguien que está comenzando, gracias por esto también, por transmitirlo y hacer vernos la luz cuando todo es oscuridad.

También me gustaría hacer una mención especial a la Dra. Susana Vilchez, profesora Titular del departamento de Bioquímica de la Universidad de Granada, por contar conmigo para actividades dentro del grupo de investigación, la participación muy activa en proyectos conjuntos y compartir siempre de buena gana y en cualquier momento sus conocimientos de química, bioquímica, y no tan interesantes pero necesarios, todo lo relacionado con la burocracia.

Tengo que agradecer a Francisco Bolás, profesor Catedrático de la Universidad Complutense de Madrid y a la Dra. María Trelis profesora de la Universidad de Valencia por su colaboración en el proyecto con la cesión de los nematodos empleados en el trabajo, sin vosotros la presente tesis doctoral no hubiera sido posible.

A la Dra. Ana Espino profesora de la Universidad de Puerto Rico, por acogerme en su grupo de investigación y hacer posible que esta tesis doctoral tenga una mención internacional. También agradecerle todos los conocimientos y consejos en el trabajo con proteínas y vacunas que me ha transmitido. Gracias por tu amabilidad y cariño.

Junto a la doctora Ana Espino, quiero agradecer a su grupo de investigación que me aceptaron como una más desde el primer día, sin ellos al otro lado del Atlántico nada hubiera sido igual, gracias a Adianette, a Lorna por facilitarme todo lo necesario que necesitaba para trabajar, a Vasti por nuestras conversaciones de la vida y sus ganas de aprender, a Marcos por recordarme las ganas de triunfar, a Caleb por hacerme reír en cada momento, ayudarme y no dejarme ni un minuto sola y por último a la Dra. Ivelisse

Martín por enseñarme y ayudarme en mi proyecto de trabajo además de acogerme como parte de su familia. A Luis y Ramón por compartir sus ideas científicas y momentos muy divertidos que nunca olvidaré. A todos gracias por los jueves en la Neurona.

Volviendo a la Universidad de Granada tengo que dar las gracias al profesor Catedrático Francisco Santoyo y al profesor Titular F. Javier López Jaramillo, pertenecientes al Departamento de química orgánica, por la síntesis de la molécula oleico vinil sulfona.

Agradecer al Dr. Luis Álvarez Cienfuegos por darnos a conocer el Laboratorio de Espectrometría de Masas de la Universidad Autónoma de Madrid.

Como todo investigador que lea estos agradecimientos sabrá que el tiempo que pasamos en el laboratorio es infinito, por ello, aparte de compañeros de trabajo hacemos amigos y yo diría que hasta lazos fraternales se crean. Por ello quiero mencionar a todas las personas que han pasado por el laboratorio con las que he disfrutado momentos inolvidables, me han ayudado y me han hecho crecer como persona. Podría escribir páginas y páginas pero me limitaré a nombrarlos, gracias Luismi, Alfonso, Juanfran, Gloria, Jennifer, María José, María, Celia, y Javi.

He dicho que se entablaban lazos fraternales, pues sí, quiero agradecer a Isa y Tania por ser mi familia en Granada, por estar siempre que algo no salía bien, por los viajes juntas, por los paseos por esta bonita ciudad, por una ayuda incondicional tanto dentro del laboratorio como fuera, por saber que no te van a juzgar, simplemente te darán su opinión y respetarán la tuya. Por esto y por mil cosas más que las tres sabemos, GRACIAS.

A la Dra. Fátima por enseñarme meticulosamente cómo se trabaja en un laboratorio, sin prisa, con orden, limpieza, rigurosidad, cuidando el material, respetando a los compañeros, cuidando la economía. Porque la base que tengo me la enseñó ella y creo que poca gente tiene la suerte de tener una maestra científica.

También me gustaría dar las gracias a Encarna y Carlos (técnico y administrador), dos personas importantes en el departamento con las que puedes compartir anécdotas de la vida diaria y que te ayudaran en lo que puedan. Eso sí, cuando llegue su tiempo (risas).

Tengo la suerte de tener amigos que no saben nada de ciencia con los que poder disfrutar y olvidar durante un rato cuando algo no sale bien, ya que a veces no es ni un día ni dos, sino meses. Gracias a mis amigos de Jaén y en especial a Juanan, Almudena, Marta, Juanjo Marilola, Jesús, Rocío, Chari, Ángel y María, Sergio, por recordarme que existe vida más allá de la ciencia y todos los momentos felices. A Aida por estar siempre dispuesta para todo, por las charlas de entresemana y las cervezas de los viernes.

A las personas con las que he compartido casa durante estos años en Granada y juntos hemos creado un hogar, a Laura y Carlos, a M^a Angeles y M^a José, a M^a del mar.

Por último a las personas que han hecho posible que yo llegue hasta aquí, a mi familia. A mis padres, Juan Pedro y Rocío por inculcarme valores y prepararme para poder conseguir lo que yo me propusiera, por todo el esfuerzo que ha llevado. A mis hermanos, Juampe y Rocío, por entenderme, aguantarme y tener paciencia en los momentos cuando no comprenden lo que está sucediendo, por su amor incondicional. A Inés, por saber que mi hermano está bien y es feliz fuera de España. A mis abuelos porque para ellos soy la mejor.

Resumen

Varios cientos de millones de casos humanos se encuentran parasitados a nivel mundial por helmintos intestinales y en particular por nematodos, constituyendo un problema importante de salud pública para amplias regiones del planeta en especial aquellas que se encuentran en vías de desarrollo. Por otra parte la infestación por nematodos parásitos constituye una de las lacras más importantes con las que se enfrenta la ganadería a nivel mundial. A las pérdidas en la producción (carne, leche o lana) se suman los gastos derivados de la rotación del ganado o de los tratamientos con antihelmínticos. Se estima que dichas pérdidas pueden llegar hasta el 50 % de los gastos de producción.

En la presente tesis doctoral se pretendió la búsqueda de una fórmula vacunal que actuara de forma polivalente frente a las infecciones por distintos nematodos parásitos. También se presentó especial énfasis en la vía de inmunización, se ha ensayado la inmunización a través de mucosas, y en concreto la inmunización intranasal.

Se dio especial importancia a la necesidad de estudiar la transformación del péptido recombinante usado en lipopéptido con el objetivo para que actúe de adyuvante sin necesidad de otros compuestos y que inicie y sea capaz de soportar la transición desde una respuesta innata a una respuesta adaptativa. Dicho lipopéptido se forma de la unión en un solo paso, de un compuesto formado por un oleico vinil sulfona (OVS) unido al antígeno recombinante perteneciente a la región catalítica de la enzima serina treonina fosfatasa (rPP2A). De igual forma se ha estudiado el papel adyuvante de los lipopolisacáridos (LPS) presentes en las paredes bacterianas de la bacteria *E. coli*. Como modelo de nematodos se usó *Trichuris muris* y *Aspicularis tetraútera* y como hospedador mamífero el modelo murino.

Para estudiar la efectividad inducida por las diferentes fórmulas vacunales en los ratones, se contó el número de huevos en heces y el número de vermes. Al objeto de evaluar la respuesta inmune desencadenada y ver qué respuesta T helper era responsable de la protección frente a los modelos de nematodos empleados, se procedió a medir los niveles de interleucinas propias de cada respuesta T helper en órganos linfoides mediante PCR cuantitativa en tiempo real, a su vez que se estudiaron citoquinas

mediante microscopía láser confocal en secciones finas de intestino de los ratones inmunizados.

De los resultados del presente trabajo se desprende que la inmunización con el péptido recombinante rPP2A desencadena una respuesta protectora muy elevada frente a la infección por los modelos de nematodos objeto del estudio y que dicha respuesta se incrementa cuando la inmunización se hizo con el lipopéptido. Por otra parte se comprueba que la respuesta Th17 juega un papel en la facilitación del hábitat necesario para la implantación intestinal del parasitismo por nematodos.

Abstrac

Several hundreds of millions of humans are parasitized worldwide by intestinal helminths and in particular by nematodes, constituting an important public-health challenge for broad regions of the planet, particularly in developing countries. In addition, infestation by nematode parasites constitutes one of the worst scourges in livestock throughout the world. Added to lost production (meat, milk, wool etc.) are the expenses related to the culling of the livestock or to anti-helminth treatment. These losses reach as much as an estimated 50% of production costs.

The present doctoral thesis undertakes the search for a vaccine formula that acts in a polyvalent way against the infections by different nematode parasites. Also, special emphasis is placed on the immunization route, assaying vaccination through the mucosa and specifically intranasal.

Special importance was placed on the need to study the transformation of the recombinant peptide used in the lipopeptide so that it would act as an adjuvant without the need of other compounds and could trigger and tolerate the transition from an innate response to an adaptive one. This lipopeptide is formed by the single-step bonding of a compound formed by oleic vinyl sulfone (OVS) bonded to the recombinant antigen belonging to the catalytic region of the enzyme serine threonine phosphatase (rPP2A). Similarly, the adjuvant role of lipopolysaccharides (LPS) present in the bacterial walls of *E. coli* has also been studied. As a nematode model, *Trichuris muris* and *Aspicularis tetráptera* were used while the mammal host was a murine model.

Induced effectiveness was studied by different vaccine formulas in mice, counting the number of eggs in faeces and the number of worms. As a means of evaluating the immune response triggered and for the determination of which T-helper response prompted the protection against the nematode models used, the levels of interleukins belonging to each T-helper response were measured in lymphoid organs by quantitative PCR in real time at the same time as the cytokines were studied by confocal microscopy in fine sections of the intestine of the immunized mice.

The results of the present work indicate that the immunization with the recombinant peptide rPP2A triggers a very strong protective response against infection by the nematode models under study and that this response increased when the

immunization was made with the lipopeptide. In addition, it was confirmed that the Th17 response plays a role in facilitating the habitat necessary for the intestinal implantation of nematode parasitism.

Índice

1. Introducción.....	3
1.1. Revisión bibliográfica de los helmintos.....	3
1.2. Importancia de las infecciones por nematodos	4
1.2.1. <i>Aspicularis tetraptera</i>	6
1.2.2. <i>Trichuris muris</i>	7
1.3. Evasión de la infección por nematodos gastrointestinales.....	11
1.3.1. Resistencia a fármacos	17
1.5. Desarrollo de vacunas	18
1.5.1. Adyuvantes.....	23
1.5.1.3. Sistemas particulados de liberación de antígenos	30
1.5.2. Diferentes vías de inoculación para administración de vacunas	35
1.5.3. Proteínas diana de nematodos gastrointestinales	37
2. Objetivos.....	45
3. Material y métodos	49
3.1. Parásitos	49
3.2. Modelo animal	49
3.3. Obtención del péptido recombinante PP2A (rPP2a) utilizada como vacuna.....	49
3.3.1. Expresión y purificación	50
3.3.2. Inducción.....	51
3.3.3. Purificación de proteínas recombinantes en cuerpos de inclusión.....	51
3.3.4. Purificación mediante cromatografía de afinidad	52
3.3.5. Diálisis y liofilizado	52
3.3.6. Determinación de la concentración de proteína	53
3.3.7. Electroforesis SDS-PAGE en geles de poliacrilamida.....	53
3.4. Obtención de anticuerpos policlonales frente al péptido rPP2A	54
3.5. Técnicas inmunológicas.....	55

3.5.1. ELISA.....	55
3.5.2. Western-blot	56
3.6. Síntesis del oleico vinil sulfona (OVS).....	56
3.7. Acoplamiento del oleico vinil sulfona (OVS) al péptido rPP2A mediante química “click”	58
3.8. Estudio del lipopéptido rPP2A-OVS	59
3.8.1. Determinación del peso molecular del lipopéptido recombinante rPP2A-OVS mediante la técnica de Espectrometría de Masas.	59
3.8.2 Visualización de rPP2A-OVS mediante Microscopía Electrónica de Transmisión.....	59
3.9. Ensayos de inmunización.....	60
3.9.1. Respuesta inmune inducida frente a la infección por <i>A. tetraoptera</i>	60
3.9.2. Respuesta inmune inducida frente a la infección por <i>T. muris</i>	62
3.10. Cuantificación de la expresión de interleucinas en bazo, placas de Peyers y nódulos linfáticos mesentéricos.	64
3.10.1. Extracción de RNA de órganos de ratón	64
3.10.2. Retrotranscripción del mRNA.....	65
3.10.3. Cuantificación por Real-Time PCR de la expresión de interleucinas	65
3.11. Inmunohistoquímica de tejidos de ratón	66
3.11.1. Procesado del tejido para microscopía	66
3.11.2. Preparación de las secciones finas para inmunohistoquímica.....	66
3.12. Análisis estadístico	67
3.13. Soluciones y tampones.....	67
3.14. Tabla de secuencia de oligonucleótidos de los genes de interleucinas usados en este estudio.....	69
3.15. Tabla de anticuerpos utilizados en este estudio	70
4. Resultados.....	73
4.1. Estudio in silico de la secuencia del péptido rPP2A.....	73

4.2. Obtención de la proteína recombinante	74
4.3. Lipopéptido	76
4.4. Evaluación de la carga parasitaria, determinación de nivel de interleucinas y observación de cambios en la mucosa intestinal de ratones infectados por <i>A. tetraptera</i>	77
4.4.1. Ensayo con ratones inmunizados con rPP2A y rPP2A junto a Paredes Bacterianas (rPP2A-PB).....	77
4.4.2. Ensayo con ratones anti-IL-23 ^{mAB}	80
4.5. Evaluación de la carga parasitaria, determinación de nivel de expresión de interleucinas y observación de cambios en la mucosa intestinal de ratones infectados por <i>T. muris</i> inmunizados con el péptido rPP2A y el lipopéptido rPP2A-OVS	101
4.5.1. Evaluación de los pesos de los animales tratados, como evaluación de los efectos adversos de la inmunización	101
4.5.2. Determinación de la expresión de interleucinas por PCR cuantitativa en tiempo real en órganos de ratón	104
4.5.3. Cuantificación de cambios en la mucosa intestinal mediante microscopía láser confocal.....	106
5. Discusión	117
6. Conclusiones.....	135
6. Conclusions	137
7. Bibliografía.....	141

1. INTRODUCCIÓN

1. Introducción

1.1. Revisión bibliográfica de los helmintos

Los helmintos son un grupo polifilético de invertebrados, de los cuales, los nematodos son los más abundantes con una morfología siempre de sección redondeada y un tamaño desde unos pocos milímetros a varios metros de longitud, como ocurre en las hembras de *Dracunculus* o *Placentonema*, un nematodo que vive en la placenta del cachalote y puede alcanzar fácilmente los 8.5 metros de longitud. Se estima que puede haber un millón de especies diferentes de nematodos entre las especies de vida parásita y los de vida libre gracias a su capacidad adaptativa al medio ambiente y a los hospedadores que parasitan.

Los nematodos comparten un ciclo de vida general en el que se pueden encontrar 4 fases larvarias (L1-L4), con sus correspondientes procesos de muda que dan lugar al final de las mismas a los parásitos adultos. Por lo general son dioicos y con dimorfismo sexual.

La infección por nematodos puede comenzar por la ingesta de una fase larvaria a la que se le denomina infecciosa, por ejemplo, en *Trichuris spp.* y *Ascaris spp.*, la fase de huevo embrionado maduro es la forma infectante para el hospedador, mientras que para *Trichinella spiralis* es la fase larvaria L1. Otra vía de infección por parte de los parásitos puede ser a través de la penetración de la piel por una larva L3 como es el caso de *Strongyloides spp.* En esta última, después de la penetración de la piel, los parásitos migran a los pulmones a través del torrente sanguíneo afectando así las vías respiratorias y a continuación migran hacia la tráquea antes de llegar a su destino definitivo que es el tracto gastrointestinal. Dependiendo de la especie, los nematodos habitan diferentes nichos dentro del hospedador. Muchos de ellos son gastrointestinales y se pueden alojar en el lumen, otras se pueden encontrar en la capa mucosa o submucosa incluso pudiendo variar de nicho según el estadio del ciclo de vida en que se encuentren.

Todas las infecciones de los nematodos gastrointestinales se producen por los estadios infectantes inmaduros del nematodo, tras su evolución en el aparato digestivo maduran sexualmente dentro del hospedador lo que conlleva el apareamiento y generación de hembras grávidas, las cuales en su mayoría, expulsan con las heces los huevos al medio ambiente donde vuelven a desarrollar las formas infectivas, cerrando así el ciclo de vida del parásito. Como regla general los nematodos gastrointestinales no

se multiplican dentro del hospedador. Por tanto, el número de formas infectivas que son ingeridas por el hospedador corresponden al número de parásitos que han causado la infección [1].

1.2. Importancia de las infecciones por nematodos

Las infecciones por nematodos gastrointestinales en animales destinados al consumo causan importantes pérdidas económicas en todas las partes del mundo. La prevalencia de algunas de ellas puede llegar al 100 % en los rebaños con animales de pastoreo. El efecto de las infecciones producidas por estos parásitos no sólo determina una reducción de la producción láctea, sino que se traduce en otra serie de trastornos patológicos que se concretan en un retraso del crecimiento [2], una reducción del apetito y por consiguiente pérdida de peso [3] e incluso alteraciones reproductivas. Las pérdidas económicas y de productividad causadas por parásitos tienen un impacto sustancial en la rentabilidad de las explotaciones, especialmente en animales mantenidos en sistemas de producción extensiva. En el ganado caprino y ovino las parasitosis producidas por nematodos gastrointestinales se consideran como una de las infecciones más extendidas e importantes a nivel mundial. Por ejemplo, el costo anual asociado a enfermedades parasitarias en ovejas y ganado en Australia se ha estimado en mil millones de dólares y se proponen como decenas de miles de millones de dólares en todo el mundo, sólo de acuerdo con las ventas de compuestos antiparasitarios por compañías farmacéuticas sin tener en cuenta las pérdidas de producción [4]. En vacuno lechero, del que se dispone de más información, se estima que estas pérdidas podrían ser de 0.63 litros de leche/día.

El ciclo de vida de nematodos parásitos incluye, para muchos de los ciclos biológicos, etapas de vida libre que están directamente influenciadas por el clima, principalmente la temperatura, las precipitaciones y la humedad, haciendo que algunas especies tengan una distribución geográfica determinada.

Entre las especies de nematodos cabe destacar las especies pertenecientes a las familias: Trichostrongylidae: con las especies *Trichostrongylus axei* (parásito del abomaso de rumiantes y equinos); *Ostertagia ostertagi* y *Teladorsagia circumcincta* (parásitos de vacas, ovejas y cabras); *Haemonchus contortus* (parásito del abomaso de rumiantes); *Cooperia spp.* (parásito del intestino delgado de rumiantes); *Nematodirus spp.* (parásito también de rumiantes). Familia Strongylidae: con las especies *Strongylus vulgaris*, *S. edentatus* y *S. equinus* siendo esta última, la especie de nematodos parásitos

intestinales más dañina para los caballos. Familia Ancylostomatidae que incluye los géneros *Ancylostoma* con especies parásitas del perro y del hombre y el género *Bunostomum* con especies parásitas de rumiantes y *Globocephalus ssp.* con especies parásitas en los cerdos. Superfamilia Metastrongyloidea con especies parásitas del pulmón del ganado como *Matastrongylus spp.* y *Protostrongylus spp.* Familia Filaroidea; Orden Oxyurida con la especie *Oxyurus equi* y *O. Skrabinema*. Orden Ascaridida con las especies *Ascaris*; *Toxocara*; *Toxascaris* y *Parascaris*; Orden Spirurida. Superfamilia Trichinelloidea con las diferentes especies de *Trichinella*, y *Trichiuris* entre otros.

Un estudio de las explotaciones de ovino del Reino Unido se llevó a cabo para establecer información sobre la presencia o ausencia de nematodos gastrointestinales en los animales, *T. circumcincta* era la única especie presente en el 100 % de las explotaciones. *H. contortus* fue encontrado en ~ 50 % de las explotaciones aunque estaba muy extendida por todo el país, y *T. vitrinus*, al que se encontró en el 95 % de las explotaciones [5].

Por otra parte en países más fríos como es el caso de Suecia demuestran una alta proporción de rebaños infectados con nematodos, donde las especies más prevalentes son *H. contortus*, *T. circumcincta*, *T. axei*, *Trichostrongylus colubriformis* y *Chabertia ovina*. *H. contortus* se encontró en el 37 % de los rebaños, incluso en latitudes que se aproximan al círculo polar.

En América del Norte, en Estados Unidos en 2002, el 74 % de los productores de ovino llevaron a cabo estudios epidemiológicos confirmando la presencia de dichos nematodos gastrointestinales en sus granjas [6]. En el periodo de tiempo de 2004 a 2008 también se hicieron estudios encaminados a tomar medidas ante el problema. Para ello se tuvieron en cuenta el tamaño de la explotación, la ubicación de la misma y el esfuerzo por parte de los ganaderos para el control de los parásitos. Las prácticas más populares para el control fueron pastoreo rotacional, selección genética, y suplemento alimenticio [7].

América latina y en concreto en Sudamérica, es una región importante para evaluar el impacto de los nematodos en las explotaciones ganaderas por el alto nivel de explotación, 100 millones de ovejas y 23 millones de cabras. El clima subtropical, a veces muy extendido en estas regiones, idóneo para el desarrollo del ciclo y transmisión de estos parásitos, con más del 70 % de las ovejas en Brasil, Argentina, Uruguay y Paraguay, las cuales ya en 1996 mostraban problemas por la resistencia de los animales

a los fármacos antihelmínticos [8]. En Brasil, las pérdidas económicas anuales son debidas tanto a endoparásitos del ganado como ectoparásitos, se estimaron en 2014 unas pérdidas de al menos 13.96 millones de dólares [9].

Otro estudio realizado en Canadá durante los años 2006-2008 proporcionó información del nivel de infección por nematodos gastrointestinales en esta región, demostró que los géneros de nematodos más predominantes eran *Teladorsagia spp.*, *Haemonchus spp.* y *Trichostrongylus spp.* A partir de necropsias se identificaron las especies más frecuentes, con un 36,44 % *T. axei* y un 38,26 % *T. colubriformis* [10].

1.2.1. *Aspiculuris tetraptera*

Aspiculuris tetraptera es un nematodo perteneciente a la familia Oxyuridae, orden Ascaridorida. Son parásitos que habitan el ciego y colon de ratones, ratas y otros roedores de laboratorio causándoles enterobiasis. Habitualmente la infección por oxiuros no muestra síntomas clínicos evidentes en los animales hospedadores, pero alguna vez pueden producir infecciones graves causando prolapso rectal, invaginación intestinal, enteritis, impactación fecal y pérdida de peso. Pudiendo ser considerado como un modelo experimental de los oxiuros que parasitan al hombre [11].

Estos nematodos tienen un tamaño pequeño y poseen en la boca tres labios sin cápsula bucal, un esófago con un bulbo bien desarrollado en su extremo posterior. Su ciclo de vida es simple y directo, su hospedador son roedores que pueden ser infectados por la ingesta de los huevos embrionados [12].

Algunas características que diferencian a *A. tetraptera* de otros oxiuros es que tienen una cola cónica. Los machos pueden medir de largo entre 2 y 2.6 mm y de ancho 0.15 - 0.17 mm mientras que las hembras, como en general en todos los nematodos, son relativamente más grandes midiendo de largo de 2.6 a 4.7 mm y más gruesas que los machos, miden entre 0.19 y 0.25 mm de ancho. Los huevos de *A. tetraptera* son simétricos y en forma de huso. Las hembras tienen un útero prominente y ancho que termina abruptamente detrás del bulbo esofágico, tienen vulva que se localiza en el primer tercio anterior del cuerpo. Tanto machos como hembras carecen de espículas y los machos no presentan “gubernáculo”.

Autores como Anya 1966 [13] and Benhke 1974 [14] hicieron una revisión bibliográfica del ciclo de vida de *A. tetráptera* (figura 1.1), en la cual llegaron a conclusiones como que la hembra adulta se mueve desde el extremo proximal del colon a la parte inferior de este para poner sus huevos. Así, a diferencia de otros oxiuros que

depositan sus huevos en la piel perianal como el caso de *Enterobius vermicularis*, los huevos de *A. tetraaptera* son excretados con las heces. La puesta de huevos es intermitente o discontinua [15, 16]. Phillipson 1973 comprobó que la salida de huevos era más abundante justo antes del alba. Los huevos en el medio ambiente tardan aproximadamente 6 días hasta que maduran, la infección del hospedador es por la ingesta de huevos embrionados. Otro curioso mecanismo de infección que presentan estos gusanos es el proceso de retroflexión que fue demostrado experimentalmente por Hsu en 1951 [17]. Este mecanismo consiste en que después de la ingestión, los huevos eclosionan en el intestino delgado y ciego, generalmente en un intervalo de 2 horas. Después de la segunda muda, es decir, las larvas L2 penetran hacia las criptas de Lieberkühn y permanecen aquí 4 o 5 días. Al cabo de este tiempo, dejan las criptas y vuelven a la luz del intestino. En el séptimo día los gusanos inmaduros comienzan una migración ascendente [18] y se vuelven a encontrar en la región proximal del colon donde maduran a gusanos adultos [13]. Los machos tardan en madurar aproximadamente 20 días y las hembras unos 23.

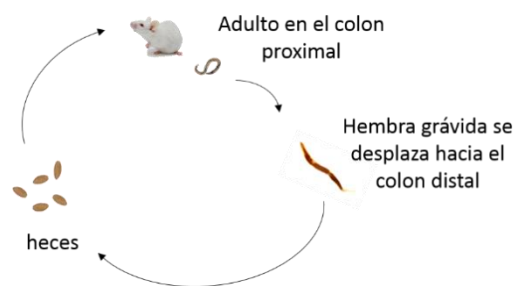


Figura 1.1. Ciclo de vida de *A. tetraaptera*.

1.2.2. *Trichuris muris*

Trichuris es un género de nematodos que parasitan a muchos tipos de mamíferos domésticos y salvajes. El nombre de *Trichuris* fue aplicado por primera vez por Roederer en 1761, posicionando por error el extremo de la cabeza del parásito como la cola, también son denominados gusanos látigo, por su morfología. Son parásitos cosmopolitas si bien es más frecuente su parasitación en las regiones cálidas tropicales y subtropicales donde a veces causan un elevado número de casos, especialmente en niños. En zonas endémicas hasta el 50 % de los animales domésticos pueden estar infectados y se estima que 500 millones de personas pueden estar infectadas por *T. trichiura*. Se han identificado alrededor de 70 especies de *Trichuris* en las que se

incluyen especies parásitas de interés médico y veterinario [19]. La parasitación por *Trichuris* en el ser humano se ha demostrado desde muy antiguo por la presencia de huevos en prácticamente todas las momias desde hace unos 14000 años, habiéndose encontrado huevos de *Trichuris* en yacimientos arqueológicos tanto de Europa como del continente americano [20].

El ciclo de vida del género *Trichuris* (figura 1.2) es monoxeno es decir, no tiene hospedadores intermediarios. El ciclo de vida fue resuelto gracias a los trabajos de Davaine en 1858 [21] y Fahmy 1954 [22], lo que permitió que a día de hoy sea posible el mantenimiento del ciclo de vida de *T. muris* en numerosos laboratorios del mundo. Ambos autores describieron cómo era posible la fecundación de huevos de *T. muris* y las condiciones óptimas para el desarrollo de la primera fase larvaria (L1).

Los huevos de *T. muris* se eliminan con la materia fecal de los múridos infectados y necesitan para embrionar lugares o suelos húmedos y poco irradiados por la luz solar. Estos huevos embrionan entre los 30 a 60 días [23] y una vez embrionados, la infección con *T. muris* ocurre por la ingestión de estos huevos que eclosionan en el intestino (ciego y colon) de los animales.

Noventa minutos después de la infección, los huevos eclosionan en el intestino del ratón y salen las primeras larvas (L1) produciendo una inflamación del mismo. Estas larvas penetran el ciego y el colon ascendente e invaden la capa epitelial donde se desarrollan realizando tres mudas, L2 (9-11 días post-infección), L3 (17 días post-infección) y L4 (22 días post-infección). Los tiempos de cada muda pueden variar ligeramente según la cepa del hospedador. En el día 32 post-infección ya se pueden observar gusanos adultos en el ciego y colon ascendente de ratones infectados. Las hembras inician la oviposición transcurridos unos 3 meses después de la infección (2000 - 20000 huevos/día) y viven un promedio entre 1 y 3 años dependiendo del hospedador y en función del tipo de respuesta inmune innata de dichas cepas de ratones.

Todos los nematodos del género *Trichuris* comparten la misma estrategia de ciclo de vida, que es la capacidad de habitar en contacto con las mucosas intestinales del hospedador mamífero. Este grupo de parásitos ha desarrollado mecanismos para invadir el epitelio intestinal y construir en el epitelio estructuras a modo de “túneles sincitiales” o sincitios. Los gusanos adultos permanecen embebidos en estas estructuras en forma de túnel que les permite mantener la posición venciendo los movimientos peristálticos del intestino gracias a los movimientos de penetración, y a su parte bucal, así como a la acción de las enzimas proteolíticas, y a proteínas de excreción/secreción formadoras de

poros que afectarían a la supervivencia del nematodo [24]. Lee en 1978 [25] examinó los “túneles sincitiales” con técnicas de microscopía de Barrido y/o Microscopía Electrónica de Transmisión, el estudio permitió conocer el grado de penetración del parásito en los “túneles”. Dicha penetración depende del estado larvario, es decir, los estados tempranos se encuentran totalmente embebidos en el epitelio intestinal del hospedador, mientras que gusanos adultos pueden tener sólo la cabeza o parte anterior dentro del “túnel”. Pero nunca se encontraron gusanos adultos libres en el lumen del intestino. Este mismo autor caracterizó los “túneles sincitiales” como una masa protoplasmática con elementos celulares comunes como núcleos, mitocondrias y lípidos, es decir un sincitio. El sincitio se encuentra delimitado por una membrana plasmática tanto en la zona apical, lateral como basal. Debajo de la membrana basal del sincitio se encuentra la lámina basal del epitelio lo que indica que los túneles sincitiales se encuentran sólo a nivel de la lámina epitelial del hospedador y no se extiende a la lámina propia del intestino.

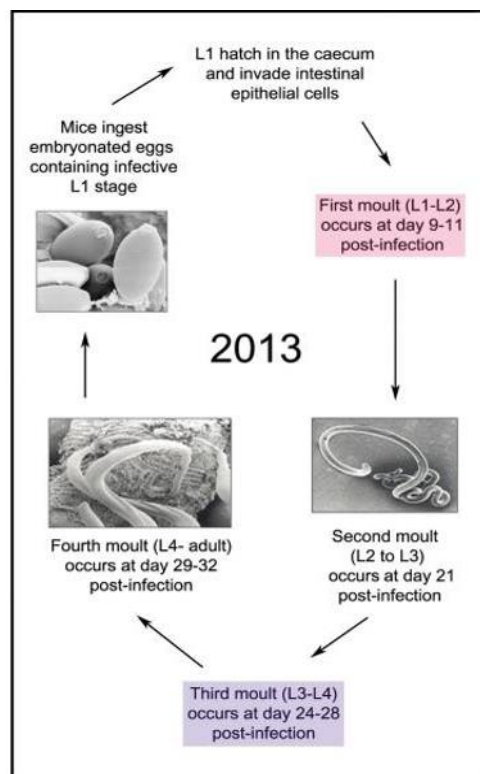


Figura 1.2. Ciclo de vida de *T. muris* [19].

Trichuris muris constituye un modelo de estudio de las enfermedades gastrointestinales y en especial para parásitos de humanos como es la infección con *Trichuris trichiura*.

El modelo experimental con *T. muris* se utiliza como modelo de parasitación gastrointestinal ya que aporta conocimiento de la respuesta inmunológica responsable de la resistencia y susceptibilidad a la infección y ayuda a la búsqueda de antígenos que se puedan usar como vacuna o a la identificación de moléculas inmunomoduladoras de la respuesta inmunológica [19]. Por ejemplo, investigaciones con *T. muris* han dado nuevas explicaciones de cómo la respuesta inmunitaria del hospedador induce la expulsión de gusanos parásitos y esto puede ayudar a buscar nuevos tratamientos para combatir las enfermedades provocadas por nematodos.

A pesar de ser *T. muris* un parásito específico de ratones no todas las cepas consanguíneas de ratones son susceptibles [26]. Tras la ingestión de los huevos embrionados del nematodo, incluso a dosis muy bajas, en todos las cepas de ratones, se desarrolla una colitis aguda, como consecuencia de la inflamación de colon, pero solo en aquellos ratones donde se desencadena una respuesta Th1, se desarrolla e instaura la parasitación por parte de los nematodos, y en aquellos hospedadores que desarrollan una respuesta Th2, por ejemplo en la cepa BALB/c, se produce la expulsión de los vermes en aproximadamente 20 días [27]. Los ratones AKR/J usados en los experimentos que se realizaron en la presente tesis doctoral, desencadenan una colitis crónica que indica el establecimiento de los nematodos en el intestino grueso de los ratones [28, 29, 30].

La resistencia a la infección por *T. muris* varía considerablemente entre distintas cepas de ratón. Algunas cepas como NIH y BALB/c, expulsan los gusanos relativamente rápido, otras un poco más lento, mientras que B10.BR y AKR/J no son capaces de expulsar los gusanos antes de que los mismos penetren en el epitelio intestinal [31], otros autores Shikhobalova en 1937 [32], Fahmy en 1954 [22] y Pike en 1965 [33] observaron que las infecciones por gusanos adultos podrían establecerse en ratones albinos [19].

Junto a la influencia genética del hospedador en la resistencia a la infección por *T. muris*, el sexo del hospedador también afecta en la expulsión de los gusanos. Estudios realizados por Bancroft et al. en el año 2000 demostraron que los ratones hembra y macho responden de forma diferente a la infección por *T. muris*. Los machos desarrollan una infección crónica mientras que las hembras son capaces de evadir la infección expulsando los parásitos adultos [34-36].

1.3. Evasión de la infección por nematodos gastrointestinales

Es bien conocido que los nematodos son capaces de modular o evadir la respuesta inmune del hospedador al que parasitan para evitar la expulsión del intestino, garantizar su supervivencia y continuación del ciclo de vida. En la actualidad ya hay numerosos grupos de investigación que relacionan el aumento de las enfermedades autoinmunes y el desarrollo de alergias en países desarrollados con la disminución de infecciones con ciertos microorganismos, y en particular helmintos. Esta relación de enfermedades autoinmunes y alergias con infección por helmintos es debida a la modulación que producen los parásitos desde una respuesta primaria inflamatoria Th1 a una respuesta Th9, esta última sujeta a investigación recientemente que desencadenaría una respuesta tipo Th2.

Existe por tanto la necesidad de entender los mecanismos de supervivencia del parásito de cara al desarrollo de estrategias para el diseño de vacunas. Para llevar a cabo la modulación de la respuesta inmune el parásito sintetiza diversas moléculas como enzimas, proteínas, polisacáridos, productos de ES (excreción-secreción), e incluso algunas pueden tener similitud con moléculas del propio hospedador que se unen a receptores capaces de desencadenar la respuesta inmunitaria a favor del parásito.

Un ejemplo de estas moléculas son glicoproteínas, en concreto se puede hablar de glicoproteínas del nematodo *Trichuris suis* que inhiben directamente la activación de monocitos humanos derivados de células dendríticas lo que provoca una baja secreción de citoquinas inflamatorias como IL-12, polarizando la respuesta inmune del hospedador hacia una respuesta propia de infección por nematodos Th2 [37]. A los lípidos sintetizados por helmintos también se les conoce actividad inmunomoduladora induciendo la diferenciación de células dendríticas a células T productoras de IL-10, llevando el sistema inmune a respuesta protectora Th2.

Los nematodos sintetizan diversas proteínas secretoras entre las que podemos nombrar a las cistatinas que tienen dos funciones, inhiben las cisteín proteasas [38, 39] y provocan la inmunosupresión de IL-10 [40] que en el hospedador ambas son necesarias para la diferenciación y presentación de las APC (células presentadoras de antígenos) lo que produce una disminución del cebado de células T por parte de células dendríticas [40]. Otras proteínas implicadas en la modulación de la respuesta inmune son las serpinas que inhiben las enzimas serin proteasas esenciales para la catálisis enzimática [41], como ejemplo podemos citar a un miembro de esta familia de proteínas como es la

SPN-2 de la microfilaria *B. malayi* que inhibe las enzimas de los neutrófilos como catepsina y elastasa [42]. Los nematodos gastrointestinales son capaces de secretar acetilcolinesterasa, esta enzima es activa en su sistema neuromuscular y su función es romper la acetilcolina inhibiendo señales neuronales en el hospedador [43].

Un mecanismo que usa el parásito para evadir la respuesta inmune es el mimetismo molecular, la evolución paralela del hospedador y los parásitos, podrían haber provocado una similitud antigénica entre las dos especies. Por lo cual, la disparidad antigénica y la inmunogenicidad se reduce, lo que permite a los parásitos causar infecciones crónicas. Proteínas glicosiladas, mencionadas anteriormente, son ejemplo de proteínas de nematodos que son secretadas y pueden unirse a receptores del hospedador como si fueran proteínas glicosiladas del mismo [44]. En la actualidad se conoce que la familia de genes de citoquinas en helmintos está altamente conservada y sus productos pueden ser ligandos de las células inmunológicas de mamíferos, un ejemplo de estas citoquinas es el TFG que puede prevenir la clásica respuesta inflamatoria cuando se une al receptor TFG del hospedador [45]. Las lectinas son proteínas de unión a carbohidratos que también están conservadas en el parásito y en el hospedador, estando involucradas en varios procesos inmunológicos como la captación y presentación de antígenos, adhesión celular, apoptosis y proliferación de células T [46].

Otro mecanismo utilizado por los nematodos para evadir el sistema inmune del hospedador es a través de enzimas antioxidantes. La producción de radicales libres por fagocitos es la principal vía inmunológica por parte del hospedador frente al ataque de parásitos. Como consecuencia, la mayoría de los parásitos expresan altos niveles de enzimas antioxidantes, como por ejemplo la superóxido dismutasa, catalasa, glutatión transferasa y tiorredoxinas peroxidadas. Esta última también es responsable de la activación de macrófagos por la vía alternativa [47].

Como descubrimiento más reciente de inmunomodulación se habla de microRNAs que se han encontrado dentro de microvesículas procedentes de las membrana celulares de los parásitos, tales como exosomas y microvesículas o ectosomas [48]. Las vesículas liberadas por estos parásitos contienen proteínas específicas de excreción/secreción que son capaces de fusionarse con las células del hospedador. Se ha sugerido que los exosomas juegan un papel importante en la comunicación hospedador-parásito [49]. De esta manera, las moléculas liberadas pueden desempeñar un papel en la regulación de los genes del hospedador, que conduce

a una amortiguación de la respuesta inmune del mismo y por lo tanto aumento de la supervivencia del parásito.

1.4. Respuesta inmunitaria del hospedador inducida por nematodos gastrointestinales

El proceso de control y eliminación de nematodos gastrointestinales por parte del hospedador es considerado muy complejo ya que en él participan en equilibrio la respuesta inmunológica a nivel celular y la respuesta inmunológica a nivel humoral [50, 51]. La efectividad de la respuesta inmunológica está afectada por muchos factores que tienen que ver con el hospedador, como edad del animal [52-54], estado fisiológico del mismo [55], características genéticas [56] y condiciones medioambientales [57, 58].

Desde el inicio, estudios de la respuesta inmunológica por parte de organismos vertebrados infestados con nematodos gastrointestinales han considerado que la capacidad para expulsar los nematodos está mediada por las células Th CD4⁺, las cuales regulan la respuesta inmune mediante la secreción de citoquinas. El descubrimiento de las células Th CD4⁺ llevó a pensar en una respuesta inmunitaria bipolarizada [59], concibieron y demostraron un concepto revolucionario de inmunología al dividir las células T cooperadoras (Th) en dos subpoblaciones según los perfiles de las citoquinas implicadas y establecer así el papel de las células Th1 y Th2. Las células Th1 producen interferón-gamma (IFN- γ), factor de necrosis tumoral β (TNF- β) e interleucina 2 (IL-2), mientras que las células Th2 secretan IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13 [60].

La función de la respuesta inmunológica celular Th2 frente a parásitos helmintos fue inicialmente conocida en estudios donde se observa una correlación inversa entre el nivel de parasitemia del hospedador y la expresión de la respuesta celular Th2 secretora de IL-4 frente al parásito *T. spiralis* [61, 62].

En la figura 1.3 se explica de forma gráfica como la IL-13 ha demostrado que desempeña una función protectora clave en muchas infecciones por helmintos [63], en particular, participa en la expulsión de los parásitos del intestino provocando contracciones peristálticas por mediación de las células Tuft [64] que expresan altos niveles de IL-25.

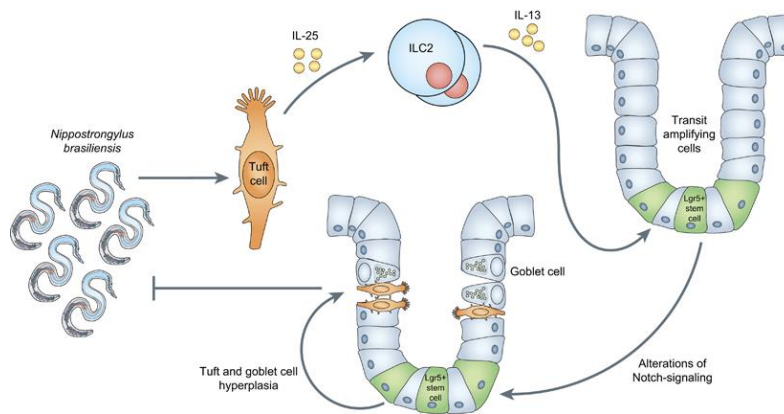


Figura 1.3. Las células Tuft expresan altos niveles de IL-25 que modulan una respuesta Th2 con la liberación de IL-13 que favorece la diferenciación de células epiteliales progenitoras de células de Goblet a células Tuft [64].

La respuesta inmunológica Th2 también protege los tejidos del hospedador del daño que los parásitos pueden causar, lo hace mediante macrófagos activados por la vía alternativa que expresan receptores IL-4R α que inician una cascada de señales alternativa al ser activados por IL-4 e IL-13, los macrófagos activados producen factores que reparan tejidos dañados por la infestación [65]. También se ha demostrado que los macrófagos son necesarios para activar la respuesta inmunológica frente a nematodos parásitos [66].

La tercera citoquina comúnmente asociada a la respuesta inmunológica tipo 2 es la IL-5, la principal función de esta citoquina es la expansión de eosinófilos desde la médula ósea, también se ha demostrado que con la sobreexpresión de IL-5 se observa una disminución de larvas en infecciones primarias con nematodos [67].

Aunque existen evidencias de que en los individuos parasitados por nematodos predomina una respuesta de tipo Th2, existen dudas sobre si dicha respuesta, medida mayoritariamente en función de los niveles de IL-4, es crucial en el control de las infecciones por nematodos [60]. Lo que parece probado es el papel que juegan algunas de las interleucinas derivadas de dicha respuesta en la intensidad de la infección y en la producción de huevos [68].

El desarrollo de tecnologías como citometría de flujo multicolor, desarrollo de la ingeniería “fate-mapping” y el estudio de citoquinas en ratones genéticamente modificados han permitido en los últimos años el descubrimiento de nuevas células T cooperadoras (Th) y así dividir el binomio Th1/Th2. Las nuevas respuestas

inmunológicas celulares han sido denominadas Th17, Th9, Th22, TFH [69] y ThGM [70] representadas a modo de resumen en la figura 1.4.

En 2005 se descubre un nuevo tipo de células Th CD4⁺ denominadas Th17 las cuales son capaces de secretar IL-17, IL-17F, IL-21 e IL-22 [71, 72]. En ratón y humano se ha descrito que la maduración de linfocitos T a células Th17 está activada por diferentes factores como factor de transformación β (TGF- β), IL-1 β , IL-6, IL-21 e IL-23 [73-78].

La función de TGF- β es evitar la diferenciación hacia la respuesta inmunológica Th1/Th2 mediante la supresión de la expresión de factores de transcripción como Stat4 y GATA3, permitiendo así una diferenciación de células Th17, aunque algunos autores han estudiado que el desarrollo de una respuesta inmunológica Th17 puede ocurrir también en ausencia de TGF- β [79, 80]. Trabajos de Ivanov et al. en 2006 demostraron que TGF- β y IL-6 promueven la síntesis de receptores IL-21 (IL21-R) y IL-23R, esta cascada de señales está regulada por el factor de transcripción ROR γ T [81]. Por otra parte, IL-18 experimenta un proceso sinérgico con IL-23 y promueve la producción de IL-17 por parte de células IL-23 CD4⁺ [82].

IL-17 es una potente citoquina proinflamatoria que provoca la inflamación por inducción de la expresión del factor de necrosis tumoral (TNF- α), IL-1 β e IL-6 en células epiteliales y endoteliales así como en otros tipos de células como fibroblastos y macrófagos. IL-17 también es conocida como IL-17A y es un miembro de la familia de citoquinas IL-17, la cual incluye IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E (también llamada IL-25) e IL17-F [83]. IL17 estimula la producción de citoquinas como CXCL1, CXCL5, IL-8, CCL2 y CCL7 que hacen posible la migración de los neutrófilos al sitio de la inflamación [84].

Experimentos más avanzados donde se induce la inflamación en el intestino de ratones por anti-CD3, demuestran que células Th17 patógenas en el intestino expresan el receptor IL10 (IL-10R) y son reguladas negativamente por las células Treg FOXP3⁻ y FOXP3⁺ dependientes de IL-10 [85]. Es necesaria la expresión de IL-10R para que las células Treg sintetizen suficiente citoquina IL-10 y así inhibir la respuesta Th17 [86].

Células T reguladoras (Treg) son clasificadas como células Th CD4⁺ que expresan el factor de transcripción FOXP3. Estas células pueden ser de dos tipos según donde se generen, si se generan en el timo son llamadas células t Treg, pero sin embargo, si se generan en la periferia se denominan células p Treg. Como se ha dicho en el párrafo anterior, este tipo de células inmunes expresan IL-10 y también TGF- β .

Ambos tienen la función de amortiguar los efectos de una excesiva respuesta inmune. Una excesiva respuesta inmune por parte del hospedador puede ser iniciada por una infección por patógenos y es mediada por las células Th17 antes descritas [87].

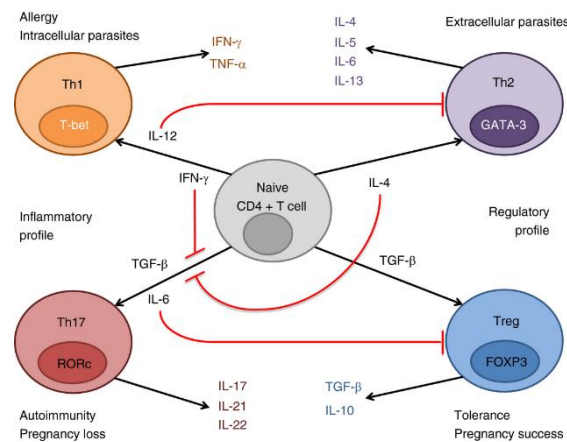


Figura 1.4. Diferenciación de las células T inmaduras a células Th1, Th2, Th17 o células reguladoras (Treg) dependiendo del patrón de citoquinas que sintetizan. IL-12 e IFN- γ estimulan las células T inmaduras a células Th1. Estas células expresan IFN- γ y TNF- α que son responsables de la eliminación de parásitos intracelulares y procesos de alergia. IL-4 estimula a las células T para diferenciarlas a células Th2. Las células Th2 expresan IL-4, IL-5, IL-6 e IL-13 y son responsables de la expulsión de parásitos extracelulares. TGF- β estimula a las células T inmaduras para generar una respuesta Treg. Las células Treg expresan TGF- β e IL-10 y son responsables de la tolerancia por parte del sistema inmunitario al estado de embarazo de una mujer. Estos 3 tipos de células expresan una citoquina responsable de su inducción, teniendo un “feedback” positivo. TGF- β e IL-6 estimulan a las células T indiferenciadas para inducir una respuesta Th17. Las células Th17 expresan IL-17, IL-21, IL-22 e IL-23 y son responsables de enfermedades autoinmunes y aborto. Th17 no presenta un mecanismo de “feedback” positivo, pero IFN- γ o IL-4 pueden inhibir la diferenciación de células T inmaduras a Th17. Además, IL-6 e IL-12 inhibe las células Treg y células Th2 respectivamente [87].

Schmitt et al. en 1994 y 1998 [88, 89] describieron primero la producción de una nueva interleucina IL-9 por parte de las células T inmaduras. Y seguidamente describieron las citoquinas responsables de la diferenciación de células T inmaduras productoras de IL-9. En un principio estas células fueron asociadas con la respuesta inmunológica Th2 ya que en experimentos iniciales parecía que IL-9 tenía efectos restrictivos durante la respuesta inmunológica, además de no haber sido estudiada con profundidad como lo estaban siendo otras citoquinas.

La diferenciación de células T productoras de IL-9 está inducida por IL-2, el factor de transcripción 5 (STAT5) e IL-4 por la vía del factor de transcripción 6 (STAT6). Aunque esta combinación de citoquinas es suficiente para la diferenciación de las células Th9, alguna otra cascada de señales ha sido identificada aumentando la producción de IL-9 por estas células. El factor nuclear kB (NF-kB) que sintetiza IL-1, IL-25 e IL-23 o una señalización a través de la vía del factor de transcripción STAT1 que induce la expresión del INF-1 y IL-1 β . Los receptores de las células T (TCR) y las moléculas co-estimuladoras de los mismos tienen un papel importante en la activación de la transcripción de IL-9 después de la interacción con las células presentadoras de antígenos (APCs). Esto ocurre principalmente por la activación del factor nuclear de células T activadas (NFAT) mediante co-estimulación de TCR y CD28 o también por la coestimulación de NF-kB por parte de 41BB y OX40 [90].

Un experimento con ratones transgénicos que sobreexpresan IL-9 vislumbra la importante función protectora que puede tener esta citoquina en las distintas respuestas inmunológicas, incluyendo la resistencia por parte del hospedador a la infección por nematodos parásitos a nivel intestinal [91-94].

La citoquina IL-9 ante la infección por un nematodo estimula el crecimiento, proliferación y la supervivencia de las células T, aumenta la producción de IgE de los linfocitos B, también promueve la proliferación y diferenciación de mastocitos y células hematopoyéticas e induce la producción de moco y el mecanismo de quimiotaxis por parte de las células del epitelio del intestino que hace que aumente la movilidad intestinal.

1.3.1. Resistencia a fármacos

El control de la infección por nematodos gastrointestinales depende principalmente del uso de fármacos antihelmínticos los cuales tienen un coste de muchos millones de euros cada año a nivel mundial y ha sido descrita una elevada resistencia por parte de la mayoría de los parásitos, incluyendo miembros de tres superfamilias Ancylostomoidea, Strongyloidea, y Trichostrongyloidea [95-97]. La resistencia a fármacos se ha convertido en un fenómeno muy común y preocupante, incluyendo la resistencia a las tres principales clases de antihelmínticos que han tenido éxito en quimioterapia como benzimidazoles, imidotiazoles y lactonas macrocíclicas [98-100]. El desarrollo de resistencia en nematodos gastrointestinales a los fármacos más usados en todas partes del mundo podría ser debido al uso de insuficientes dosis del

fármaco elegido, inapropiada ruta de administración o elección de un fármaco inefectivo para un parásito en concreto. El uso de estos fármacos provoca una acumulación de residuos químicos en la carne de los animales tratados, un impacto en el medio ambiente y un coste alto de la terapia. Como consecuencia, el control de la infección por nematodos gastrointestinales asciende a muchos millones de euros [101]. En las últimas décadas no se han introducido en el mercado nuevos fármacos, exceptuando los derivados de amino-acetonitrilos con actividad frente a todos los nematodos gastrointestinales, incluyendo los que ya han mostrado resistencia a otras drogas [102, 103].

1.5. Desarrollo de vacunas

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define vacuna como cualquier preparación destinada a generar inmunidad contra una enfermedad estimulando la producción de anticuerpos. Tratándose, por ejemplo, de una suspensión de microorganismos muertos o atenuados, o de productos o derivados de microorganismos.

Las ventajas que presentan las vacunas frente a los fármacos es que son por lo general de fácil uso, estimulan de forma natural el sistema inmune, son más seguras en términos de ecotoxicidad y carecen de residuos que sean perjudiciales y sigan la cadena trófica.

Sólo unas pocas vacunas frente a parásitos helmintos están disponibles comercialmente y casi todas corresponden a organismos vivos atenuados. Un ejemplo son las vacunas para ganado vacuno como Huskvac (Intervet) y Dictol (Schering Plough Animal Health), que han desarrollado una buena respuesta inmunológica frente a la infección de parásitos de pulmón. Consiste en una suspensión acuosa de larvas L3 de *Dictyocaulus viviparus* atenuadas con radiación gamma. Sin embargo su uso es cada vez más reducido debido a la obtención, ya que la vacuna en sí tiene una vida reducida, necesitando un continuo mantenimiento de animales donadores de larvas L3, así como el peligro y coste que supone el manejo de material biológico vivo [104, 105].

La producción de vacunas basadas en proteínas nativas y recombinantes, puede hacer la comercialización de vacunas una realidad, pero en el caso de los nematodos es muy difícil la obtención de proteínas nativas en grandes cantidades debido a la dificultad del mantenimiento de sus ciclos de vida biológicos, además de los problemas asociados a la obtención de una formulación comercialmente estable. Por estas razones,

el desarrollo y comercialización de este tipo de vacunas podría depender del uso de proteínas recombinantes [106].

Las vacunas basadas en proteínas nativas frente a nematodos gastrointestinales se han dividido en dos clases. Antígenos ocultos o encubiertos, que derivan generalmente del intestino del parásito y no están expuestos al sistema inmune del hospedador durante la infección, y antígenos naturales que son reconocidos durante la infección, estos últimos generalmente son productos de excreción-secreción o antígenos de superficie.

Se ha visto que los antígenos ocultos son altamente efectivos en nematodos que se alimentan de sangre, tales como *H. contortus*, ya que hay un contacto directo entre las células inmunológicas del hospedador y los antígenos del parásito. Por el contrario no son eficientes frente a nematodos que no se alimentan de sangre. Sin embargo los antígenos naturales deberían ser igual de eficientes en los dos tipos de nematodos descritos anteriormente, además de tener la ventaja de despertar la respuesta inmune del hospedador por infección natural del parásito.

El antígeno mejor caracterizado de *H. contortus* es una glicoproteína de membrana de 110 kDa llamada H11. La proteína nativa H11 está purificada de parásitos adultos y ha sido probada como vacuna en un largo número de razas de ovejas distintas, incluyendo corderos de temprana edad. Se ha visto que este antígeno induce un alto nivel de anticuerpos mediado por una respuesta inmunológica por parte del hospedador que se traduce en la reducción del 90 % de huevos en heces y un 75 % menos de carga parasitaria [107].

A antígenos de bajo peso molecular de 15 y 24 kDa que forman parte de los productos de excreción-secreción derivados del estadio larvario L4 y adulto de *H. contortus* se le han reconocido un papel protector en la segunda infección en ovejas al comparar el título de anticuerpos con la infección primaria [108]. Cuando estos antígenos fueron usados para inmunizar ovejas con 9, 6 y 3 meses se vio que despiertan una respuesta humoral a los 9 y 6 meses de edad pero no a los 3. En ovejas vacunadas con 9 y 6 meses se ha comprobado que se reduce un 82 y 77 % respectivamente la carga parasitaria pero no se encontró reducción a los 3 meses de edad. La protección frente al parásito fue correlacionada con altos niveles de IgG, IgA e IgE y con la presencia de mastocitos en el abomaso [109].

Otro ejemplo de búsqueda de antígenos naturales para ser utilizados como vacuna son pequeñas cantidades de péptidos (p26/23) obtenidos de la fracción soluble

de gusanos de *H. contortus* [110]. De esta misma fracción soluble, en un estudio posterior, se purificó la proteína nativa Hc23 para ser probada en un ensayo de inmunización con corderos, donde se observó una reducción de huevos en heces y disminución de parásitos adultos en el abomaso del hospedador [111].

También hay evidencias recientes de estudios de una vacunación exitosa de administración intramuscular en terneros con la fracción más abundante de antígenos nativos purificados de los productos de excreción-secreción del estadio adulto del parásito *Cooperia oncophora*, concretamente son proteínas activadoras de la respuesta inmune “activation-associated secreted proteins (ASP)” que provocan una disminución del número de gusanos del 80.6 % y una respuesta humoral caracterizada por un incremento de los niveles de IgG1 en la mucosa intestinal en el grupo de animales vacunados con respecto al grupo control [112].

Muchos intentos sin éxito, en gran parte no publicados, se han hecho en varios laboratorios para producir antígenos recombinantes que sirvan de protección frente a infecciones por nematodos. Se piensa que este fracaso en los experimentos de vacunas recombinantes puede ser debido a las ausencias o diferencias en la glicosilación y conformación de la proteína recombinante en relación a la proteína nativa [113]. A pesar de esto, existen trabajos con resultados favorables para la utilización de antígenos recombinantes como vacunas, que demuestran que puede ser una solución a la resistencia de fármacos.

Un ejemplo de ello es la exitosa inmunización de ovejas frente al parásito *T. circumcincta*. En este trabajo se utilizó como vacuna una dosis compuesta por 8 moléculas recombinantes que fue administrada a los animales en tres inmunizaciones separadas en el tiempo. Para la selección de las moléculas se emplearon técnicas de inmunoproteómica para la búsqueda de homología con moléculas recombinantes de otros nematodos probadas en ensayos de vacunación que presenten una fuerte actividad inmunomoduladora. El experimento se llevó a cabo en dos ensayos, con distintos tiempos de inmunización e infección. En ambos ensayos se detectó una disminución del número de huevos en heces en animales vacunados en relación a animales control. La reducción media en el número de huevos fue significativamente más alta en el primer ensayo (70 %) que en el segundo (58 %). Se contaron huevos en heces en el momento en el cual el parásito adulto excreta más huevos, en este pico se observó que había una reducción del 92 % en el primer ensayo y del 73 % en el segundo. También se contabilizaron el número de gusanos adultos al final del experimento, la autopsia mostró

una reducción del 75 % en el primer ensayo y del 56 % en el segundo ensayo. Los resultados de ambos ensayos fueron comparables, aunque con diferencias en el tiempo. Esta diferencia en el tiempo de la resistencia del parásito puede ser debida a la edad de los corderos, ya que en el segundo ensayo eran 30 días más jóvenes que en el primer ensayo, como consecuencia los animales han podido ser menos capaces de controlar la infección [114]. El éxito de esta vacuna también se apoya en que no es esencial una efectividad del 100 % frente a nematodos parásitos de rumiantes. De hecho, beneficios sustanciales se podrían alcanzar cuando el resultado es del 60 % en el 80 % del ganado en los dos primeros meses de la infección que es cuando el parásito excreta mayor cantidad de huevos y así se evita la reinfección y permite el desarrollo de la inmunidad natural sin pérdidas de producción [115].

En párrafos anteriores hablamos del antígeno natural “activation-associated secreted proteins (ASP)” de *C. oncophora* que ha tenido en su forma nativa resultados de protección muy favorables y en diferentes especies de nematodos. Trabajos con *O. ostertagi* en vacas se han realizado para poder desarrollar una vacuna comercial. Para ello era necesario la producción de un antígeno recombinante. La inmunización con la proteína recombinante Oo-ASP1 no dio lugar a ninguna protección en el ensayo de infección en vacas ya que no hubo una reducción en la producción de huevos en heces o en la carga parasitaria. Por otra parte, es importante tener en cuenta que la fracción de ASP nativa consistió en dos ASPs, es decir, Oo-ASP1 y Oo-ASP2. Aunque Oo-ASP1 es mucho más abundante en la fracción protectora y comparte similitud con Oo-ASP2, puede ser que Oo-ASP2 o una mezcla de ambas moléculas sea necesaria para la protección [116].

Un antígeno inmunogénico de bajo peso molecular expresado por especies de *Ascaris* que parasitan a humanos y cerdos ha sido clonado del genoma de *Ascaris suum* para obtener la proteína recombinante As16 (rAs16) [117] y proponerla como vacuna para la ascariasis humana y de cerdo. La estrategia que siguió el experimento fue la inmunización por vía intranasal y como adyuvante, la toxina colérica (TC). Los cerdos vacunados con rAs16-CT fueron protegidos de la migración de las larvas de *A. suum* a través de los pulmones debido a una reducción del 58 % de la fase larvaria L3 en relación a los controles no vacunados. La fase larvaria L3 es inhibida por inmunoglobulinas de cerdos vacunados con rAs16-CT y experimentos de inmunofluorescencia localizan la proteína As16 en el tracto digestivo de la fase larvaria L3, tanto en el esófago, intestino como hipodermis sugiriendo que quizás la respuesta

inmune por parte del hospedador inhibe las funciones de los tejidos del intestino de *Ascaris* spp. [118].

Strube et al. en 2015 [119] obtuvieron resultados prometedores al evaluar el potencial del antígeno recombinante paramyosin (rPMY) del parásito *D. viviparus*, nematodo pulmonar de bovinos, como posible vacuna frente a la infección por nematodos, comparándolo con la ya vacuna comercial Bovilis[®]Dictol. La proteína muscular paramyosin (PMY) forma parte de la pared del cuerpo y musculatura de la faringe de helmintos. Su peso molecular es aproximadamente de 100 kDa y parece que su función es la de unir colágeno e interactuar con parte del sistema del complemento. El experimento se hizo en dos ensayos donde se utilizaron vacas de 6 a 7 meses de edad, se inmunizaron por vía intramuscular en el cuello en los días 0, 21 y 42, y como adyuvante se utilizó la saponina Quil A. El reto se hizo en los días 62, 63 y 64 desde el inicio del experimento con 1100 larvas de fase L3 de *D. viviparus* por día y vía oral, en el primer ensayo y con 1000 larvas L3 por día y vía oral, en el segundo ensayo. Todos los animales vacunados con rPMY desarrollaron anticuerpos en respuesta a la vacuna. Las inmunoglobulinas que experimentaron picos más altos a lo largo de todo el ensayo fueron la familia de las IgG, incluyendo IgG1 e IgA. Estas inmunoglobulinas al ser secretadas por la mucosa pueden ser las responsables de la expulsión de los parásitos. El antígeno rPMY propuesto como futura vacuna protegió parcialmente al ganado contra la infección por *D. viviparus* aunque la vacuna comercial Bovilis[®]Dictol indujo una mayor reducción de la carga parasitaria y expulsión de larvas. Este antígeno fue un buen candidato para estudios de mejora de la vacuna. Mejoras como, nuevos adyuvantes, sistema de expresión en eucariotas, o incluso combinación con otras proteínas inmunogénicas del parásito.

Otra alternativa a las vacunas de organismos vivos atenuados frente a helmintos son las vacunas de DNA, aunque hasta el momento el nivel de protección logrado es bajo. Como ejemplos, Espino et al. en 2005 [120] desarrollaron una vacuna de DNA frente a *Fasciola hepatica*, empleando la secuencia del gen FhSAP-2 y Zhu et al. en 2006 [121] emplearon la secuencia del gen Sj23 frente a *Schistosoma japonicum*.

Para la protección frente a *T. spiralis* hay varios trabajos de éxito donde se han utilizado antígenos que se administran en forma de vacuna de DNA utilizando siempre una cepa de *Salmonella typhimurium* atenuada, ya sea por vía oral o intranasal. Un péptido de 30 residuos derivado de una glicoproteína de 43 kDa (gp43) que se encuentra en productos de excreción-secreción del parásito *T. spiralis* ha sido ensayado como

vacuna de DNA utilizando como vector la bacteria atenuada *S. typhimurium* que se ha comprobado que administrada por vía oral o intranasal despierta una respuesta inmune a nivel de mucosa y protege al hospedador de la fase intestinal de *T. spiralis*. Los ratones inmunizados por vía intranasal presentaron una respuesta inmune protectora tras ser retados con el parásito. Mostraron una reducción del 61.83 % en el número de gusanos adultos después de 8 días de ser infectados. La respuesta inmune se caracterizó por una respuesta humoral protagonizada por la secreción de IgG1 y una respuesta celular con secreción de IL-5, demostrando que la bacteria atenuada *S. typhimurium* es un buen transportador de péptidos inmunogénicos para proteger con respecto a la fase intestinal de *T. spiralis* [122].

Los autores Liu et al. en 2015 [123] han encontrado recientemente un buen antígeno que administran en forma de vacuna de DNA por vía oral dando unos resultados muy aceptables de protección en ratones de la cepa BALB/c. La proteína Nudix hidrolasa de *T. spiralis* (TsNd) se encuentra unida a las células del epitelio intestinal del parásito. Para la construcción de la vacuna de DNA, la secuencia completa de cDNA del gen TsNd se clonó en un plásmido de expresión en eucariotas que fue transformado en una cepa de *S. typhimurium* atenuada (TsNd/*S. typhimurium*) para posteriormente inmunizar a ratones por vía oral. La inmunización con (TsNd/*S. typhimurium*) levanta una alta respuesta a nivel de la mucosa con la secreción de IgA y una sistémica respuesta inmune Th1/Th2. Este ensayo de vacunación tras el reto con el parásito, presentó una reducción del 73.32 % en gusanos adultos y una disminución del 49.5 % en larvas del músculo esquelético con respecto al grupo control.

Por consiguiente, la meta de cualquier vacunación es inducir una respuesta inmune potente capaz de proteger el mayor tiempo posible al organismo frente a una infección. Al contrario de lo que ocurre con el uso de vacunas vivas atenuadas o el uso de organismos muertos, los antígenos nativos purificados y los recombinantes requieren la utilización de potenciadores de la inmunidad, denominados adyuvantes.

1.5.1. Adyuvantes

Los adyuvantes son compuestos que incrementan la respuesta inmune frente al antígeno inoculado. Los adyuvantes comenzaron a desarrollarse a partir de la segunda década del siglo XX, cuando observaron que los caballos que desarrollaban abscesos en el sitio de inyección del toxoide diftérico generaban mayores títulos de anticuerpos específicos que aquellos que no los tenían [124]. Posteriormente, se descubrió que los

abscesos generados por la infección de sustancias extrañas junto con el toxoide, aumentaban la respuesta antitoxina en caballos. En 1926, [125] descubrieron los efectos potenciadores que tiene la asociación de sales de aluminio a las vacunas, y las denominaron genéricamente como adyuvantes de alumbre. Con Freund en 1937 [126] se desarrolló uno de los más potentes adyuvantes conocidos y que lleva su nombre. Se compone de una mezcla de agua y aceites junto con micobacterias. Más tarde fue modificado por Stuart-Harris en 1969 [127] eliminaron las micobacterias para disminuir su gran toxicidad. Es el llamado adyuvante incompleto de Freund. En 1947, Greenberg y Fleming demostraron que el toxoide diftérico aumentaba la antigenicidad de la vacuna frente a la tos ferina mediante bacterias completas. Jonhson et al. en 1956 descubrieron el efecto adyuvante de los lipopolisacáridos (LPS) de las bacterias gram negativas, lo que abrió la puerta a diferentes técnicas para detoxificar LPS y poder añadirlo a las vacunas [128].

Más recientemente, han sido identificados y caracterizados otros derivados de origen bacteriano y se ha comprobado su función inmunomoduladora e inmunopotenciadora como parte del DNA [129]. Se conoce que cientos de compuestos naturales y sintéticos poseen actividad adyuvante. Varios de ellos han demostrado ser más efectivos que los adyuvantes de alumbre y potencian respuestas inmunes mediadas por anticuerpos, así como respuestas celulares intensas [130].

La selección de un adyuvante viene determinada en primer lugar por el tipo de antígeno, la especie que se desea vacunar, la ruta de administración y la posibilidad de que se produzcan algunos efectos adversos como consecuencia de la vacunación. Las reacciones adversas asociadas a los adyuvantes se clasifican en locales y sistémicas. Las reacciones adversas locales incluyen dolor, inflamación local, necrosis en el sitio de la inyección o en zonas adyacentes, linfadenopatías regionales y, en raras ocasiones, la inducción de granulomas y la formación de abscesos estériles. Las reacciones sistémicas observadas incluyen náuseas, fiebre, artritis por adyuvante y uveítis, anafilaxis, toxicidad específica de órgano e inmunotoxicidad, liberación de citoquinas, inmunosupresión y enfermedades autoinmunes [131, 132].

Los adyuvantes ideales deben reunir una serie de condiciones tales como la estabilidad, la biodegradabilidad, deben ser inertes inmunológicamente y capaces de promover una alta respuesta inmune ya sea celular o humoral dependiendo del tipo de respuesta que se desee [133]. La eficacia de la inmunización y de los adyuvantes depende del tipo de ruta de administración de la vacuna. No se obtiene la misma

respuesta con una inmunización a través de mucosas que una administración parenteral, así dependiendo de ésta, el uso de nuevos vectores y sistemas de liberación de los antígenos o adyuvantes dependerá de la ruta elegida. En general las rutas intradérmicas son más efectivas que las intramusculares [134].

Los adyuvantes los podemos clasificar en función de su modo de acción, de su naturaleza química o de su origen [135], así tendremos:

1.5.1.1. Adyuvantes inorgánicos

Sales de aluminio o alumbre: son partículas con un tamaño entre 100 y 1000 nm compuestas por sales de aluminio insolubles derivadas de hidróxido de sodio o fosfato de aluminio. Este tipo de adyuvantes han sido ampliamente utilizados en vacunas humanas y de animales, ya que son los únicos adyuvantes de aprobación general para su uso clínico, por lo que fueron usados inicialmente en vacunas contra tétanos, difteria, tos ferina y poliomielitis; en vacunas veterinarias, estos adyuvantes han sido utilizados ampliamente contra agentes virales y bacterianos, así como en vacunas antiparasitarias. Desafortunadamente son adyuvantes relativamente pobres en muchas situaciones, particularmente en la inducción de la inmunidad celular ya que las sales o los hidróxidos de aluminio en general son buenos adyuvantes cuando se pretende potenciar la inmunidad humoral pero son malos inductores de la inmunidad celular [134, 136-138].

Normalmente el aluminio es excretado por los riñones, aunque bajo ciertas condiciones tales como una reducción de las funciones renales, el aluminio se acumula en el cuerpo y puede ser tóxico. Altos niveles de aluminio afectan al cerebro, por lo que se ha relacionado con enfermedades neurodegenerativas, esclerosis amiotrófica lateral, Alzheimer, entre otras, así como también la inducción de una respuesta IgE y alergias [139-141]. Igualmente, los granulomas son comunes cuando el aluminio se suministra por vía subcutánea o intradérmica, pero no por vía intramuscular [142].

El mecanismo por el cual las sales de aluminio actúan se desconoce, pero pudiera deberse a la formación de un depósito del antígeno absorbido de la sal en el lugar de la inoculación. Otros posibles mecanismos de acción pueden involucrar la activación del complemento o de los macrófagos y eosinófilos [143]. El fosfato de calcio ha sido empleado durante décadas para las vacunas del grupo de difteria-tétanos-pertusis [142, 144]. Aunque el fosfato de calcio tiene propiedades similares a las de los compuestos de aluminio, esta sal presenta varias ventajas: (i) es un constituyente normal

del cuerpo y, como tal, es bien tolerado; (ii) adsorbe eficientemente a los antígenos y permite su liberación lenta; (iii) genera niveles elevados de anticuerpos IgG; y no incrementa la producción de IgE. En varias pruebas se ha encontrado que el uso de vacunas adyuvantadas con calcio es eficiente y seguro contra reacciones adversas a largo plazo. Sin embargo, se han observado reacciones neurológicas esporádicas en el caso de vacunas de pertusis absorbidas a fosfato de calcio [144].

Otros compuestos inorgánicos se han probado buscando alternativas a las sales de aluminio. El óxido de zinc es un compuesto no tóxico utilizado comúnmente como suplemento dietético, por esto podría ser un candidato ideal como adyuvante biocompatible. El efecto adyuvante del óxido de zinc se ha evaluado en ratones y se demostró que actúa sobre el sistema inmune estimulando la respuesta Th2. Otros estudios sugieren que el óxido de zinc es un adyuvante más seguro que el hidróxido de aluminio porque estimula la respuesta inmune con mayor potencia, posee baja toxicidad e induce una débil respuesta alérgica.

Nanopartículas de óxido de cobalto también han atraído la atención en la búsqueda de adyuvantes. En estudios con ratones encontraron que el óxido de cobalto estimula una mayor respuesta Th2 que la que puede inducir el óxido de zinc o el aluminio. Además, la producción de IgE e IgG1 fueron menos pronunciadas, por tanto indica que hay menos riesgo de respuestas alérgicas al antígeno cuando se utiliza con el adyuvante [145].

Emulsiones: las emulsiones más utilizadas como adyuvantes incluyen soluciones acuosas del antígeno en aceites minerales o vegetales, es el caso del adyuvante incompleto de Freund, Montanide, Lipovant o el ADAD [146-148]. En general los adyuvantes basados en emulsiones poseen un mecanismo de acción basado en la liberación lenta del antígeno y la estimulación de las células B para producir anticuerpos. Poseen efectos adversos, a veces graves, en especial el coadyuvante de Freund.

Dichas reacciones adversas incluyen reacciones inflamatorias, granulomas y úlceras en el lugar de la inoculación. A fin de evitar estas reacciones se han buscado formulaciones que disminuyan la toxicidad, basadas en emulsiones de agua y aceite no mineral (Montanide), o aceite y agua que incorporen otras sustancias inmunopotenciadoras como saponinas o extractos de plantas inmunomoduladores. Con ésta filosofía se desarrolló el ADAD que incorpora extracto de *Quillaja saponaria* y extracto acuoso de *Polypodium leucotomos* [147], en todo caso estos adyuvantes en su

mayoría son experimentales y de uso en vacunación animal. Adyuvantes como Montanide han mostrado ser potentes en numerosas vacunas experimentales en ratones, ratas, gatos, perros y cerdos, tanto con péptidos sintéticos como con antígenos virales, y también han sido usados en estadios preliminares de vacunas contra VIH, malaria y cáncer de mama [149].

Compuestos tensoactivos: los compuestos tensoactivos derivan de saponinas, un grupo heterogéneo de esteroides y triterpenos glicosidos de origen vegetal [150-152]. Estos compuestos tienen una serie de propiedades químico-físicas entre las que se incluye la saponificación y en especial la propiedad de estimular el sistema inmune. Una de las más empleadas es la saponina procedente del árbol de origen chileno *Quillaja saponaria* [153] cuyos extractos acuosos son tóxicos y con características hemolíticas [154], pero la fracción obtenida por cromatografía de fase reversa QS-21 denominada Quil A constituye el mejor candidato como inmunopotenciador [155]. En el 2004 una nueva saponina fue aislada del árbol *Quillaja brasiliensis* [152] demostrando ser un potente adyuvante desencadenando una respuesta específica celular y así siendo una posible opción a la saponina Quil A [156].

Entre las propiedades ligadas a las saponinas, se incluyen, un excelente efecto adyuvante para antígenos tanto T-dependientes como T-independientes, y la estimulación de isotipos asociados a respuestas de células Th1. Esta clase de adyuvantes inducen, además, respuestas de linfocitos T citotóxicos CD8⁺, propiedad asociada usualmente con vectores virales. Las saponinas también potencian vacunas administradas por las vías mucosales [152]. Actualmente los tensoactivos forman parte de sistemas de adyuvantes más complejos como el propio sistema ADAD antes mencionado o formando parte de los denominados Complejos Inmunoestimulantes (ISCOM), en ellos la saponina mantiene su actividad como adyuvante, se elimina su actividad hemolítica y disminuye su toxicidad [157]. El uso en humanos de Quil A ha sido aceptado cuando se emplea en bajas dosis [158], en los últimos años se ha comenzado a utilizar en vacunas contra el cáncer [159].

1.5.1.2. Adyuvantes derivados de microorganismos

Dada su alta capacidad inmunomoduladora, una serie de sustancias derivadas de bacterias y hongos constituyen una buena fuente de adyuvantes. Incluso han sido usados como adyuvantes “fantasmas” de bacterias, empleándose en vacunación oral o de inducción de inmunidad en mucosas [160-162].

Los lipopolisacáridos (LPS) de la pared bacteriana o el peptidoglicano son capaces de disparar una respuesta inmune, a pesar de que ellos no son por si mismos muy inmunogénicos. Esta actividad inmunomoduladora se realiza mediante la activación de los receptores TLRs [163]. Se han usado diferentes especies de bacterias como adyuvantes, incluyendo *Mycobacterium spp*, *Corynebacterium parvum*, *C. granulosum*, *Neisseria meningitidis* o *Bordetella pertussis*. Lamentablemente, estos microorganismos y sus componentes son tóxicos, por lo que no pueden emplearse en vacunas humanas.

Se ha identificado que el componente de la pared bacteriana más activo como adyuvante es el N-acetyl-muramyl-L-alanyl-D-isoglutamina también denominado como MDP. En la célula MDP es detectado por el receptor citoplasmático NOD2 que forma parte de la respuesta inmunológica innata de humanos. Modificaciones estructurales de MDP y sus derivados han sido ampliamente estudiados en un intento de aumentar la actividad adyuvante y reforzar la respuesta inmune efectiva para uso clínico en el tratamiento del cáncer y otras enfermedades [164]. Recientemente se han sintetizado conjugados antígeno-MDP y se ha demostrado que constituyen una vacuna capaz de estimular al receptor NOD2, así como la maduración de las células dendríticas y la presentación de antígenos al sistema mayor de histocompatibilidad (SMH) [165].

Los LPS son derivados de la pared celular de bacterias Gram negativas y su mayor componente estructural es el lípido A. En condiciones de pH ácido se hidroliza a monofosforyl-lípido A que reduce la toxicidad y mantiene la capacidad adyuvante [166]. Existen otros compuestos derivados de la pared celular como la trealosa dimicolate, que es un adyuvante capaz de inducir una respuesta tanto celular como humoral [167].

Otros componentes bacterianos con propiedades de adyuvantes son flagelina, HSP60, CpG, DNA, dsRNA que actúan también como inmunoestimuladores por unión a los diferentes TLRs [163].

Las toxinas bacterianas también han sido utilizadas como adyuvantes entre las que se encuentran la subunidad β de la toxina colérica (TC) obtenida a partir de *Vibrio cholerae*, o la enterotoxina termolábil de *Escherichia coli* [168, 169].

TC es una enterotoxina secretada por la bacteria *Vibrio cholerae* que es responsable de la diarrea asociada con el cólera. Esta enterotoxina es un potente adyuvante a través de mucosa para la estimulación de respuesta inmunológica para un antígeno específico. Esta toxina termolábil está compuesta por una subunidad A

formada por el dímero A₁ y A₂ y 5 subunidades B. Todas estas subunidades están codificadas por el operón ctxAB. Las subunidades B tienen una alta afinidad por los receptores gangliósidos GM₁ de las células epiteliales, pero por sí solos no causan una alteración en la permeabilidad de la membrana celular.

La acción tóxica es debida a la cadena polipeptídica A₁, que penetra dentro de la célula y activa la enzima adenilato ciclasa, causando la conversión de adenosina trifosfato (ATP) a adenosina monofostato cíclico (AMPc) [170, 171]. Este aumento de los niveles de AMPc produce la pérdida de iones y agua a la luz intestinal. Aunque la toxicidad de la TC impide su aplicación en la clínica, la comprensión de los mecanismos que subyacen a su potente actividad adyuvante puede conducir al desarrollo de adyuvantes no tóxicos y eficaces para la vacunación a través de mucosa, por lo que se usa a nivel experimental la TC sub unidad β capaz de inducir una respuesta Th17 inflamatoria.

Numerosos estudios han revelado que los fagocitos mononucleares, incluyendo las células dendríticas (DC), son los objetivos fundamentales de la actividad adyuvante de TC [172, 173]. TC se considera un potente adyuvante de la respuesta inmunológica Th2 ya que estimula las citoquinas asociadas a esta respuesta y una gran expresión de IgG1 [174, 175]. Otros estudios han demostrado sin embargo que el AMPc y Gsα pueden regular de forma positiva la respuesta Th1 y Th17. Además la TC puede actuar por la vía de Gsα sin células CD11b⁺ para promover la respuesta Th1, Th2 y Th17, pero en presencia siempre de IL-12 e IL-17 para que la TC pueda actuar como adyuvante [176]. En conjunto todos estos estudios indican que la TC actúa como adyuvante a través de fagocitos mononucleares, sin embargo no se conocen los mecanismos celulares y moleculares por los que TC promueve la respuesta inmunológica frente a antígenos específicos. La habilidad de TC de aumentar la retención de antígenos a través de la mucosa y activar a las células presentadoras de antígenos por la unión a los receptores gangliósidos GM₁ junto con la estimulación de la producción de TGF-β e IL-10 e inhibición de IL-6 quizás sea la explicación a la fuerte efectividad de la utilización de TC como adyuvante [177]. Así la TC está involucrada en la inducción de la inmunidad innata por la estimulación de las citoquinas proinflamatorias como la IL-1β, la IL-15 y la IL-18, algunas de las cuales provocan a su vez una cascada de señales que favorecen la estimulación de la respuesta a través de las mucosas y una fuerte respuesta inmune adaptativa [178].

1.5.1.3. Sistemas particulados de liberación de antígenos

La naturaleza de las partículas, aún a pesar del efecto de acumulación en el lugar de la inoculación, determina el tipo de respuesta inmune que va a desarrollarse y el tipo de citoquina que las células T segregarán. Los sistemas más usados son los liposomas, microesferas de polímeros, nanopartículas, complejos inmuno-estimulantes (ISCOM) y partículas parecidas a virus.

Liposomas: los liposomas son esferas sintéticas formadas por capas lipídicas que encapsulan el antígeno, lo que hace que actúen tanto como sistema de liberación antigénico, como de adyuvante. La eficacia de los liposomas depende del número de capas [179], carga eléctrica [180], composición y métodos de preparación [181, 182]. El uso de los liposomas como método de inmunización se basa en el fenómeno denominado “co-delivery”, que potencia, tanto la inmunidad humoral, como la celular, para antígenos de naturaleza proteica y polisacárida [183, 184]. El antígeno se presenta simultáneamente a las células CD8⁺ responsables de la memoria inmunológica, pero estudios recientes han descubierto que no es necesaria la presencia de CD4⁺ vía MHC clase I y MHC clase II, de forma similar a lo que ocurre con los virus [185, 186]. El tiempo de vida media de los antígenos incorporados en liposomas en la sangre es muy prolongado, lo que asegura una mayor exposición de antígeno a las APC. De todas formas, la estabilidad, modo de prepararlos y calidad de los componentes que lo forman son un problema al usar liposomas como adyuvantes en humanos.

Microesferas de polímeros: las microesferas de polímeros son micropartículas de un tamaño comprendido entre nanómetros y micrómetros donde los antígenos pueden ser atrapados. Estos sistemas constituyen actualmente un sistema adyuvante de liberación directa de antígenos sobre las células dendríticas inmaduras [187]. Se han usado numerosos polímeros para preparar dichas nanoesferas, como hialuronato [188], alginato [189], fibrina [190], agarosa o poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) [191]. La mayoría de estos compuestos son biocompatibles y biodegradables [192]. Las partículas pueden cargarse positiva o negativamente para lograr la captación de diferentes antígenos como azúcares, proteínas o incluso ácidos nucleicos [193] y pueden ser usadas tanto en rutas sistémicas como mucosales. Las micropartículas inducen predominantemente el isotipo IgG2a indicando que inducen una respuesta de tipo Th1 [194]. En estudios recientes, las micropartículas han mostrado eficacia en vacunas de DNA [195]. Una característica particularmente atractiva es su habilidad de controlar la

liberación de antígenos atrapados, lo que puede permitir el desarrollo de vacunas de una sola dosis [196].

Nanopartículas: las nanopartículas son esferas sólidas de un diámetro comprendido entre 1 μm y 0.5 nm donde el antígeno se encuentra absorbido en la superficie de las mismas. Las nanopartículas constituyen una estrategia de activación y liberación de antígenos en las células APC generando una respuesta humoral como de las células CD8^+ y CD4^+ [197]. Se demostró el potencial de las nanopartículas por la habilidad de conjugar antígenos con las partículas en tumores. Las nanopartículas, al contrario que el aluminio, inducen una respuesta substancialmente mediada por células con una moderada respuesta humoral, se usan como adyuvantes de vacunas frente a patógenos intracelulares.

ISCOM e ISCOM-matrix: los ISCOM son micropartículas coloidales de aproximadamente 30 - 40 nm formados por saponina (Quil A), fosfolípidos, colesterol y el antígeno [150]. En ocasiones en lugar de fosfolípidos como la fosfatidil colina y al objeto de hacer ISCOM catiónicos se ha usado el dioleoil-trimetil-amonio propano [198]. La unión de estos compuestos entre sí se realiza mediante fuerzas hidrofóbicas, formándose una especie de caja con aberturas en forma de anillos de unos 12 nm de diámetro constituidas por la unión de un tensoactivo y con el colesterol. Estos anillos se unen hidrofóbicamente con los fosfolípidos para dar lugar a la esfera. La presentación de los antígenos ocurre por la facilitación de la entrada de dicho antígeno al citoplasma celular de las células dendríticas como APC y como resultado ocurre una activación de las CD4^+ , mientras que la presentación antigénica de las CD8^+ ocurre directamente [199]. Los antígenos anfipáticos e hidrofóbicos se unen a estos complejos y pueden ser atrapados en ellos, o inocularse junto a los ISCOM vacíos o ISCOM-matriz [200]. El mecanismo molecular exacto se desconoce, pero parece que la liberación del antígeno se hace directamente en el citosol tanto de las APC, como dendríticas mediante la fusión del ISCOM con la membrana celular o en las membranas del fagosoma, induciendo una activación de las CD4^+ , mientras que la presentación antigénica de las CD8^+ ocurre directamente. La cantidad de antígeno necesaria para lograr una activación empleando ISCOM es sensiblemente menor en comparación a otros adyuvantes como los LPS o el Coadyuvante Completo de Freund (5 μg para los ISCOM y de 100 a 2 000 μg para los otros dos adyuvantes) [199]. Los ISCOM-matrix, poseen la misma composición que los ISCOM pero sin la captación previa del antígeno, en este caso la respuesta inmunológica es mayoritariamente del tipo Th2 mientras que con el antígeno atrapado

en los ISCOM es una respuesta mixta Th1/Th2. El uso de Quil A en humanos ha sido aceptado cuando se emplea en bajas dosis como es este el caso. La saponina en ISCOM retiene la actividad adyuvante y reduce su toxicidad [157].

Partículas parecidas a virus: las partículas parecidas a virus son cápsides inertes que no contienen el ácido nucleico de la partícula viral, pero conservan su estructura y han sido manipuladas para contener en ellas el antígeno con el que se quiere inmunizar. Las partículas cargadas con el antígeno son capaces de ser captadas por las células dendríticas y dar una respuesta inmune cuando se inoculan por vía intramuscular o por aplicación a través de mucosas [201, 202]. Repeticiones de los epítomos en las partículas parecidas a virus, similares a las que se encuentran en las cápsides virales, se unen mediante entrecruzamiento a receptores de células B, e inducen en ellas una fuerte respuesta de IgG2a, lo que muestra un mecanismo eficiente de activación de la respuesta Th1 específica [203]. Uno de los ejemplos más relevantes es el uso de las partículas con antígenos recombinantes de la hepatitis B, en las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris*, que se ha usado como una vacuna preventiva muy eficaz contra la hepatitis B.

1.5.1.4. Otros tipos de adyuvantes

Desde hace relativamente poco tiempo, se han identificado una nueva clase de adyuvantes, entre los que destacan lipopéptidos, citoquinas, polisacáridos, polifosfazenos o ácidos nucleicos.

Lipopéptidos: el uso de lipopéptidos utilizados como vacuna fueron desarrollados hace más de una década y empleados como forma de inmunización dando una respuesta inmune elevada comparada a cuando se hizo sin el uso de adyuvantes. Una construcción lipopeptídica consiste en un resto lipídico con capacidad de actuar como adyuvante y que puede acoplarse covalentemente a un péptido, ya sea de naturaleza sintética o recombinante [204]. Los primeros trabajos relativos al uso de lipopéptidos fueron los de Hopp en 1984 [205] encontró un incremento de la respuesta frente a péptidos sintéticos del virus de la hepatitis cuando lo unieron a diplamitoil-lysina constituyendo así la estrategia de unir covalentemente los péptidos sintéticos a cadenas lipófilas. Schild et al. en 1991 [206] encontraron que un lipopéptido formado con péptidos del virus de la influenza, para la protección frente al virus de la gripe sin un adyuvante adicional desencadenaba una respuesta CTL (linfocitos T citotóxicos) en las células CD8⁺ mientras que el péptido sin el lípido no lo hacía. Este hecho

incrementó enormemente el potencial como vacuna del uso de los lípidos unidos a péptidos. De forma similar nuevas estrategias de inmunización se desarrollaron uniendo lípidos a sistemas MAP (pequeña matriz nuclear inmunológicamente inerte de residuos de lisina con grupos alfa y epsilon-amino para anclar múltiples copias del mismo o de diferentes péptidos sintéticos con monómeros multiméricos) [207] o conjugados de lípidos con cadenas peptídicas más o menos complejas [208]. Otra estrategia podía ser la de utilizar como parte lipídica del lipopéptido una cadena relativamente compleja como el usado en el trabajo de Loleit et al. en 1996 [209] donde utilizaron una cadena de tripalmitoil-S-gliceril cisteinil-seril-serina (P₃CSS), los péptidos conjugados con P₃CSS inducen una respuesta CTL similar a cuando se usan vectores vivos mostrando algunos de ellos alteraciones y toxicidades.

Los mecanismos celulares por los cuales los lipopéptidos pueden provocar una fuerte respuesta inmunitaria se entiende sólo en parte ya que el mecanismo puede ser complejo y resultante de la interacción del lipopéptido con los diferentes tipos celulares en especial las APC del punto de aplicación [210, 211]. Otras características esenciales de los lipopéptidos para ser utilizados como vacunas son: optimización del diseño, facilidad de purificación y formulación del lípido; aumento del tamaño del péptido; las propiedades adyuvantes del resto lipídico están muy influenciadas por el número de carbonos dentro del ácido graso; la capacidad de los lipopéptidos para formar micelas, agregaciones o partículas, lo que puede resultar que protejan a los epítomos de la degradación por las enzimas séricas, mejorando así la inmunogenicidad del lipopéptido. Asimismo, las micelas o partículas formadas pueden ser absorbidas eficientemente por las APC, que puede además contribuir a la inmunogenicidad del lipopéptido.

Citoquinas: actualmente algunas citoquinas pueden considerarse como adyuvantes. Entre las citoquinas que han sido más evaluadas como adyuvantes se incluye IL-1, IL-2, IFN- γ , IL-12 y GM-CSF [212]. La GM-CSF, se usa específicamente para la estimulación de colonias de macrófagos-granulocitos (GM-CSF) e incrementa la respuesta primaria por activación de las APC [213]. De cualquier modo, en la práctica, la aplicación de GM-CSF como adyuvante ha sido limitada por la necesidad de múltiples dosis y por su toxicidad, aunque en los últimos años se ha trabajado en la búsqueda de minimizar la toxicidad ya que los resultados de protección de estas vacunas eran muy favorables [213]. La coexpresión de algunas citoquinas junto con el antígeno en el mismo vector ha sido investigada en algunos modelos experimentales [214]. Las IL-12, IL-4 e IL-18 han sido estudiadas en preclínica para vacunas frente a *Schistosoma*

[215]. Así mismo, la aplicación directa de IL-12 junto a otras interleucinas como IL-23 constituye un adyuvante ideal para mucosas [216]. Este tipo de adyuvantes está siendo muy usado en inmunoterapias frente a cáncer [217].

Polisacáridos: el interés de los polisacáridos para el desarrollo de nuevos adyuvantes o inmunopotenciadores para vacunas médicas y veterinarias ha aumentado recientemente debido a sus ventajas, tales como fácil disponibilidad, bajo coste y alta eficiencia y poco riesgo de toxicidad [218]. Entre ellos se encuentran polímeros de plantas y hongos como los glucanos, los dextranos y los lentinanos, todos ellos polímeros de glucosa, también los mananos, entre los que se encuentran los glucomananos y los galactomananos; en los levanos y los xilanos a los que también se ha evidenciado actividad inmunopotenciadora [219]. La actividad de estos poliglicanos sobre los macrófagos, se realiza a través de receptores de glucanos y mananos. Esta activación incluye la inducción de fagocitosis y la secreción de citoquinas. Distintas pruebas *in vitro* indican que los mananos activan los monocitos y los macrófagos, con lo que inducen la producción de IFN γ , TNF α , GM-CSF, IL-1 e IL-6 [220].

La inulina es un fructano polisacárido de origen vegetal formado por una cadena lineal de 20 a 60 moléculas de fructuosa, que se extrae de la raíz de plantas de la familia Compositae, en especial de la Achicoria. También se encuentra en algunos alimentos vegetales como la alcachofa, el ajo, la cebolla, el espárrago, el puerro, el trigo y el plátano. Constituye un potente adyuvante, tanto para la inmunidad humoral como celular. Las micropartículas de inulina constituyen un activador del complemento y de la inmunidad innata [221]. La inulina, así como la combinación de inulina y alúmina, llamada algammulin, induce una elevada respuesta Th1 y Th2 sin producir elevación de la IgE, no habiéndose descrito ninguna toxicidad con su uso [222].

Polifosfacenos: los polifosfacenos son polímeros sintéticos solubles en agua, biodegradables, y muy estables a temperatura ambiente. El polifosfaceno más empleado ha sido el PCPP “poly [di(sodium carboxylatophenoxy) phosphazene]”, que ha mostrado propiedades de inmunopotenciador en ratón, tanto con antígenos virales como bacterianos [223]. Una nueva molécula derivada del PCPP, el PCEP “poly [di(sodium carboxylatoethylphenoxy) phosphazene]”, parece haber mostrado una mayor actividad como adyuvante [224], esta molécula induce una respuesta Th1/Th2 más equilibrada. La combinación de los polifosfacenos con los CpG oligodeoxynucleotides muestran una fuerte sinergia en la estimulación de una respuesta Th1 mayoritaria. En la actualidad se

han estudiado nuevas estructuras [225] a base de polifosfacenos para mejorar su capacidad de adyuvante utilizadas para mejorar la inmunoterapia frente al cáncer [226].

Adyuvantes basados en ácidos nucleicos: el descubrimiento de la capacidad inmunomoduladora del DNA ha llevado al desarrollo de secuencias de nucleótidos capaces de actuar como inmunoestimulantes [227]. Los motivos CpG están compuestos de seis desoxiribonucleótidos con un motivo central CpG [228] que tienen propiedades, tanto inmunomoduladoras, como inmunoestimuladoras e inmunodepresoras [229]. Su capacidad para activar el sistema inmune depende del grado de metilación del CpG, siendo inmunoestimuladores los no metilados. La activación se realiza a través de receptores TLR, disparando la secreción de INF- α y β y la producción de IL-12 que, a su vez, estimula la producción de INF- γ . En definitiva una respuesta tipo Th1 [230, 231]. Basándose en la capacidad inmunoestimuladora de los CpG, se han ensayado pequeñas cadenas de oligonucleótidos de cadena sencilla no metilados llamados ODNs, que poseen uno o más motivos CpG y que interaccionan con los receptores TLR9 activando las APC. Dado que los ODNs se ligan químicamente a los antígenos, tanto el antígeno como el adyuvante se presentan simultáneamente a la célula APC [232]. El hecho de existir secuencias tanto inmunoestimuladoras como inmunodepresoras abre la posibilidad de la manipulación para combinar los efectos de tales adyuvantes. En relación a su toxicidad, se ha determinado que puede estar relacionada con la dosis, con los intervalos del tratamiento, y con la ruta de administración. Otras estrategias relacionadas con vacunas de DNA, están basadas en la introducción de los motivos CpG en la secuencia de plásmidos de DNA. Estas vacunas han mostrado una limitada eficacia en animales y humanos, la inserción de estos motivos podrían incrementar la activación inmune de la molécula de DNA [233].

1.5.2. Diferentes vías de inoculación para administración de vacunas

La vía de inoculación es otro factor importante a tener en cuenta en el desarrollo de vacunas. La mayoría de las vacunas son administradas por vía intramuscular o subcutánea, sin embargo, la administración a través de la mucosa ofrece una importante serie de ventajas que incluyen: la fácil administración, la reducción de efectos adversos y un elevado potencial de estimulación. La inmunización local en la mucosa induce una inmunidad específica en la vía de entrada de muchos de los patógenos [134].

Algunos de los adyuvantes administrados por vía de mucosas son: el monofosforil lípido A, el muramildipéptido y las toxinas de *Vibrio cholerae* y

Escherichia coli. Estas toxinas, o sus subunidades, son los adyuvantes mucosales más estudiados, aunque el monofosforil lípido A y el muramildipéptido también han sido evaluados en formulaciones liposomales con fines terapéuticos y profilácticos.

La inmunidad de mucosas está mediada por la secreción de anticuerpos IgA, con lo que se evita la colonización de la mucosa epitelial por patógenos (tracto respiratorio y tracto digestivo). La inmunidad local en la vía respiratoria está mediada, además de por el sistema inmunitario, por el tejido linfoide denominado NALT. El NALT está compuesto por un conjunto de células involucradas en la ejecución de la respuesta inmune, como las células dendríticas, células T y células situadas bajo el epitelio nasal. Todas las vacunas existentes vía mucosa están formadas por organismos vivos atenuados, aunque existen diversos estudios con antígenos solubles.

Las vacunas veterinarias se administran por diversas vías en función del tipo de antígeno y del sistema de crianza de los animales de destino.

Vía oral: es muy usual esta vía de administración en vacunas vivas. Esta práctica permite la vacunación masiva, en pocas horas y con poca mano de obra al realizarse suspendiendo el antígeno en el agua de bebida.

Vía aerógena: es frecuente en vacunas víricas y bacterianas vivas destinadas a aves y porcino. Esta vía permite la vacunación masiva pero requiere de instalaciones y equipo adecuado para producir la nebulización. El tamaño de las gotas es importante para que se mantengan suficiente tiempo en el aire que respiran los animales.

Vía parenteral: es usada para la administración de todo tipo de antígenos especialmente inactivados. Esta vía requiere más personal y tiempo que las anteriores y ocasiona molestias a los animales. Por el contrario garantiza la administración más adecuada a cada animal. Las vías parenterales más usadas son la subcutánea e intramuscular aunque algunas vacunas se administran por vías específicas como intradérmica.

Vía tópica: se utiliza esta vía para administrar antígenos víricos en mucosa nasal y conjuntiva ocular. Es la vía más costosa y la más molesta para los animales pero produce la más rápida inmunidad local en las mucosas respiratorias y oculares.

1.5.3. Proteínas diana de nematodos gastrointestinales

La información actualmente disponible sobre los nematodos parásitos ha permitido la identificación de numerosas proteínas diana con utilidad terapéutica e inmunogénica. La característica común de estas proteínas radica en que son vitales para la supervivencia y/o el desarrollo del parásito, o que tienen características inmunogénicas.

Existen diversos estudios sobre los efectos del bloqueo de la función de proteínas vitales en nematodos, como por ejemplo, se ha comprobado que las L y Z catepsina proteasas están involucradas en el cambio de estadio del nematodo *Onchocerca volvulus* [234], asimismo, se observó poco tiempo después en *A. suum* que las pirofosfatasas inorgánicas, también están relacionadas en el cambio de estadio en la evolución de los nematodos [235, 236]. Aboobaker et al. en 2003 validaron dos proteínas diana en *Brugia malayi*, la RNA polimerasa II y la β -Tubulina, identificando a ésta última como diana letal.

Hu et al. en 2007 [237], identificaron un gen que codifica una serina/treonina proteína fosfatasa en *T. vitrinus* y midieron sus niveles de expresión en varios estadios del ciclo de vida de este nematodo, determinando que se expresaba solo en machos adultos. Este resultado está de acuerdo con los datos bibliográficos que relacionan este tipo de fosfatasas, entre otras muchas funciones vitales, con la espermatogénesis. Por lo tanto, abre la posibilidad de la utilización de las serina/treonina proteínas fosfatasas como proteínas diana en nematodos. Dicha proteína se vio que en *A. costarricensis* los niveles de expresión eran mayores en los estadios larvarios L1 y L3 que en los individuos adultos, lo que mostraba que jugaba un papel importante en el desarrollo evolutivo del nematodo [238].

1.5.3.1. Serina/treonina proteína fosfatasas

La fosforilación reversible de proteínas es un mecanismo fundamental para numerosos procesos celulares [239, 240]. Se sabe que, al menos la tercera parte de las proteínas celulares, contienen fosfato unido covalentemente. Mientras que las quinasas transfieren fosfato a partir de ATP, las proteínas fosfatasas catalizan la eliminación de los grupos fosfato de residuos de proteínas [241, 242].

La fosforilación reversible se regula a través de la relación dinámica entre quinasas y fosfatasas. Entre los muchos aminoácidos aceptores de fosfato, la

fosforilación de la serina es la que más prevalece en organismos eucariotas multicelulares, mientras que la fosforilación de la tirosina se ha descrito recientemente en bacterias y arqueas [243, 244]. Existen tres tipos de proteínas fosfatasas en eucariotas: “Protein serine/threonine phosphatases” (PSTP’s) que generalmente están ubicadas en el citoplasma de la célula y están involucradas en la transducción de señales y/o activación transcripcional [245], “Protein Tyrosine phosphatases” (PTP’s) que se encuentran usualmente unidas a la membrana y están relacionadas con la transducción de señales [246] y, por último, las “Dual specific phosphatases” (DSP’s).

La familia PSTP pertenece al grupo de proteínas fosfatasas que desfosforilan diferentes residuos proteicos. Muchas funciones celulares en eucariotas, incluyendo transducción de señales, adhesión celular, transcripción, RNA “splicing”, apoptosis y proliferación celular se controlan a través de la desfosforilación de proteínas [247, 248].

Las PSTP’s se caracterizaron por primera vez por Sutherland y, en el mismo año, por Krebs y Fischer en 1964 [249], quienes descubrieron el papel de la fosforilación de las proteínas en el metabolismo del glucógeno. Las PSTP’s son las fosfatasas mayoritarias en eucariotas y se han aislado y caracterizado en un gran número de tejidos. Se clasifican en subfamilias de acuerdo con la especificidad de sustrato, dependencia de iones metálicos y sensibilidad a inhibidores: las PSTP’s de tipo 1 o PP1 y las PSTP de tipo 2, que se dividen en PP2A, PP2B y PP2C. Estudios posteriores han identificado otras proteínas llamadas PP2A-like entre las que se encuentran PP4, PP5, PP6 y PP7 [250].

La mayoría de PSTP’s son proteínas multiméricas formadas por una subunidad catalítica y una o más proteínas accesorias. Las proteínas accesorias confieren especificidad de sustrato, regulan la actividad enzimática y controlan la localización subcelular de la holoenzima [251]. Algunas de estas enzimas, están involucradas en procesos reproductivos en varios animales [252-255], específicamente, en espermatogénesis y/o regulación de la movilidad del espermatozoide [256-258]. La comprobación de que en *Caenorhaditis elegans* hay un alto porcentaje de fosfatasas (50 %) en el tejido germinal [259] confirmaría esta posible diana.

1.5.3.1.1. Miembros de la familia de proteínas Serina/treonina proteína fosfatasas

La PP2A es la fosfatasa más prevalente en eucariotas y es principalmente citosólica aunque se puede encontrar en el núcleo [260] e interviene en numerosos procesos vitales tales como: mitosis [261], apoptosis [262], replicación y reparación de daños del DNA [263], transducción de señales [264] y respuesta a estrés por calor [265].

Las proteínas de la subfamilia PP2A puede ser diméricas o triméricas, por lo general están compuestas de una subunidad catalítica (C), una subunidad estructural (A) y una subunidad reguladora (B) (figura 1.5).

Subunidad catalítica (PP2Ac): la subunidad PP2Ac es una proteína globular de 36 kDa, que en mamíferos está codificada por dos genes α y β , con una identidad del 97 % [266-268]. Ambas isoformas están altamente expresadas en cerebro y corazón, aunque la PP2Ac α es diez veces más abundante que la PP2Ac β [269], y han sido aisladas en varias especies y en diversos tipos de tejidos. Así, en mamíferos han sido aisladas a partir de hígado, pulmón y cerebro, entre otros [266, 268, 270-275]. La identificación de la PP2Ac en organismos como *Xenopus laevis* [276, 277], *Drosophila melanogaster* [278], las plantas *Brassica napus* [279] y *Arabidopsis thaliana* [272], y las levaduras *Schizosaccharomyces pombe* [280] y *Saccharomyces cerevisiae* [281], han revelado que, aunque las PP2Ac están en constante evolución, pueden ser unas de las más conservadas entre todas la enzimas conocidas [250]. En otras especies como *D. melanogaster*, la subunidad catalítica de la proteína PP2A interviene en la regulación del ciclo celular y señalización intracelular, expresándose en todos los estadios aunque su expresión es notablemente superior en los embriones tempranos [278].

Subunidad A Estructural (PR65): la subunidad A es una proteína de 65 kDa, que se asocia a la PP2Ac formando un dímero al que se les une una subunidad B específica [282, 283] (figura 1.5). Al igual que la PP2Ac, en mamíferos la subunidad estructural está codificada en dos genes α y β , con un 87 % de identidad. En general PR65 α es más abundante que PR65 β , excepto en oocitos de *X. laevis* [284], siendo PR65 β altamente expresado en el ovario durante la oogenesis, meiosis, maduración y fecundación. PR65 ha sido identificado como un posible supresor de tumores en humanos [285, 286], se descubrieron un 15 % de alteraciones somáticas en el gen que codifica PR65 en líneas celulares cancerosas de pulmón y colon. Estas alteraciones, incluyen deleciones del gen, deleciones internas y en el extremo c-terminal de la proteína. Se han detectado

mutaciones en las que codifica la isoforma PR65 α en melanomas humanos y carcinomas de pecho y pulmón, aunque esto ocurre en baja proporción si se compara con los estudios realizados con PR65 β [287]. La estructura del PR65 está compuesta por 15 repeticiones en tándem de 39 aminoácidos, llamada “HEAT” [288], esta repetición en tándem se encuentran en varias proteínas incluyendo factores de elongación y TOR quinasas. La cristalización de la PR65 reveló que la arquitectura de cada repetición es virtualmente la misma, y consiste en dos alfa-hélices [289].

Subunidad Reguladora B: la subunidad B en mamíferos tiene cuatro familias (B, B', B'' y B'''), organismos como *S. pombe* carecen de subunidades de la familia B'' [290]. La presencia uniforme de las subunidades A y C, indica que las subunidades B confieren una localización subcelular, otorgando regulación y especificidad a la holoenzima PP2A [291].

PR55 o B: la subunidad PR55 es una proteína de 55 kDa que, en mamíferos, está codificada en cuatro genes (PR55 α , PR55 β , PR55 γ y PR55 δ), que se expresan en tejidos específicos [291-294]. PR55 α y PR55 δ tienen una amplia distribución en los tejidos, mientras que PR55 β y PR55 γ están en alta concentración en el cerebro [295].

PR61 o B': ésta subunidad está codificada por cinco genes: PR61 α , PR61 β , PR61 γ , PR61 δ y PR61 ϵ en humanos [296, 297]. Todos los miembros de este grupo contienen una región central altamente conservada (80 % de identidad), mientras las regiones C y N-terminal son más divergentes. Esto sugiere que la región conservada es necesaria para la interacción con la subunidad y posiblemente también con la subunidad C. Están relacionadas con varias funciones como regulación de la especificidad a sustrato y localización subcelular. Específicamente, PR61 α , PR61 β y PR61 ϵ se localizan en el citoplasma, mientras que PR61 γ está concentrada en el núcleo y PR61 δ tiene ubicación nuclear y citoplasmática [264]. Ensayos de hibridación llevados a cabo en modelos de mamíferos y vertebrados en general, demuestran la expresión de tejido específica de las distintas isoformas. PR61 α y PR61 γ , presentan altos niveles de expresión en el corazón y en músculo esquelético de vertebrados [297, 298], mientras que PR61 β y PR61 δ se expresan en cerebro [296].

Para el caso de vertebrados PR72 o B'': la subunidad PR72 presenta dos isoformas conocidas como: PR72 y PR130. La PR72 se expresa de manera exclusiva en corazón y músculo esquelético, mientras que la PR130 fue detectada en la mayoría de los tejidos analizados, aunque también mostrando niveles de expresión más elevados en el corazón y músculo esquelético [299]. Ha sido identificado en levaduras un miembro

de este grupo de proteínas reguladoras (PR59). Ésta isoforma en humanos, ha sido detectada en testículos, hígado, riñón, cerebro, corazón y pulmón, pero no en músculo esquelético [264].

PR93/PR110 o B''': al igual que las otras subunidades reguladoras, la B''' presenta varias isoformas y se localiza en mayor proporción en cerebro. Estas proteínas están relacionadas con la unión al calcio [300].

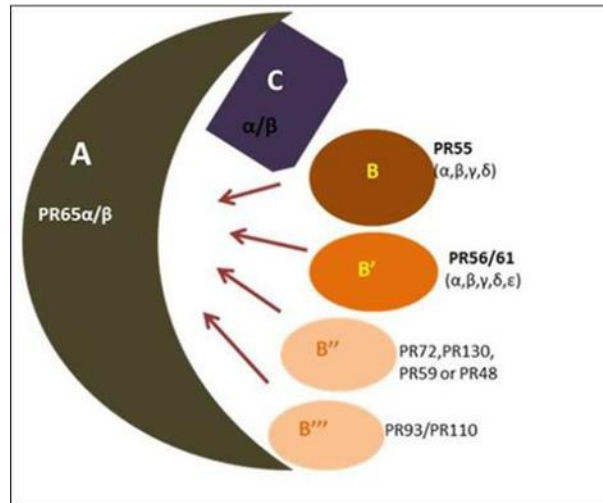


Figura 1.5. Subunidades serina/treonina proteína fosfatasa PP2A. Está formada por tres subunidades: subunidad catalítica (C), subunidad reguladora o estructural (A) y las subunidades variables B (B, B', B'', B''') [301].

Los miembros de esta familia están relacionados con un gran número de funciones diferentes tales como control en la división celular en respuesta a factores inhibidores que actúan por medio de una cascada de señales [261, 302, 303], transducción de señales [304], regulación de la apoptosis [262], respuesta a estrés por calor [264, 305, 306], entre otras. El papel de las PP2A en la supervivencia de las células es ampliamente conocido. Ratones “Knockout” permitieron determinar que la ausencia de PP2A es letal para el embrión [307], estudios “knockdown” específicos sobre varias subunidades B reguladoras determinaron que los heterodímeros A(PR55)C y A(PR72)C intervienen en la regulación negativa de la apoptosis [308, 309].

Asimismo, Kinoshita et al. en 1990 [280] determinaron que la doble delección de los genes que codifican la subunidad catalítica es letal en *S. pombe*. Estudios sobre la PP2A en *D. melanogaster* han generado información adicional del papel de esta enzima en diferentes procesos del desarrollo, regulación del ciclo celular y señalización intracelular; la PP2Ac se expresa durante todos los estadios de desarrollo, pero es

mucho más abundante en embriones [278]. Esto sugiere que esta familia de proteínas es esencial para la función celular, lo que la convierte en una posible diana terapéutica contra organismos perjudiciales, como los parásitos.

Varios autores relacionan las serina/treonina proteínas fosfatasas con la regulación de aspectos esenciales en el desarrollo del ciclo de vida de los patógenos kinetoplastidos [310, 311]. González et al. en 2003 [312] identificaron en *Trypanosoma cruzi* proteínas de la familia PP2A como importantes para la completa transformación de tripomastigotes en amastigotes durante el ciclo de vida del parásito. En otros protozoos tales como *Plasmodium falciparum* estas proteínas también han sido asociadas con el ciclo de vida del parásito, ensayos con ácido okadaico (inhibidor de PP2A) inhibieron el desarrollo de tres diferentes estadios del parásito (anillos, trofozoítos y esquizontes) [313, 314].

En nematodos las proteínas de la familia serina/treonina proteínas fosfatasas han sido identificadas, hasta el momento, en *B. malayi* [315], *T. spiralis* [316], *C. elegans* [317], *Oesophagostomum dentatum* [318], *T. vitrinus* [237] y *Toxocara canis* [319]. En *T. vitrinus* y *O. dentatum* las serina/treonina proteínas fosfatasas se han descrito como estadio-específicas al expresarse exclusivamente en machos, y posiblemente relacionarse con procesos reproductivos, debido a que existen antecedentes que involucran a estas proteínas en la espermatogénesis y/o movilidad del esperma [258].

Numerosos estudios desde 2009 han relacionado las serina/treonina proteínas fosfatasas con un papel inmunosupresor en cáncer. La primera evidencia de ello fue al relacionar el ácido okadaico con ser un promotor de tumores en ratones. Al igual que SV40 que también es inhibidor de estas proteínas y promotor de tumores [320]. Recientemente se estudia el posible papel de la PP2A así como terapia frente a cáncer de próstata entre otras aplicaciones incluidas como dianas terapéuticas frente a parásitos [321].

2. OBJETIVOS

2. Objetivos

Los objetivos planteados para la presente tesis doctoral fueron los siguientes:

1. Producción del péptido recombinante PP2A y mejora en la eficiencia del sistema de producción en *E. coli*.
2. Funcionalización del péptido recombinante PP2A uniéndolo a una molécula de síntesis oleico vinil sulfona (OVS) para formar un lipopéptido y llevar a cabo su ensayo como adyuvante.
3. Estudio de la protección y modulación de la respuesta inmune inducida por el péptido recombinante PP2A previa inmunización a la infección con el nematodo *Aspicularis tetraptera* en modelo de ratón.
4. Neutralización de los niveles circulantes de interleucina 23 con un anticuerpo monoclonal anti-IL-23 y su relación con la susceptibilidad a la parasitación a nematodos intestinales.
5. Inmunización en mucosas con el péptido recombinante PP2A y diferentes adyuvantes en ratones previamente infectados con el nematodo *Trichuris muris*.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3. Material y métodos

3.1. Parásitos

Los ensayos realizados en esta tesis se llevaron a cabo con dos especies de nematodos parásitos de ratón, *T. muris* y *A. tetraptera*. Con respecto a *T. muris* se utilizó la cepa Edinburgh que fue aislada en 1961 y ha sido mantenida en laboratorio hasta la actualidad [322], en este caso en la Universidad Complutense de Madrid a cargo del Profesor Francisco Bolás.

Respecto a *A. tetraptera* se usó una cepa de origen salvaje y mantenida en la Universidad de Valencia por la Doctora María Trelis.

3.2. Modelo animal

El modelo animal ensayado fueron ratones y según cual fuera el parásito a experimentar se utilizaron diferentes cepas.

Para el ensayo de inmunoprotección con el parásito *T. muris* se utilizaron ratones hembras congénitos de la cepa AKR/OlaHsd [323] entre 6 y 8 semanas de edad adquiridos de los laboratorios Harlan (Blackthorn Bicester Oxon, UK). Mantenidos en el animalario de la Universidad Complutense de Madrid en condiciones libres de patógenos, temperatura controlada así como ciclos de luz/oscuridad regulados. Para el experimento los ratones fueron agrupados en 5 grupos de 6 animales.

Los ratones que se utilizaron para hacer la infección con *A. tetraptera* fueron machos, ya que las hembras según su ciclo menstrual expulsan de forma natural estos parásitos y es difícil mantener la infestación. Fueron ratones congénitos de la cepa CD1/ICR con 5 semanas de edad mantenidos en la facultad de Farmacia de la Universidad de Valencia. Esta vez se hicieron 4 grupos con 5 ratones cada grupo.

Todos los estudios con animales se llevaron a cabo de acuerdo con la legislación española vigente para el Bienestar Animal.

3.3. Obtención del péptido recombinante PP2A (rPP2a) utilizado como vacuna

El antígeno que se utilizó como vacuna fue un péptido recombinante correspondiente a la región catalítica de la proteína de *Angiostrongylus costaricensis* serina/treonina fosfatasa (rPP2A). Se obtuvo de una genoteca de expresión [238], en la cual el rastreo inmunológico se realizó con un “pool” de 25 sueros de pacientes

humanos infectados por *A. costaricensis*. Entre los clones secuenciados, se escogió el clon CT2-2 con un inserto de 315 pb. Para la identificación se buscaron homologías en varias bases de datos. Entre ellas, la base de datos Wormbase, en la que esta secuencia presentó un 67 % de homología con un EST de *C. elegans* (OSTR172A11 1) que correspondía al gen Y40H4A.2 “Serine/Threonine protein phosphatase” (EMBL:CB396432). La secuencia del clon CT2-2 fue traducida a aminoácidos con el programa *Transeq* del paquete EMBOSS [324].

El clon identificado como positivo fue subclonado en el vector de expresión pQE31 el cual añade una cola de 6 histidinas en el extremo N terminal del péptido. Los oligonucleótidos utilizados para la subclonación fueron: F (5'-TCCGAGATCTGGACGAGC-3') y R (5'-CCCTATAGTGAGTCGTATTA-3').

```

1  gta gtt gat gag ttc tgc aca aat cat aac att gat ctg atc 42
   V V D E F C T N H N I D L I
43  ctc aga gca cat cag ata acc gca gag atg gtt tac gga ggt 84
   L R A H Q I T A E M V Y G G
85  tat cga ata ttc gct ggt gga cgc ttg gtg acg att ttt tcg 126
   Y R I F A G G R L V T I F S
127 gca cct aac tac cag aat atg atg aac gat ggt tgt gtg atg 168
   A P N Y Q N M M N D G C V M
169 aga att aag aga gac ttg acg gca aac ttc ata att ttt cga 210
   R I K R D L T A N F I I F R
211 ccg gtc gtc agg cga cat taa cag cac caa cag cca aga cgc 252
   P V V R R H - Q H Q Q P R R
253 cac gtt tca cga aat ttt cga gtt gtc gga ctt gaa tag att 294
   H V S R N F R V V G L E - I
295 aaa taa agg gat aaa ttt ctc 315
   K - R D K F L

```

3.3.1. Expresión y purificación

Una vez analizadas informáticamente las secuencias, verificada la clonación y el marco de lectura correcto de los dos fragmentos, se procedió a la inducción de la expresión, y a la purificación de la proteína recombinante mediante cromatografía de afinidad a níquel.

3.3.2. Inducción

Con el fin de inducir la expresión del péptido recombinante se utilizó una colonia aislada, que había resultado positiva por PCR, para inocular 10 ml de LB (conteniendo 100 µg/ml de ampicilina (Sigma-Aldrich® A9518) que se incubó entre 12-15 h a 37 °C y 240 rpm. Una vez crecido el cultivo se diluyó 1:100 en LB y se llevó hasta una DO₆₀₀ de 0.5-0.6. En este momento se añadió isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) (Sigma-Aldrich® I5502) a una concentración final de 0.5 mM y se incubó 3 horas a 180 rpm. Posteriormente el cultivo bacteriano se centrifugó a 4500 × g y el botón fue congelado toda la noche a -20 °C.

3.3.3. Purificación de proteínas recombinantes en cuerpos de inclusión

Dado que la proteína recombinante no se expresa de forma soluble, y sí en cuerpos de inclusión, el primer método de purificación que se llevó a cabo, fue este último. Los cuerpos de inclusión son agregados de proteínas en el citoplasma, de manera poco ordenada, formando precipitados, más o menos amorfos e insolubles.

Estos cuerpos son frecuentes en bacterias transformadas con plásmidos que expresan proteínas recombinantes.

Para su purificación, se descongeló durante 15 minutos en hielo un botón de bacterias cultivadas en LB e inducidas con IPTG, y se resuspendió en tampón de lisis en condiciones desnaturizantes a las que se les aportó una concentración de urea 8 M (2-5 ml de tampón por gramo). Se incubó 30 minutos a 20 °C, en el caso de que el lisado fuera muy viscoso, se añadió RNasa A (10 µg/ml) y DNasa I (5 µg/ml), y se incubó en hielo durante 5-10 minutos adicionales, junto con Triton X-100 a una concentración final del 5 %, y se sonicó en hielo en 6 ciclos de 10 segundos, a 200-300 W, con 10 segundos entre cada ciclo, utilizando un sonicador con sonda (microtip). El lisado se centrifugó a 4 °C y 12000 x g durante 30 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el botón conteniendo los cuerpos de inclusión en tampón de lisis, con un 2 % de Triton X-100, que era nuevamente sonicado y centrifugado en condiciones similares a las ya descritas.

Estos pasos se repitieron tres veces, con concentraciones finales de Triton X-100, 1 y 0.5 %. El último botón se lavó tres veces con PBS mediante centrifugación a 12000 x g durante 20 minutos, a 4 °C. En el resultado de la última centrifugación se cuantificó la concentración de proteínas con el método de Bradford en un

espectrofotómetro Milton Roy (Spectronic 3000) (explicado en el punto 3.3.6). Tras el último lavado se eliminó todo el sobrenadante y se guardó el botón a -20 °C, hasta su uso.

3.3.4. Purificación mediante cromatografía de afinidad

Con el fin de separar nuestra proteína de interés del resto de proteínas de las bacterias que podían quedar en la purificación de los cuerpos de inclusión, anteriormente descrita, se procedió a la purificación por cromatografía de afinidad. Esta técnica fue posible gracias a la cola de histidina que le aporta el vector de expresión a la secuencia de aminoácidos requerida.

Al igual que en el punto 3.3.3, el botón de bacterias fue descongelado en hielo durante 15 minutos y lisado 30 minutos a temperatura ambiente con tampón de lisis en condiciones desnaturalizantes con guanidina hidroclorehídrico GH (de 3 a 5 ml por gramo) también se añadieron, 10 µg/ml de RNasa A (Sigma-Aldrich® R6513) y 20 µg/ml de DNasa I (Sigma-Aldrich® DN25), 6 mM de MgCl₂ (como cofactor), posteriormente fue sonificado en hielo por 6 ciclos de 10 segundos a 200-300 W con 10 segundos de descanso entre cada ciclo. Se añadió imidazol a una concentración final de 5 mM, se comprobó que el pH del lisado fuera de 7.5 y se filtró por 0.45 µm (Minisart® 16534). Aquí no fue necesario hacer ultracentrifugaciones con gradientes decrecientes de Triton X-100 para eliminar proteínas estructurales de la bacteria ya que éstas las perderemos, como vamos a ver a continuación, con lavados crecientes de imidazol.

Para la purificación del péptido recombinante (rPP2A) con una cola de 6 histidinas en el extremo N terminal aportada por el vector de expresión pQE31, se utilizó una columna por afinidad HisTrap FF Crude (GE Healthcare Life Sciences 11-0004-58). Previamente la columna fue equilibrada con tampón de ligado, a continuación se pasó la muestra y seguido se hicieron lavados con tampón de ligado y cantidades crecientes de imidazol desde 20 mM a 60 mM para eliminar proteínas no unidas. Finalmente se eluyó la muestra en 6 ml de tampón de elución.

3.3.5. Diálisis y liofilizado

Las proteínas fueron dializadas con solución de acetato de amonio 0.1 M usando una membrana de diálisis 3500 MWCO (Spectra/Por® Dialysis 132725). Posteriormente fueron concentradas por un proceso de liofilizado, previamente congelado a -80 °C, que

consiste en ciclos de congelación y sublimación mediante un LyoBeta Lyophilizer system (Telstar S.A.).

3.3.6. Determinación de la concentración de proteína

Para la determinación de la concentración de proteína se eligió el método Bradford que se fundamenta en el cambio de absorbancia de 465 nm a 595 nm del colorante Coomassie Azul G-250, en solución ácida.

Se utilizó un reactivo comercial Bradford (Sigma-Aldrich® B6916) y para la curva de calibración, que se muestra en la tabla 1, se usó la albúmina bovina (BSA) (Sigma-Aldrich® A7906), como proteína estándar, a una concentración inicial de 0.1 mg/ml. De la proteína purificada (rPP2A) se pusieron 10 µl. Se agitaron los tubos y se dejó actuar a temperatura ambiente mínimo 5 minutos, se midió la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm en un espectrofotómetro Milton Roy (Spectronic 3000), tanto de la curva de calibración como de la proteína purificada. En la recta de regresión se interpoló la DO_{595} de la muestra para obtener la concentración de proteína.

Tabla 1. Curva de calibración

µg/ml BSA	0	1	2	4	6	8	10
µl (0.1 mg/ml BSA)	0	10	20	40	60	80	100
µl (H ₂ O)	800	790	780	760	740	720	700
µl (reactivo Bradford)	200	200	200	200	200	200	200

3.3.7. Electroforesis SDS-PAGE en geles de poliacrilamida

Con el objetivo de confirmar que se había purificado la proteína de interés y que era del peso molecular esperado, hicimos electroforesis SDS-PAGE (Laemmli 1970). Esta electroforesis desnatura las proteínas por calor en presencia de agentes desnaturizantes como β-mercaptoetanol que rompe los enlaces disulfuro, y SDS que desnatura y recubre las proteínas con carga neta negativa. Como soporte se utilizaron geles de poliacrilamida del 12.5 % y del 20 % (tabla 2 y 3), permitiendo un rango de separación desde 2 kDa a 250 kDa. La muestra fue tratada con tampón de la muestra y desnaturizada por calor 5 minutos a 98 °C, entre 100-200 µg de muestra fueron cargados en cada pocillo del gel. Como patrón de proteínas se utilizó un

Precisión Plus Protein Dual Xtra Standards (BIO-RAD 161-0397). La electroforesis se llevó a cabo en un tampón de corrido o también denominado con el término en inglés “running buffer” y el gel se sometió a un voltaje constante de 150 V durante 90 minutos. Para el revelado del gel se utilizó la tinción de Azul Coomassie seguido de una solución de desteñido.

Tabla 2. Soluciones para preparar el gel separador a 12.5 % y 20 %.

Soluciones	12.5 %	20 %
Agua milliQ (ml)	3.4	0.7
Acrilamida/bisacrilamida (ml)	4	6.7
Tampón del gel separador (ml)	2.5	2.5
SDS 10% (ml)	0.1	0.1
APS 10% (μ l)	100	100
TEMED (μ l)	10	10

Tabla 3. Soluciones para preparar el gel concentrador.

Soluciones	Volumen
Agua milliQ	3.6 ml
Acrilamida/bisacrilamida	0.8 ml
Tampón del gel concentrador	0.5 ml
SDS 10%	50 μ l
APS 10%	25 μ l
TEMED	5 μ l

3.4. Obtención de anticuerpos policlonales frente al péptido rPP2A

Una vez que se comprobó el peso molecular de la proteína y que se logró purificar por cromatografía de afinidad, se procedió a la obtención de un anti suero al objeto de obtener anticuerpos policlonales frente al péptido recombinante.

Se inocularon de forma intraperitoneal 3 ratones de la cepa BALB/c durante 6 semanas con 4 dosis cada 15 días, como se indica en la figura 3.1. La primera inoculación se llevó a cabo con una emulsión de 400 μ l conteniendo 4 μ g de péptido recombinante y 250 μ l de adyuvante completo de Freund (Sigma-Aldrich® F5881),

mientras que las siguientes inoculaciones se hicieron con la misma concentración de proteína pero adyuvante de Freund incompleto (Sigma-Aldrich® F5506). Se hicieron sangrados por punción mandibular en el ratón cada semana, para determinar el proceso de inmunización según el título de anticuerpos en el suero mediante técnica de ELISA.

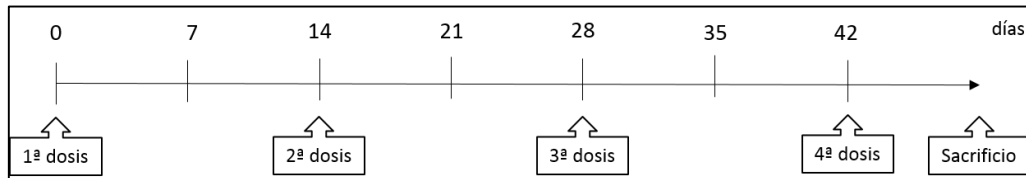


Figura 3.1. Esquema de inmunización para la obtención de suero policlonal.

A los 7 días de la última inoculación se realizó el sangrado completo del ratón por punción cardíaca previa anestesia. La sangre fue recogida en tubos colectores (BD Microtainer® tubes), centrifugada 5 minutos a 5000 x g y el suero tras valorar el título fue guardado a -80 °C hasta su uso.

3.5. Técnicas inmunológicas

3.5.1. ELISA

La ELISA indirecta es una técnica inmunológica en sistema de fase sólida basada en la reacción antígeno-anticuerpo. Con este método cuantitativo-cualitativo podemos medir bien el título de anticuerpos frente a un determinado antígeno o bien si se disponen de los niveles de anticuerpos y presencia de un antígeno.

Para ello, placas de 96 pocillos (Thermo 436013) fueron sensibilizadas con 5 µg de rPP2A por pocillo en tampón carbonato que se dejó incubando toda la noche a 4 °C. Tras ello se eliminaron los antígenos libres con 2 lavados de PBS-T y se bloqueó con solución de bloqueo durante 1 hora durante 37 °C. El suero de ratones inmunizados con rPP2A fue utilizado como anticuerpo primario, se hicieron diluciones desde 1:100 a 1:1600, y por triplicado 100 µl de las mismas se utilizaron para incubar la placa a ensayar, durante 2 horas a 37 °C. A continuación se lavó la placa 4 veces con PBS-T. Como anticuerpo secundario se utilizó un anti-ratón conjugado con peroxidasa (Dakocytomation P0447) a una dilución 1:1000, se incubó 2 horas a 37 °C y se volvieron a hacer 4 lavados. Finalmente para el revelado de la placa se añadieron 100 µl de una solución de sustrato de peroxidasa que se dejó actuar 20 minutos a temperatura

ambiente. La reacción fue parada con 50 μ l de solución de parada y se determinó la absorbancia a 495 nm en un lector de ELISA (Thermo, Multiskan Spectrum).

3.5.2. *Western-blot*

Una vez separada la proteína tras electroforesis en un gel SDS PAGE al 12 %, se realizó una electrotransferencia mediante un Trans-blot Turbo[®] (BIO-RAD) a membranas de nitrocelulosa (Hybond-C Extra, Nitrocellulosae, GE) previamente activadas en un tampón de transferencia a temperatura ambiente y durante 10 minutos. Esta membrana fue incubada con solución de bloqueo toda la noche a 4 °C. A continuación se incubó con una dilución 1:100 del suero policlonal de ratones inmunizados con rPP2A, 2 horas a 37 °C. Se hicieron 4 lavados de 10 minutos con PBS-T y se incubó otras 2 horas con un anticuerpo secundario marcado con peroxidasa (Dakocytomation P0447). El revelado de la membrana se hizo mediante una técnica de quimioluminiscencia para la que se utilizó una solución de luminol (Clarity[™] Western ECL Substrate, BIO-RAD) preparada en el momento y se visualizó con un ChemiDoc[™] MP System (BIO-RAD).

3.6. *Síntesis del oleico vinil sulfona (OVS)*

La síntesis de (9Z)-N-[2-(ethenylsulfonyl)ethoxy]-ethyl]-9-octadecenamida (OVS) (figura 3.2) fue descrita previamente y detallada su síntesis en [325], trabajo realizado en el Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada.

Posteriormente dicha molécula y su síntesis fue descrita por [326] en la funcionalización de Proteína A como sistema de unión y transporte de Proteína A - Anticuerpo para cargar con dichos anticuerpos nanopartículas (ISCOM) transportadores de fármacos [327].

Brevemente podemos describir en tres pasos la síntesis del ácido oleico funcionalizado con la vinil sulfona (figura 3.2). Una solución de ácido oleico (10 mM) en Cl₂SO (22 ml) fue magnéticamente agitada durante 1 hora a temperatura ambiente. Una evaporación y coevaporación con tolueno anhidro (3 x 15 ml) a presión reducida dio un extracto que se disolvió en Cl₂CH₂ anhidro (30 ml). Esta solución se añadió gota a gota a una solución de 2-amino etanol (0.9 ml, 15 mM) y Et₃N (2.8 ml, 20 mM) en Cl₂CH₂ anhidro (30 ml). La reacción fue incubada 15 minutos a temperatura ambiente y evaporada a presión reducida obteniéndose como resultado de la reacción un extracto

que fue purificado mediante cromatografía en columna usando EtOAc-hexane 2 : 1 → EtOAc como solvente y resultando la correspondiente amida sólida (2.88g, 88%). M.P. 59–61 °C [328] n_{max} (KBr)/cm-1: 3301, 1642, 1561, 1464, 1265, 1211, 1057, y 1035; $^1\text{H-NMR}$ mismos datos que aparecen en la bibliografía [329]. $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75MHz): δ 174.7, 130.1, 129.8, 62.4, 42.5, 36.7, 32.0, 29.8, 29.8, 29.6, 29.4, 29.4, 29.3, 29.3, 29.2, 27.3, 27.2, 25.8, 22.7, 14.2.

El extracto purificado por cromatografía da como resultado una amida sólida que fue añadida a una solución de 2-hydroxietilamida (1 mM) in THF (50 ml) divinil sulfona (0.21 ml, 2 mM) and t-BuOK (11 mg, 0.10 mM). La reacción fue agitada magnéticamente 20 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se evaporó el solvente bajo presión reducida obteniéndose un extracto que nuevamente se purificó mediante cromatografía en columna (hexano–eter 1 : 1) dio 6c como un sólido (279 mg, 81%). M.P. 61–62 °C; n_{max} (film)/cm-1: 3062, 2915, 2847, 1462, 1284, 1124, 908 y 730; $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 6.62 (dd, 1 H, $J = 16.6$ and 9.8 Hz, CH =), 6.43 (d, 1 H, $J = 16.6$ Hz, = CH₂trans), 6.15 (d, 1 H, $J = 9.8$ Hz, = CH₂cis), 2.96 (t, 2 H, $J = 8.0$ Hz), 1.77 (m, 2 H), 1.46–1.20 (m, 30 H), 0.88 (t, 3 H, $J = 6.7$ Hz); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz): δ 136.3, 130.4, 54.4, 32.0, 29.8, 29.7, 29.7, 29.7, 29.6, 29.4, 29.3, 29.1, 28.5, 22.8, 22.4, 14.2. HRMS (m/z) (FAB+) calculado para C₂₀H₄₀O₂SNa [M + Na]⁺: 367.2647; obteniendo: 367.2644.

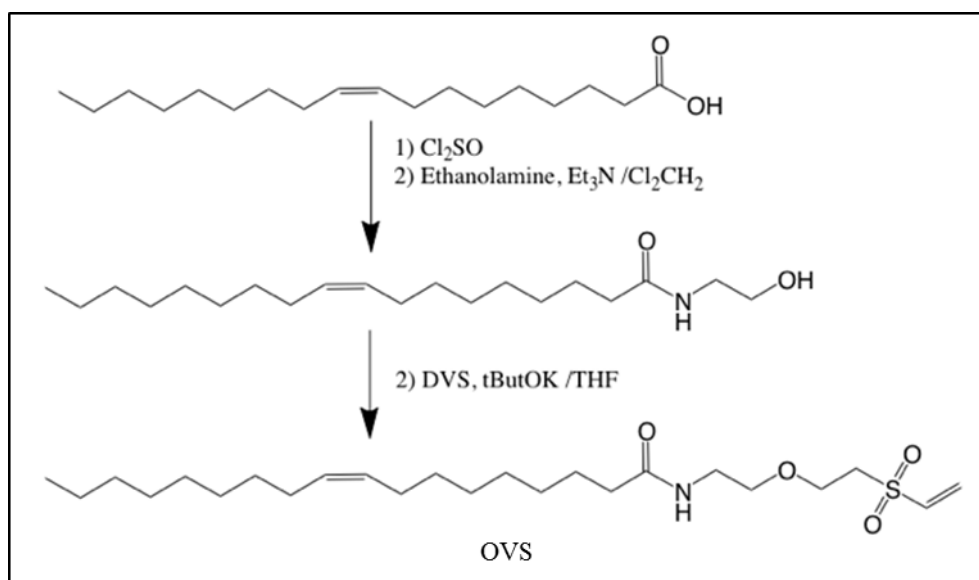


Figura 3.2. Síntesis del compuesto 9Z)-N-[2-(ethenylsulfonyl)ethoxy]-ethyl]-9-octadecenamide (OVS).

3.7. Acoplamiento del oleico vinil sulfona (OVS) al péptido rPP2A mediante química “click”

El motivo para acoplar el péptido recombinante (rPP2A) al compuesto OVS es conseguir incluirle al péptido recombinante una cadena alquílica de 18 átomos de carbono y conseguir así un lipopéptido que actúe tanto de antígeno vacunal como de adyuvante. En este caso conseguir una tecnología de lipopéptidos auto-ensamblantes para cualquier antígeno recombinante o sintético con lo que se aumenta la antigenicidad y respuesta inmunológica del mismo. La incorporación de ácidos grasos a la estructura de las proteínas facilita la interacción de estas con las membranas, así como su transporte a través de las mismas. Además se ha visto que modula ciertas interacciones proteína-proteína y diversos procesos de señalización, si bien no se conoce muy bien el mecanismo de acción pero bien pudiera ser el modo de presentación antigénica y/o la formación de micelas capaces de estimular las células presentadoras de antígeno (APC). El acoplamiento se lleva a cabo mediante enlaces covalentes de la vinil sulfona ligada al ácido graso con los grupos aminos del péptido presentes en los residuos de aminoácidos que lo componen, en concreto, según [325] el ácido graso funcionalizado se une a residuos de histidina (H) y o cisteína (C).

Para llevar a cabo el acoplamiento del OVS y el péptido rPP2A primero se solubilizó el compuesto OVS en metanol y tampón carbonato a una proporción 1:1 con una concentración final de OVS de 2 mg/ml. Esta solución fue mezclada con una solución de 2 mg/ml rPP2A en tampón carbonato a una proporción final 1:1 que se incubó en agitación a 4 °C toda la noche. Para bloquear los posibles grupos reactivos del OVS que puedan quedar libres se añadió glicina 1 M en tampón carbonato y se incubó a temperatura ambiente durante 4 h. Los conjugados resultantes fueron dializados en acetato de amonio (0.1 M) y posteriormente liofilizado siguiendo el protocolo desarrollado en el punto 3.3.5.

3.8. Estudio del lipopéptido rPP2A-OVS

3.8.1. Determinación del peso molecular del lipopéptido recombinante rPP2A-OVS mediante la técnica de Espectrometría de Masas.

La Espectrometría de Masas (EM), es una técnica de carácter cualitativo de amplia utilización para la determinación de estructuras orgánicas. Esta técnica está basada en la obtención de iones a partir de moléculas orgánicas en fase gaseosa, que una vez obtenidos estos iones se separan de acuerdo con su masa y su carga, y finalmente se detectan por medio de un espectrómetro de masas. El resultado que nos presentará esta técnica es un espectro de masas que representa un parámetro relacionado con la abundancia de los diferentes tipos de iones en función de la relación masa/carga de cada uno de ellos que estará correlacionada con la estructura química de cada compuesto.

Las mediciones se hicieron en el laboratorio de EM (SIIdI), de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Madrid en un espectrómetro modelo ULTRAFLEX III TOF/TOF de (BRUKER). Este aparato utiliza un láser NdYAG (emisión, 355 nm; voltaje de aceleración, 25 kV y deflexión, 100 Da). Un mg del lipopéptido rPP2A-OVS fue disuelto en 0.2 ml de 1,1,1,3,3,3 Hexafluoruro 2 propanol. La muestra y la matriz (10 mg de ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (ACC) en 1 ml de acetonitrilo, 0.1 % TFA en agua 3:1 v/v) fue preparada con una proporción 1:20 y posteriormente aplicada a una placa metálica para análisis de EM. Después, las muestras fueron secadas y la placa metálica insertada en el analizador de EM MALDI-TOF.

3.8.2 Visualización de rPP2A-OVS mediante Microscopía Electrónica de Transmisión

Con el fin de conocer las posibles estructuras que adopta el OVS una vez funcionalizado con el péptido rPP2A en condiciones fisiológicas, una suspensión de OVS funcionalizado en PBS fue sonicado y observado mediante tinción negativa bajo Microscopía Electrónica de Transmisión (MET) (LIBRA 120 PLUS de Carl Zeiss SMT), esta técnica se llevó a cabo mediante el depósito de 5 μ L de la suspensión adsorbida directamente en una rejilla de cobre recubierta con Formvar y teñida con 1 % de acetato de uranilo durante 1 minuto y observada directamente mediante MET [330]. Como control, una suspensión de rPP2A en PBS fue también sonicada siguiendo el mismo tratamiento que el compuesto rPP2A-OVS y observada con el MET. Finalmente

para conocer el tamaño de las partículas, las imágenes resultantes de MET fueron medidas con el programa ImagenJ [331].

3.9. Ensayos de inmunización

Con el objetivo de estudiar el nivel de protección que rPP2A provoca en los animales infectados con los parásitos, y la modulación de la respuesta inmune, se llevaron a cabo una serie de ensayos de inmunización con diferentes adyuvantes.

3.9.1. Respuesta inmune inducida frente a la infección por *A. tetraptera*

Para el ensayo de inmunización se utilizaron 4 grupos de ratones de la cepa CD1/ICR (5 semanas de edad, machos) con 5 ratones en cada grupo. Las condiciones de cada grupo fueron:

- 1) Control previo a la infección no inmunizado (C)
- 2) Control de la infección no inmunizado (CI)
- 3) Inmunización con 4 μ g de rPP2A (rPP2A-I) e infectados
- 4) Inmunización con 4 μ g de rPP2A (rPP2A) no infectados

La vía de inmunización utilizada fue la vía intranasal, para ello la dosis en los grupos 3 y 4 se administró junto a carboximetilcelulosa sódica (NaCMC) al 1 %. La carboximetilcelulosa sódica es un polisacárido lineal que debido a sus propiedades hidrofílicas, alta viscosidad, facilidad para formar películas y comportamiento adhesivo se podría utilizar como estabilizador de emulsiones y suspensiones y ser adherido internamente a la mucosa (en este caso mucosa nasal) a la misma vez que puede retrasar la liberación del péptido recombinante [332, 333].

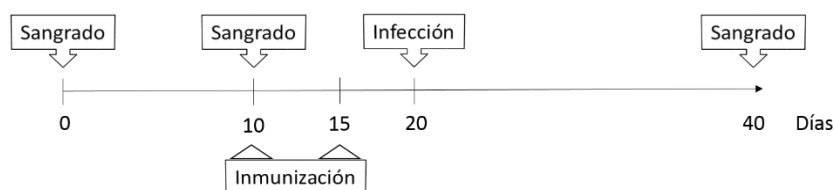


Figura 3.3. Esquema de inmunización empleado en el ensayo de infección con el parásito *A. tetraptera*.

El experimento de inmunización se realizó en un total de 40 días como se puede observar en la figura 3.3. En el día 0, los ratones fueron sangrados en la vena submaxilar para obtener un suero control preinmune. Para no causar estrés a los animales, la primera inmunización a los ratones de los grupos 3) y 4) se le realizó el día

10, en este día también se tomaron muestras de sangre y se volvió a inmunizar en el día 15. Los grupos 2), y 3) fueron infectados con 200 huevos embrionados mediante vía oral con una sonda gástrica [334] 20 días desde el inicio del experimento. Veinte días después del reto, los 4 grupos de ratones utilizados para el experimento fueron sacrificados previo sangrado por punción cardiaca. Una vez sacrificados se contaron el número de vermes presenten en el intestino de los ratones infectados.

A fin de conocer el grado de implicación de la IL-23 como estimuladora de la respuesta inmunológica Th17, en la predisposición a crear un ambiente intestinal que permita o rechace, la implantación del parásito se llevó a cabo una serie de ensayos de infección con *A. tetraoptera* sobre ratones a los que previamente se les había inoculado un anticuerpo frente a la IL-23. Para el experimento se utilizaron dos grupos de ratones CD1/ICR (4-6 semanas de edad, machos) con 5 ratones en cada grupo. Las condiciones de cada grupo fueron:

- 1) Grupo de ratones inoculados periódicamente 6.6 µg de un anticuerpo monoclonal anti-IL-23 e infección con *A. tetraoptera* posterior a las inoculaciones (anti-IL-23^{mAB}-I).
- 2) 1) Grupo de ratones inoculados periódicamente 6.6 µg de un anticuerpo monoclonal anti-IL-23 (anti-IL-23^{mAB}-C) y no infectados
- 3) Grupo de animales no inoculados con anticuerpo e infectados como control de Infección (CI).

Como se representa en la figura 3.4, el grupo de ratones CI se infectaron el día 3 post-estabulación con 300 huevos embrionados. El día 1 y 2 pre-infección y 6 días consecutivos después de la infección se les administró por vía intraperitoneal 6.6 µg de un anticuerpo monoclonal anti-IL-23 (anti-mouse IL-23 p19 purified, eBioscience, No 14-7232) tanto al grupo control como al grupo infectado con el nematodo. Al inicio del experimento se extrajo sangre a los animales para la obtención de suero preinmune, igualmente se volvió a extraer el día 5 y finalmente en el momento del sacrificio fueron totalmente sangrados para la obtención de suero utilizado en posteriores experimentos como control de la infección. Veinte y tres días después de la infección todos los ratones fueron sacrificados previo sangrado por punción cardiaca.

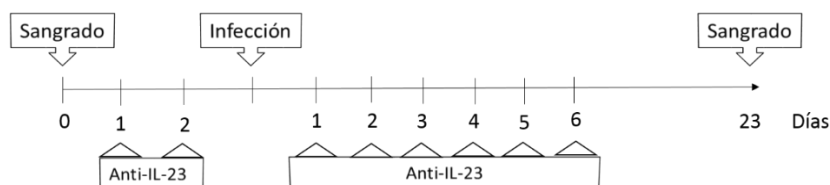


Figura 3.4. Esquema de empleado en el ensayo de neutralización de la IL-23 e infección con el parásito *A. tetráptera*.

3.9.2. Respuesta inmune inducida frente a la infección por *T. muris*

Para el ensayo de inmunización se utilizaron 5 grupos de ratones de la cepa AKR/olaHsd con 6 ratones por grupo. Cada grupo fue tratado con las siguientes condiciones:

- 1) Control no vacunado, no infectado.
- 2) Control de la infección: no vacunado (CI), sí infectado.
- 3) Inmunización con el adyuvante 4 μ g de rPP2A junto con 4 μ g de paredes bacterianas (rPP2A-PB) e infectado.
- 4) Inmunización con 4 μ g de rPP2A acoplada a OVS (rPP2A-OVS).
- 5) Control de adyuvante de Paredes Bacterianas 4 μ g de paredes bacterianas (PB) no infectado.

Todas las vacunas fueron administradas en una solución de carboximetilcelulosa al 1 % por vía intranasal.

Como se indica en la figura 3.5, todos los grupos menos el 1), fueron infectados en el día 0 por vía oral con 200 huevos embrionados de *T. muris* [335] con ayuda de una cánula gástrica. En el día 49 p.i a los grupos 3), 4) y 5) se les hizo la primera inmunización repitiéndose en el día 63 p.i. El día 90 p.i los ratones fueron exanguinados por punción cardiaca previa anestesia con isoflurano y finalmente sacrificados.

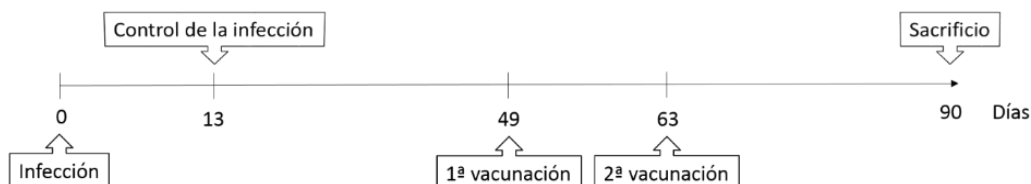


Figura 3.5. Esquema de inmunización empleado en el ensayo de infección con el parásito *T. muris*.

Con el objetivo de observar si el tratamiento e inmunización de los diferentes lotes de animales con las diferentes fórmulas vacunales comportaba algún cambio en los

animales se procedió a pesar semanalmente a cada animal hasta el final del experimento, a los datos obtenidos en cada una de las pesadas les fueron calculadas la media y su desviación estándar con objeto de realizar un estudio estadístico que determinara o no la inocuidad de los tratamientos.

3.9.2.1. Evaluación de la infección

3.9.2.1.1. Contaje de número de huevos en heces

A fin de evaluar la eficacia de la inmunización con las diferentes fórmulas administradas, se realizó semanalmente contaje de huevos en heces mediante el método Stoll, a partir del día de la primera inmunización hasta el día del sacrificio de los animales. El método Stoll, se basa en los principios de saponificación, homogenización y aclaración de las muestras de heces. El NaOH al ponerse en contacto con la grasa de las heces se saponifica, hace que los huevos de los parásitos presentes en heces sean menos pegajosos, desinfecta y desodoriza la muestra. Para la recogida de heces individualizada de cada animal, estos se mantuvieron aislados durante 8 horas, a fin de recoger las excretas que liberaran. Las heces se homogeneizaron en 0.1 % NaOH (con una proporción de aproximadamente 4 g / 60 ml 0.1 N NaOH). Un volumen conocido de la suspensión se colocó en un portaobjetos cuadrado y los huevos se recontaron al microscopio óptico a un aumento de 4 x.

3.9.2.1.2. Contaje de número de vermes post mortem

Para evaluar el nivel de infección resultante al final de cada experimento, así como la toma de muestras tanto de intestino, nódulos linfáticos mesentéricos (NLM) y placas de Peyers (PPs) para el ensayo con *T. muris*, además de bazo para *A. tetraptera*, los ratones fueron sacrificados (90 días después del inicio del experimento y 27 días después de la última vacuna para *T. muris* y 40 días desde el inicio del experimento, 25 tras la segunda vacuna y 20 después de la infección en el ensayo con *A. tetraptera*) y diseccionados. En los casos que nos ocupan (infección con *T. muris* y *A. tetraptera*) la parte del intestino que fue diseccionada fue el intestino grueso, hábitat de estos nematodos, que fue extraído y abierto longitudinalmente para facilitar la observación y recogida de los adultos de los nematodos [336], realizándose los recuentos de los vermes bajo microscopio estereoscópico.

3.10. Cuantificación de la expresión de interleucinas en bazo, placas de Peyers y nódulos linfáticos mesentéricos.

3.10.1. Extracción de RNA de órganos de ratón

Para la extracción de RNA de ratones experimentales se usó el bazo, PPs y NLM que fueron incluidos, inmediatamente después del sacrificio del animal, en RNAlater[®] (ThermoFisher Scientific) en una proporción 1 parte de tejido, 5 partes de solución y mantenidos a -20 °C hasta su uso. La estrategia que se siguió fue, primero una extracción de RNA total y seguidamente para eliminar cualquier resto de DNA genómico que pudiera quedar en la muestra se hizo una extracción de RNA mensajero (mRNA). La extracción de bazo sólo se hizo de los ratones infestados con *A. tetraptera*.

La extracción de RNA total se llevó a cabo mediante el RNeasy[®] Midi kit (Qiagen 74106) con algunas modificaciones. Este kit permite hacer extracciones de bazo, NLM y PPs conservados en RNAlater[®]. Se partió de 20-30 mg de tejido que se homogeneizó con 600 µl de tampón RTL en un homogeneizador manual. Posteriormente se precipitó con un volumen de etanol al 70 %, se transfirió a una columna y se centrifugó 15 segundos a 8000 × g. Para asegurar la eliminación de todo el DNA genómico se hizo un tratamiento con DNasa I. Este tratamiento se hizo con RNase-Free DNasa Set (Qiagen 79254), consistió en añadir a la columna 350 µl de tampón RW1, centrifugar 15 segundos a 8000 × g y descartar el sobrenadante, después se añadieron a la columna una mezcla de 10 µl de DNasa I y 70 µl de tampón RDD, en total se adicionaron 80 µl de tampón RDD suplementado que se incubó durante 15 minutos a 30 °C. Tras la eliminación del DNA genómico se procedió al lavado de la membrana, para ello se añadieron 350 µl de tampón RW1 y se centrifugó 15 segundos a 8000 × g descartando el sobrenadante, este paso se repitió con 700 µl. Después se añadieron 500 µl de tampón RPE, se volvió a centrifugar 15 segundos a 8000 × g, este paso se repitió una vez más aumentando el tiempo de centrifugado a 2 minutos. Finalmente la elución del RNA total se hizo con 50 µl de agua milliQ libre de RNasas. La cantidad el RNA total fue medida por un electrophotometric (Nanodrop ND-1000, Thermo Scientific). La calidad del RNA fue evaluada usando el Experion automated electrophoresis system (BIO-RAD).

La extracción de mRNA poli A⁺ a partir de RNA total se hizo para asegurar que el RNA esté libre de DNA genómico y para darle mayor estabilidad, para ello se utilizó el “Oligotex[®] mRNA Midi kit” (Qiagen 70042). Una vez determinada la concentración

de RNA total extraído se añadió la cantidad adecuada de tampón OBB y se incubó durante 3 minutos a 70 °C, seguidamente se incubó 10 minutos a 25 °C (en este paso se produce la hibridación entre la cola de poli A⁺ y los oligo-dT 30). Se centrifugó durante 2 minutos a 16000 × g y se descartó el sobrenadante cuidadosamente. El precipitado se resuspendió en 400 µl de tampón OW2, se traspasó a una columna y se centrifugó 1 minuto a 15000 × g, este paso se repitió una vez más. Por último se transfirió a un nuevo tubo colector y se añadieron 50 µl de tampón OEB precalentado a 70 °C, se centrifugó a 16000 x g durante 1 minuto para eluir el mRNA Poli A⁺. Este paso se repitió una vez más y se obtuvieron 100 µl de mRNA Poli A⁺. La cantidad del mRNA fue nuevamente medida por un electrophotometric (Nanodrop ND-1000, Thermo Scientific) y la calidad de extracción del mRNA de los tejidos fue evaluada usando el Experion automated electrophoresis system (BioRad, Nazareth Eke, Belgium).

3.10.2. Retrotranscripción del mRNA

La retrotranscripción se realizó con iScript cDNA Synthesis kit (BIO-RAD 170-8891) que utiliza una mezcla de oligo-dT y exanucleótidos aleatorios que permiten la amplificación de todo el mRNA, para ello se utilizó un termociclador (CFX96 Real-Time System, BIO-RAD). El volumen final de cada reacción fue de 20 µl. Cuatro µl de 5 x iScript reaction mix, 1 µl de iScript reverse transcriptase, el volumen del mRNA dependió de su concentración (100 fg a 1 µg mRNA). Las condiciones de retrotranscripción fueron las siguientes: 5 minutos at 25 °C, 30 minutos at 42 °C, 5 minutos a 85 °C, al terminar se mantuvo a 12 °C. La concentración y calidad del cDNA se midió con un electrophotometric (Nanodrop ND-1000, Thermo Scientific), se diluyó 1:10 y se guardó a -80 °C hasta su uso.

3.10.3. Cuantificación por PCR cuantitativa en tiempo real de la expresión de interleucinas

Para la amplificación de los diferentes genes de interleucinas se utilizaron oligonucleótidos, diseñados con el programa eprimer3 [337], cuyas secuencias se encuentran descritas en el punto 3.13. Para cada pareja de oligonucleótidos se hizo una curva de calibración y fue optimizada su concentración. Como gen de referencia para normalizar la expresión de cada interleucina y control interno de la reacción, se utilizó el gen de la β-actina [338-340]. EL cDNA fue amplificado usando Ssofast™ Eva Green® Supermix (BIO-RAD 172-5201), y se utilizó una concentración de cDNA de

50 ng por reacción. La amplificación se hizo en un termociclador (CFX96 Real-Time System, BIO-RAD), las muestras fueron inicialmente calentadas a 95 °C durante 2 minutos, seguido de 40 ciclos que consistieron en una desnaturalización de 95 °C durante 10 segundos, un paso de annealing a 55 °C durante 30 segundos y un paso de extensión a 60 °C durante 1 minuto. Cuando la amplificación terminó, las muestras se mantuvieron a 12 °C. Se hicieron 3 réplicas por muestra.

3.11. Inmunohistoquímica de tejidos de ratón

3.11.1. Procesado del tejido para microscopía

Tras la eutanasia de los ratones, el intestino fue rápidamente en solución fijadora. Los cortes en secciones finas (5-10 micras) los llevaron a cabo en la unidad de Microscopía y Microdissección del CIC de la Universidad de Granada. Finalmente una vez los cortes realizados, las secciones finas se fijaron en portaobjetos para seguir con el protocolo de inmunohistoquímica que se detalla a continuación.

3.11.2. Preparación de las secciones finas para inmunohistoquímica

3.11.2.1. Desparafinado, hidratación y recuperación antigénica

Previo al tratamiento de inmunohistoquímica, para eliminar la parafina de las secciones se procedió con dos lavados de xilol de 15 minutos cada uno. Posteriormente se hidrataron con un gradiente decreciente de etanol hasta agua destilada (100 %, 97 %, 70 %, H₂O destilada), en cada uno de los pasos la incubación fue de 15 minutos a temperatura ambiente [341] [27]. A continuación se hizo un desenmascaramiento antigénico mediante calor [342]. Este proceso fue necesario ya que los tratamientos para la inclusión en parafina pueden alterar la estructura de los antígenos diana y así perder su actividad inmunológica e interferir en la respuesta de unión antígeno-anticuerpo deseada. Para ello, se sumergieron las preparaciones en jarras de Coplín con una solución de citrato sódico 10 mM a pH 6-7 en el interior de un autoclave (120 °C durante 10 minutos) [343], una vez terminado el proceso se enfriaron las preparaciones en agua hasta alcanzar la temperatura ambiente.

3.11.2.1. Permeabilización, bloqueo e inmunomarcaje

Una vez hidratadas las preparaciones se bloquearon los posibles sitios de unión inespecíficos para los anticuerpos a los grupos aldehídos libres procedentes del fijador,

para ello se trató con PBS conteniendo 1 % de ovoalbúmina (Sigma-Aldrich® A5503) durante 30 minutos. Después se incubaron con los diferentes anticuerpos, que se describen en el punto 3.15, a una dilución 1:50 en tampón de bloqueo, ya sean conjugados, o no conjugados para estos últimos se usó el correspondiente anticuerpo secundario para determinar la localización en intensidad de color o fluorescencia. Finalmente se tiñeron los núcleos celulares con una dilución 1:100 de 4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (Sigma-Aldrich® D9542) durante 10 minutos. La observación de las secciones histológicas se llevó a cabo en el Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada. Y fueron analizadas y ajustadas mediante el programa ImagenJ [331], midiéndose la intensidad de fluorescencia y en algunos casos también se hizo conteo de las células de interés.

3.12. Análisis estadístico

Todos los datos se normalizaron antes del análisis estadístico. Los datos se sometieron a una ANOVA, la prueba utilizada fue *Tukey-kramer*, para la comparación de los múltiples grupos usando el programa v3.05 GraphPad INSTAT (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, EE.UU.). Los resultados representados fueron el valor medio y la desviación estándar de los datos obtenidos de los diferentes grupos en distintos momentos para cada experimento realizado. Un valor de $p < 0.001$ se considera que es altamente significativo (***), un valor de $p < 0.01$ se consideró significativo (**) y un valor de $p < 0.05$ fue considerado poco significativo (*).

3.13. Soluciones y tampones

- LB: para un litro se adicionaron 10 g de NaCl, 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura y se autoclavó 20 min a 121 °C y 1 atm de presión
- PBS: 10 mM de fosfato sódico y 10 mM de fosfato potásico a pH 7.2
- PBS-T: 0.3 % de Tween 20 (P1379, Sigma-Aldrich®) en PBS
- Solución de bloqueo: PBS-T 0.1 % y 2 % de leche desnatada en polvo
- Solución de desteñido: 30 % metanol, 10 % ácido acético
- Solución de parada: 3 M HCl
- Solución de tinción: 0.25 % azul Coomassie, 40 % de metanol, y 10 % de ácido acético
- Solución fijadora: 2 % formaldehído y 1 % glutaraldehído en PBS

- Sustrato de peroxidasa: 12.5 ml tampón citrato, 12.5 ml de agua milliQ, 1 pastilla de OPD (O-fenil diaminobenzidina) (Sigma-Aldrich®, P0447) y 25 μ l H_2O_2
- Tampón carbonato: 0.1 M de carbonato sódico y 0.1 M de bicarbonato sódico a pH 9.3
- Tampón citrato: disolver en 100 ml de agua milliQ, 0.46 g de ácido cítrico, 0.72 g de $Na_2 HPO_4$ y ajustar el pH a 5
- Tampón de corrido o “running buffer”: 0.025 M Tris-HCl, 0.192 M glicina y 0.1 % SDS)
- Tampón de elución: 6 M Guanidina-HCl, 20 mM fosfato de sodio, 500 mM NaCl, 500 mM imidazole, 1 mM β -mercaptoetanol a pH 7.4.
- Tampón de la muestra: 100 mM de Tris-HCl, 1 mM de EDTA, 2.5 % de SDS, 0.01 % de azul de bromofenol, 10 % glicerol y 5 % de β -mercaptoetanol a pH 8.
- Tampón del gel concentrador: 1 M de Tris-HCl a pH 6.8.
- Tampón del gel separador: 1.5 M de Tris-HCl a pH 8.8.
- Tampón de lisis: 50 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 10 mM EDTA, 6 M Guanidina-HCl, 0.35 mg/ml de lisozima (Sigma-Aldrich®, 62970), 5 mM de imidazol y 5 mM β -mercaptoetanol a pH 8.
- Tampón de ligado: 6 M Guanidina-HCl, 20 mM fosfato de sodio, 500 mM NaCl, 5 mM imidazole, 1 mM β -mercaptoetanol a pH 7.4.
- Tampón de transferencia: 25 mM Tris-HCl, 192 mM glicina y 20 % de metanol.

3.14. Tabla de secuencia de oligonucleótidos de los genes de interleucinas usados en este estudio

Oligonucleótido	Secuencia (5' - 3')
Act	F TCCATCATGAAGTGTGACGT
	R GAGCAATGATCTTGATCTTCAT
G-CSF	F CAGAGGCGCATGAAGCTAAT
	R TCCAGGGACTTAAGCAGGAA
IL2	F CCACTTCAAGCTCCACTTCA
	R ATCCTGGGGAGTTTCAGGTT
INF- γ	F GCTCTTCCTCATGGCTGTTT
	R GTCACCATCCTTTTGCCAGT
IL12	F GACCAAACCAGCACATTGAA
	R CTACCAAGGCACAGGGTCAT
IL15	F CATTTTGGGCTGTGTCAGTG
	R TGCAACTGGGATGAAAGTCA
IL6	F AGTTGCCTTCTTGGGACTGA
	R TCCACGATTTCCCAGAGAAC
TNF- α	F CCCCAAAGGGATGAGAAGTT
	R CACTTGGTGGTTTGCTACGA
IL4	F CCTCACAGCAACGAAGAACA
	R ATCGAAAAGCCCGAAAGAGT
IL10	F CAGAGCCACATGCTCCTAGA
	R TCATTTCCGATAAGGCTTGG
IL13	F AGCATGGTATGGAGTGTGGA
	R TTGCAATTGGAGATGTTGGT
TGF- β	F TGGAGCAACATGTGGAAGTC
	R AGCCCTGTATTCCGTCTCCT
IL17	F TCCAGAAGGCCCTCAGACTA
	R TCATGTGGTGGTCCAGCTT
IL23	F TAATGTGCCCCGTATCCAGT
	R AGGCTCCCCTTTGAAGATGT
IL25	F ACCACAACCAGACGGTCTTC
	R CTGCTTCAGGTAGGGCTTTG
IL21	F GAGGACCCTTGTCTGTCTGG
	R TCATCTTTTGAAGAAGCCATTT
IL9	F TGATTGTACCACACCGTGCT
	R AGGTCACTCCAACGATACGG

3.15. Tabla de anticuerpos utilizados en este estudio

Anticuerpo primario	Fluorocromo	N° Cat	Anticuerpo secundario	Fluorocromo	N° Cat
anti-CD134 / OX40	FITC green	ab33998			
anti-CCL20/MIP3 alpha		Bs-1268R	anti-conejo (H+L)	IgG Alexa 647	Fluor® A-21247
anti-Neutrophil [7/4]	FITC	ab53453			
CCL11/Eotaxin Antibody		MAB420	anti-rata (H+L)	IgG Alexa 633	Fluor® A21094
anti-Dcamk11 antibody		Ab31704	anti-conejo (H+L)	IgG Alexa 647	Fluor® A21245
anti- CD138		142502	¹ anti-rata (H+L)	IgG Alexa 633	Fluor® A21094
			² anti-rata IgG	FITC	F-6258
anti-mCCL2/JE/MCP-1		AF-479-NA	anti-cabra IgG	Alexa 594	Fluor® ab150132
anti-mCCL17/TARC		AF-529	anti-cabra IgG	Alexa 594	Fluor® ab150132
anti-GRO/ CXCL1		ab-17882	anti-conejo IgG	FITC	F-0382
Anti-IL17		Ab-79056	anti-conejo IgG	FITC	F-0382
Anti-CxCL15/Lungkine		AF-442	anti-conejo IgG	FITC	F-0382
Lectina					
Lectina de germen de trigo (WGA)	FITC	L4895			

¹ En el experimento con el nematodo *T. muris* para revelar el anticuerpo primario anti-CD138 se utilizó un anticuerpo secundario frente a rata marcado con Alexa fluor® 633 con número de catálogo A21094.

² En el experimento con el nematodo *A. tetráptera* para revelar el anticuerpo primario anti-CD138 se utilizó un anticuerpo secundario frente a rata marcado con FITC con referencia F-6258.

4. RESULTADOS

4. Resultados

4.1. Estudio *in silico* de la secuencia del péptido rPP2A

Gracias al conocimiento de la secuencia de aminoácidos correspondiente al péptido rPP2A y como se ha descrito anteriormente, se realizó un estudio bioinformático para conocer *in silico* a fin de estudiar la molécula antigénica con la que se hicieron los ensayos y que facilitaron la interpretación de los resultados finales. Para ello se requirió de la herramienta *ProtParam* del portal de Investigación Bioinformática (*Expasy*), que nos permite el cálculo de varios parámetros físicos y químicos para una determinada secuencia de aminoácidos.

En función de este análisis se permitió conocer que el péptido rPP2A estaba compuesto por 82 aminoácidos (el porcentaje de cada aminoácido en la secuencia y la secuencia total del péptido se puede ver en figura 4.1A), de los cuales 6 aminoácidos presentaron carga negativa (*Asp* + *Glu*) y 9 de los aminoácidos presentaron carga positiva (*Arg* + *Lys*). El peso molecular teórico del péptido fue de 9624.1 Da y un punto isoeléctrico teórico (pI) de 9.3. En la figura 4.1B se representa la información que aportó la herramienta bioinformática acerca de la proporción de átomos de los que estaba compuesto el péptido recombinante. El coeficiente de extinción fue de 4595 aunque al no tener ningún *Trp* se asumió un error de más del 10 % en este dato. Otro dato interesante a la hora de expresar la proteína recombinante es el índice de vida media y el de inestabilidad. *In vivo*, en bacterias la vida media es de más de 10 horas y el índice de inestabilidad es de 34.32, ambos índices clasificaron a la proteína como una proteína estable para trabajar con ella. Para saber si el rPP2A era hidrofóbico según su secuencia de aminoácidos era necesario conocer el índice GRAVY ("Grand average of hydropathicity"), este valor fue de -0.173, por lo que podemos decir que el péptido rPP2A no es hidrofóbico según su composición.

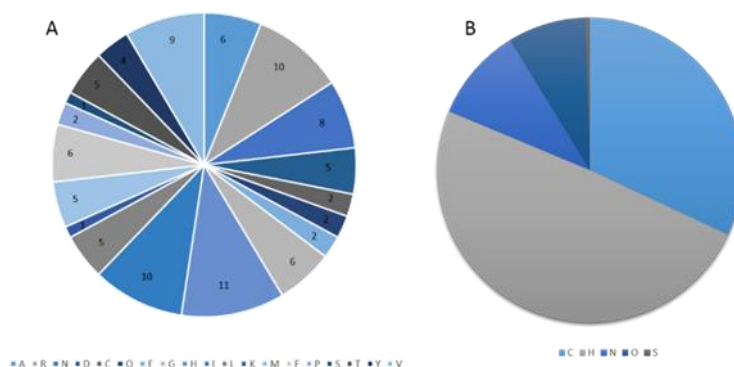


Figura 4.1. (A) Porcentaje de cada aminoácido que compone la secuencia del péptido rPP2A. (B) Número de átomos de C, H, N, O y S que forman parte de la molécula rPP2A.

Con el fin de que el péptido rPP2A pudiera actuar como vacuna polivalente se dio a conocer la homología de la secuencia del péptido frente a otras especies de nematodos, y en especial frente al parásito de estudio, *Trichuris*, en concreto de las especies, *T. suis* y *T. trichiura*. Se procedió a la realización de un alineamiento múltiple de la región catalítica de la PP2A de estos nematodos parásitos con respecto a nuestra secuencia de rPP2A utilizando la herramienta bioinformática *Clustal W* (figura 4.2), y así ver la existencia de homología en varias especies de gusanos.

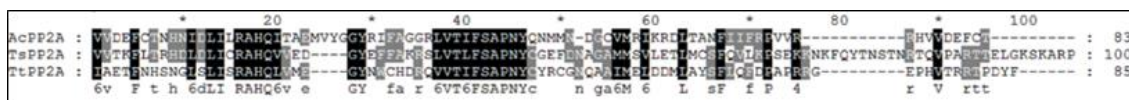


Figura 4.2. Alineamiento múltiple de la secuencia de la región catalítica de *A. costaricensis* PP2A con diferentes especies de *Trichuris*. En negro se indican las posiciones con el 100 % de residuos conservados, mientras que en una escala de gris decreciente representa la disminución de la conservación. Ac, *Angiostrongylus costaricensis*; Ts, *Trichuris suis*; Tt, *Trichuris trichiura*.

4.2. Obtención de la proteína recombinante

La proteína recombinante se obtuvo a partir de un cultivo de *E. coli*, previamente se transformó la bacteria con el inserto de la proteína PP2A, clonada en el vector de transformación pQE31 que era capaz de expresar dicho gen de la proteína recombinante, rPP2A.

Tras ser inducidos los cultivos bacterianos y luego lisados, se siguió el protocolo de purificación de cuerpos de inclusión que consiste en centrifugaciones a alta velocidad

(12000 x g) y la proteína de interés se encontró en el botón en forma de cuerpos de inclusión, como se muestra en la figura 4.3. La proteína rPP2A se purificó empleando una columna de cromatografía de afinidad de sefarosa ligada a Ni^{2+} (GE Healthcare Life Sciences 11-0004-58), en la que se unirían las proteínas recombinantes a través de la cola de histidina al níquel de la columna como se ha descrito en Material y Métodos, y se estudió en un gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 20%, confirmándose mediante western-blot que se trataba de la proteína recombinante buscada.

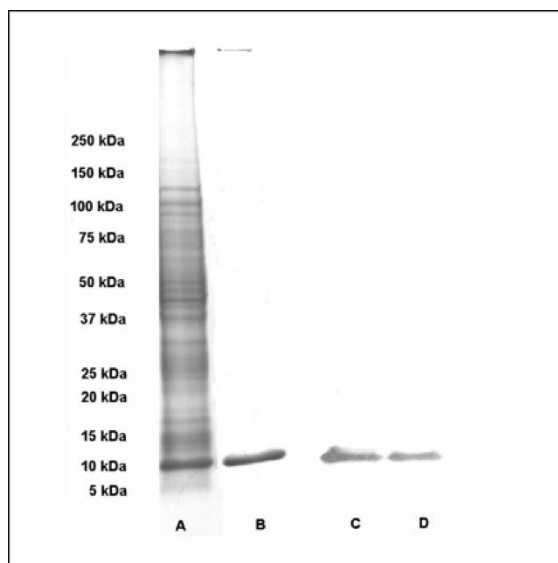


Figura 4.3. Análisis SDS-PAGE y western-blot de la proteína rPP2A. Línea A, proteínas pertenecientes a la purificación de los cuerpos de inclusión; línea B, banda que corresponde al péptido rPP2A después de la purificación por cromatografía de afinidad por el Ni^{2+} ; línea C y D, reconocimiento de la rPP2A por el inmunosuero.

La figura 4.3, nos muestra una banda de aproximadamente 10 kDa que corresponde a la proteína de trabajo, es visible en la línea que corresponde a la purificación por cuerpos de inclusión donde también aparecen otras bandas correspondientes a proteínas de la bacteria transformada, como en la línea correspondiente a la purificación por afinidad donde ya han sido eliminadas por concentraciones crecientes de imidazol, las proteínas específicas y propias de la bacteria. El inmunosuero, reconoció a dicha proteína a un título de 1:3000, e igualmente también fue capaz de reaccionar frente a la banda de aproximadamente 10 kDa mediante western-blot.

4.3. Lipopéptido

En la figura 4.4 se muestra el espectro de masas del péptido recombinante, purificado por la columna de afinidad, ligado al oleico vinil sulfona (OVS) y donde se aprecia la señal a 11157 Da correspondiente al péptido libre rPP2A ligado a la cola de histidinas y las señales a 11599, 12039, 12485, 12930 y 13380 Da corresponderían con 1, 2, 3, 4 y 5 adiciones de moléculas de OVS al rPP2A, respectivamente.

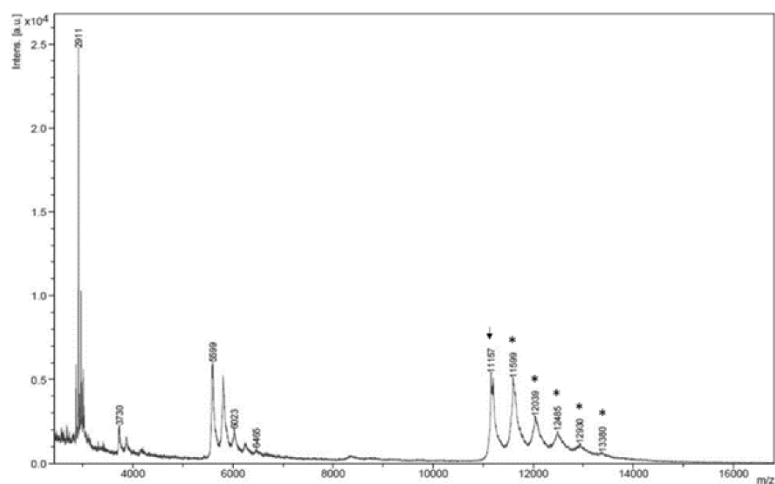


Figura 4.4. Análisis MALDI-TOF-MS del péptido rPP2A (marcado con una flecha) y del péptido rPP2A con 1, 2, 3, 4 y 5 adiciones de OVS respectivamente (marcados con asterisco).

El éxito de los lipopéptidos como adyuvantes ha sido ratificado por numerosos autores [344] pudiendo deberse a la capacidad de agregarse como micelas, agregaciones o partículas, lo que incrementa la inmunogenicidad del péptido, o la eficiencia de la presentación antigénica. En este sentido las imágenes de microscopía electrónica por tinción negativa de la suspensión de la rPP2A ligado al OVS aparecen en la figura 4.5A. En ella se aprecia como la suspensión del lipopéptido aparece formando micelas de 46.66 ± 6.40 nm de diámetro. Mientras que en la figura 4.5B muestra el rPP2A purificado en una suspensión de PBS con la formación de agregados como consecuencia de su baja solubilidad en medios acuosos.

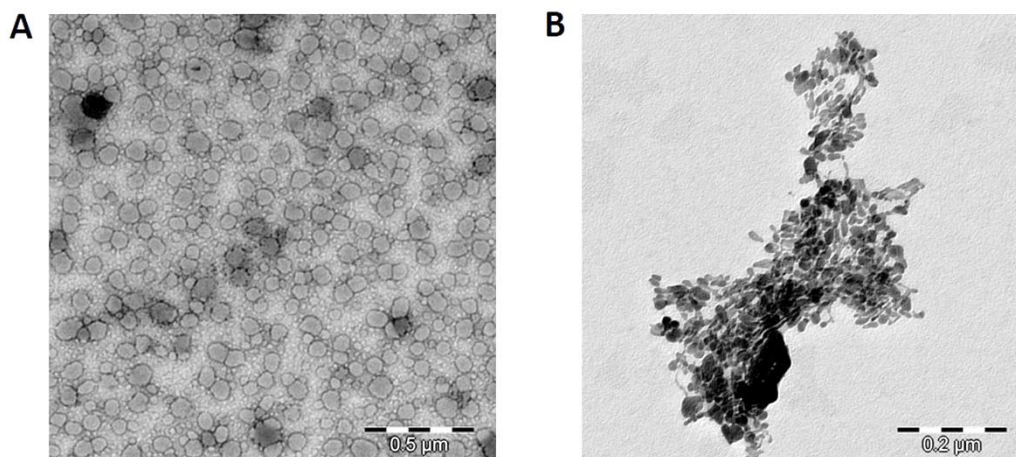


Figura 4.5. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión, tinción negativa. (A) Microscopía electrónica de micelas formadas después de la funcionalización de rPP2A-OVS, (B) rPP2A en suspensión acuosa.

4.4. Evaluación de la carga parasitaria, determinación de nivel de interleucinas y observación de cambios en la mucosa intestinal de ratones infectados por *A. tetraptera*

4.4.1. Ensayo con ratones inmunizados con rPP2A y rPP2A junto a Paredes Bacterianas (rPP2A-PB)

4.4.1.1. Evaluación de la carga parasitaria

Para evaluar la carga parasitaria en los ratones se contó el número de vermes en el intestino una vez fueron sacrificados. El número medio de gusanos recuperados en el grupo inmunizado con rPP2A fue de 2.6, mientras en el grupo no inmunizado fue de 13.8 el número medio de gusanos recuperados. Por tanto, la tasa de reducción de la infección de los ratones infectados con el nematodo *A. tetraptera* fue de 84.15 %.

4.4.1.2. Determinación de la expresión de interleucinas por PCR cuantitativa en tiempo real en órganos linfoides de ratón

Como ya se ha hablado en el apartado de Material y Métodos se procedió a diseñar un ensayo de inducción de la respuesta inmune por inoculación intranasal con el péptido recombinante PP2A con el posterior reto de infección con el nematodo.

La respuesta inmunológica, provocada en los grupos de ratones experimentales, se estudió mediante la cuantificación de los niveles de expresión de las diferentes

interleucinas en órganos linfoides de ratón mediante PCR cuantitativa en tiempo real. Como recuerdo del apartado de Material y Métodos, los grupos de ratones utilizados fueron, un grupo de ratones Control no infectado (C), un grupo Control Infectado con *A. tetraoptera* (CI), un grupo experimental inmunizado con rPP2A no infectado (rPP2A) y por último un grupo de ratones inmunizado previamente con rPP2A y posteriormente infectado con *A. tetraoptera* (rPP2A-I).

Los órganos linfoides elegidos para el análisis fueron bazo, nódulos linfáticos mesentéricos (NLM) y placas de Peyers (PPs). Los niveles de expresión de las interleucinas estudiadas fueron: IL-2, INF- γ , IL-12, IL-15, IL-6, TNF- α , IL-4, IL-10, IL-13, TGF- β , IL-17, IL-23, IL-25, IL-21 e IL-9.

Los resultados de los niveles de expresión de interleucinas en bazo se representan en la figura 4.6. De dichos resultados se deduce que los niveles más altos de expresión (***) fueron para la IL-4 e IL-15 en el grupo CI, seguidos por los niveles de expresión de las interleucinas IL-2, IL-25 e IL-21 en el grupo inmunizado con rPP2A, fue destacable también el grupo rPP2A por los elevados niveles de INF- γ , IL-12, TNF- α e IL-13. En el caso de la IL-25 se obtuvo igual nivel de expresión en el grupo rPP2A que en el grupo rPP2A-I. Las diferencias de expresión por parte de TGF- β no fueron significativas (ns) en ninguno de los grupos experimentales.

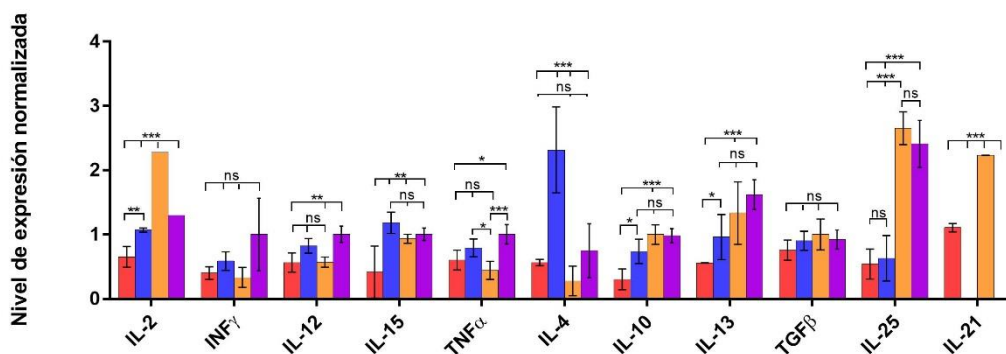


Figura 4.6. Determinación por PCR cuantitativa en tiempo real de niveles de expresión normalizada de interleucinas en bazo, de los diferentes grupos de ratones inmunizados. La barra roja es para el grupo Control (C), la barra azul es para el grupo de ratones Control Infectado con *A. tetraoptera* (CI), la barra naranja es para ratones inmunizados con rPP2A y la barra morada es para ratones inmunizados con rPP2A e infectados con *A. tetraoptera* (rPP2A-I). Los valores son la media de la expresión normalizada y la desviación estándar. El análisis estadístico usado fue *Tukey-kramer*, $p < 0.001$ (***) , $p < 0.01$ (**) y $p < 0.05$ (*).

Los resultados que corresponden a la cuantificación del nivel de interleucinas en los NLM (figura 4.7) de los diferentes grupos de ratones fueron destacables siendo a su vez muy significativos (***) los niveles de IL-23 en los grupos de ratones CI y rPP2A seguidos de los elevados niveles de IL-25 en los grupos rPP2A y rPP2A-I. Los ratones inmunizados con rPP2A mostraron niveles altos para el INF- γ , IL-15, IL-6, e IL-4 mientras que los ratones inmunizados con rPP2A e infectados con *A. tetraptera* (rPP2A-I) tuvieron niveles altos en la expresión de las interleucinas, IL-2, IL-13 y el TGF- β . Es de destacar el grupo de los ratones Control Infectado donde los niveles de expresión elevados fueron para las interleucinas relacionadas con la respuesta inmunológica Th2 como son la IL-4, IL-10 e IL-13.

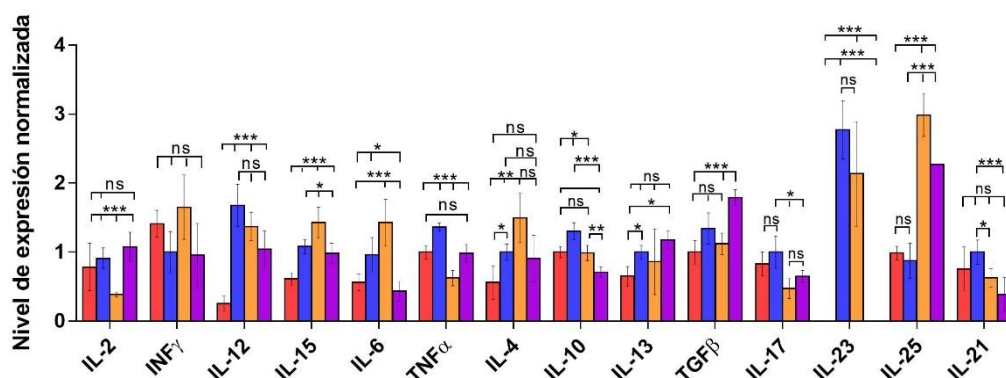


Figura 4.7. Determinación por PCR cuantitativa en tiempo real de niveles de expresión normalizada de interleucinas en NLM de los diferentes grupos de ratones inmunizados. La barra roja es para el grupo Control (C), la barra azul es para el grupo de ratones Control Infectado con *A. tetraptera* (CI), la barra naranja es para ratones inmunizados con rPP2A y la barra morada es para ratones inmunizados con rPP2A e infectados con *A. tetraptera* (rPP2A-I). Los valores son la media de la expresión normalizada y la desviación estándar. El análisis estadístico usado fue *Tukey-kramer*, $p < 0.001$ (***) , $p < 0.01$ (**) y $p < 0.05$ (*).

Los resultados obtenidos en las PPs (figura 4.8), fueron superiores considerando que es el tejido linfóide donde los niveles de interleucinas se expresaron de manera más elevada. Se destacaron los niveles de expresión de IL-25 e IL-9 en el grupo de ratones rPP2A-I seguido de los niveles significativos para las interleucinas IL-21, IL-23, IL-17 e IL-12 en el grupo CI. En el grupo inmunizado con rPP2A los niveles de expresión más elevados fueron en las interleucinas IL-9, IL-13, IL-10, TNF- α , e IL-15, la expresión de estas mismas interleucinas en el grupo CI mostraron valores más bajos respecto al grupo rPP2A.

Los niveles de expresión para el grupo Control (C) fueron muy bajos (*) en todas las interleucinas menos en el caso de la IL-10 donde apareció un aumento del nivel de expresión muy significativo (***) con respecto a los demás grupos de ratones.

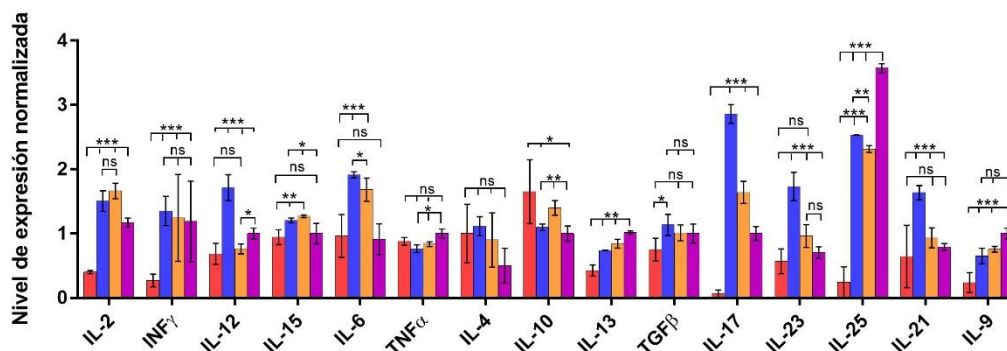


Figura 4.8. Determinación por PCR cuantitativa en tiempo real de niveles de expresión normalizada de interleucinas en bazo de los diferentes grupos de ratones inmunizados. La barra roja es para el grupo Control (C), la barra azul es para el grupo de ratones Control Infectado con *A. tetraptera* (CI), la barra naranja es para ratones inmunizados con rPP2A y la barra morada es para ratones inmunizados con rPP2A e infectados con *A. tetraptera* (rPP2A-I). Los valores son la media de la expresión normalizada y la desviación estándar. El análisis estadístico usado fue *Tukey-kramer*, $p < 0.001$ (***) , $p < 0.01$ (**) y $p < 0.05$ (*).

4.4.2. Ensayo con ratones anti-IL-23^{mAB}

4.4.2.1. Evaluación de la carga parasitaria en ratones anti-IL-23^{mAB} e infectados con *A. tetraptera*

Los dos grupos de ratones que fueron infectados con *A. tetraptera*, tal y como se explicó en Material y Métodos, fueron CI y anti-IL-23^{mAB}-I. Para el grupo de ratones CI la tasa de infección fue del 80 % con una tasa de gusanos recuperados de 10.7, mientras que en el grupo anti-IL-23^{mAB}-I el porcentaje de infección fue del 20 % y la tasa de recuperación de 0.5. Por tanto podemos decir que el porcentaje de protección en los ratones donde la IL-23 se neutralizó fue del 93.3 %, con respecto a los ratones control (datos suministrados por la Dra. María Trelis).

4.4.2.2. Determinación de la expresión de interleucinas por PCR cuantitativa en tiempo real en órganos linfoides de ratón

En este punto se muestran los resultados de niveles de expresión correspondientes a cada interleucina en los grupos de ratones donde se inocularon anticuerpos frente a la IL-23 (anti-IL-23^{mAB}). Los mRNA utilizados como se ha especificado en Material y Métodos para el análisis fueron procedentes de bazo, NLM y PPs. De igual manera, también como se especifica en Material y Métodos los grupos de ratones donde se compararon dichos niveles de expresión fueron: C (Control), CI (Control Infectado con *A. tetraoptera*), tratados con el anticuerpo monoclonal anti-IL-23 (anti-IL-23^{mAB}) e infectados con *A. tetraoptera* (anti-IL-23^{mAB}-I) y anti-IL-23^{mAB} sin infectar (anti-IL-23^{mAB}-C).

Las interleucinas elegidas para el análisis asociadas a una u otra respuesta inmune fueron: IL-2, INF- γ , IL-12, IL-15, IL-6, TNF- α , IL-4, IL-10, TGF- β , IL-17, IL-23, IL-25, IL-21 e IL-9.

En los resultados obtenidos se aprecia como los niveles de IL-23 en los ratones anti-IL-23^{mAB} son significativamente más bajos que en los grupos de ratones control (C y CI) y obteniéndose este resultado en los tres órganos analizados, como bazo representado en la figura 4.9, NLM representado en la figura 4.10 y PPs representado en la figura 4.11.

El nivel de expresión de interleucinas en el bazo se muestra en la figura 4.9 donde se puede apreciar que en el grupo CI hubo un aumento de IL-4 e IL-10 propias de una respuesta Th2, mientras que el INF- γ , TNF- α son significativamente más bajos que en el resto de los grupos estudiados. Los niveles de IL-17 e IL-21 fueron muy bajos en los ratones tratados con anti-IL-23^{mAB}. Los valores de IL-15 e IL-6 fueron altamente significativos en los grupos anti-IL-23^{mAB}-I y en anti-IL-23^{mAB}-C con respecto al grupo C y CI. Los valores de expresión de TGF- β no fueron significativos entre los diferentes grupos. También se puede destacar que en las IL-2 e IL-12 los niveles de expresión fueron significativos dos a dos, siendo significativos los grupos control con respecto a los ratones anti-IL-23^{mAB}. Con respecto a la IL-2 los valores de expresión fueron más altos en el grupo Control (C), mientras que en IL-12 los valores más elevados los encontramos en los ratones donde la IL-23 está neutralizada (anti-IL-23^{mAB}-I y anti-IL-23^{mAB}-C). Los niveles de IL-25 fueron significativamente más elevados en el grupo CI mientras se mantienen en los grupos C, y en el anti-IL-23^{mAB}, estos resultados

concuerdan con la intensidad de fluorescencia que muestran las células Tuft como veremos más adelante.

La expresión de IL-13, es muy baja en el grupo C pero más elevada en los grupos CI y anti-IL-23^{mAB}-C aunque el grupo anti-IL-23^{mAB}-I presenta un nivel de expresión sutilmente más bajo que los dos grupos descritos anteriormente.

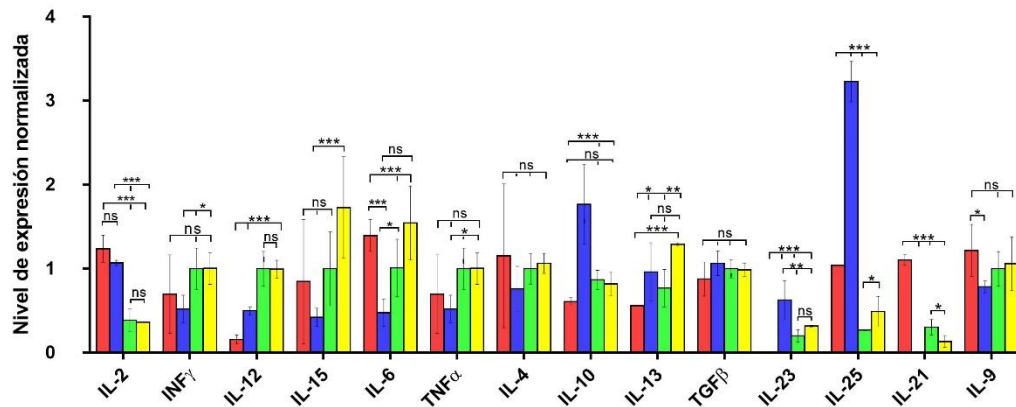


Figura 4.9. Determinación por PCR cuantitativa en tiempo real de niveles de expresión normalizada de interleucinas en bazo de los diferentes grupos de ratones. La barra roja es para el grupo Control (C), la barra azul es para el grupo de ratones Control Infectado con *A. tetraptera* (CI), la barra verde es para ratones donde se neutralizó la IL-23 y se infectaron con *A. tetraptera* (anti-IL-23^{mAB}-I) y la barra amarilla para ratones donde se neutralizó la IL-23 pero no fueron infectados (anti-IL-23^{mAB}-C). Los valores son la media de la expresión normalizada y la desviación estándar. El análisis estadístico usado fue *Tukey-kramer*, $p < 0.001$ (***) , $p < 0.01$ (**) y $p < 0.05$ (*).

En NLM los niveles de expresión de interleucinas se representan en la figura 4.10 donde se observó que en los grupos de ratones anti-IL-23^{mAB} siguen mostrando valores significativamente más bajos de IL-17 mientras que la IL-21 mostró unos niveles de expresión significativamente más altos, a diferencia de lo que acontece en bazo, donde no hay un aumento de expresión significativo por parte de la IL-6 en el grupo de ratones anti-IL-23^{mAB}-I.

El mismo aumento muy significativo, en el grupo anti-IL-23^{mAB}-C con respecto a los grupos C, CI y anti-IL-23^{mAB}-I, ocurre con las IL-25, IL-9 e IL-13 cuando los niveles de expresión de IL-23 son prácticamente inexistentes.

En el grupo de ratones Control Infectado (CI) las interleucinas que presentaron niveles de expresión significativamente más elevados ($p > 0.001$) con respecto a los

demás grupos experimentales (C, anti-IL-23^{mAB}-C y anti-IL-23^{mAB}-I) fueron, las interleucinas IL-2, INF- γ , IL-12, TNF- α . En el grupo de ratones Control que no ha sido infectado con *A. tetraptera* (C), el nivel de IL-12, IL-15, IL-6 y TNF- α presentaron niveles significativamente muy bajos ($p > 0.001$) cuando lo comparamos con los demás grupos.

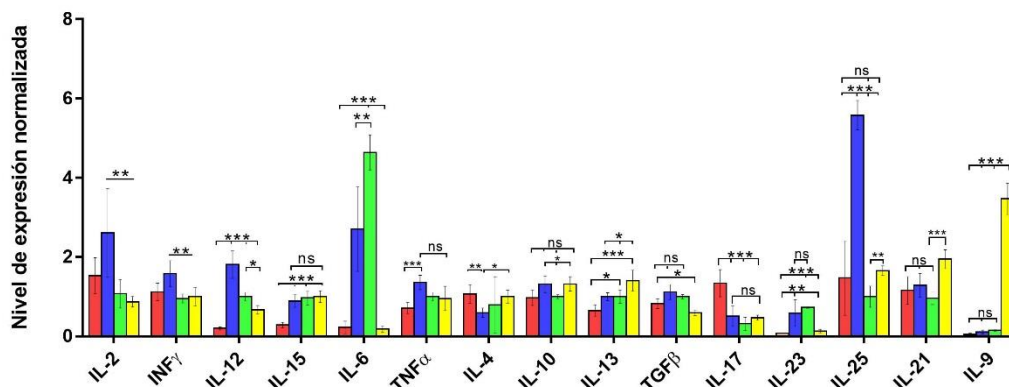


Figura 4.10. Determinación por PCR cuantitativa en tiempo real de niveles de expresión normalizada de interleucinas en NLM de los diferentes grupos de ratones. La barra roja es para el grupo Control (C), la barra azul es para el grupo de ratones Control Infectado con *A. tetraptera* (CI), la barra verde es para ratones donde se neutralizó la IL-23 y se infectaron con *A. tetraptera* (anti-IL-23^{mAB}-I) y la barra amarilla para ratones donde se neutralizó la IL-23 pero no fueron infectados (anti-IL-23^{mAB}-C). Los valores son la media de la expresión normalizada y la desviación estándar. El análisis estadístico usado fue *Tukey-kramer*, $p < 0.001$ (***), $p < 0.01$ (**) y $p < 0.05$ (*).

Los resultados obtenidos para el nivel de expresión de interleucinas en PPs se representan en la figura 4.11. Se pueden destacar en el grupo de ratones Control sin infectar (C) niveles positivamente significativos ($p > 0.001$), con respecto a los demás grupos, de IL-6, IL-15, IL-23, INF- γ .

Si observamos los niveles de expresión de IL-9, el mayor nivel de expresión ($p > 0.001$) lo encontramos en el grupo control (CI), y en el grupo anti-IL-23^{mAB}-I, mientras que en los grupos C y anti-IL-23^{mAB}-C el nivel de expresión es despreciable. En el grupo de ratones Control Infectado (CI) se observan niveles de expresión altos de las interleucinas IL-17, IL-21 e IL-12, con niveles de expresión de TGF- β muy estables en todos los grupos, siendo significativo ($p < 0.01$) en el grupo anti-IL-23^{mAB}-C. Los niveles de IL-4 en el grupo anti-IL-23^{mAB}-I son significativamente más altos con respecto a los otros tres grupos de ratones utilizados en el experimento, similar a lo que

ocurre con la IL-10, aunque el nivel de expresión es menor en el grupo anti-IL-23^{mAB}-I y no muestran diferencias entre los grupos C, CI y anti-IL-23^{mAB}-C. En PPs los niveles de expresión de IL-25 e IL-13 muestran un comportamiento similar al observado en bazo y NLM. Los niveles de IL-25 son altamente significativos (***) en el grupo C y los niveles de IL-13 disminuyen en este grupo y aumentan en los grupos de ratones tratados con el anti-IL-23^{mAB}.

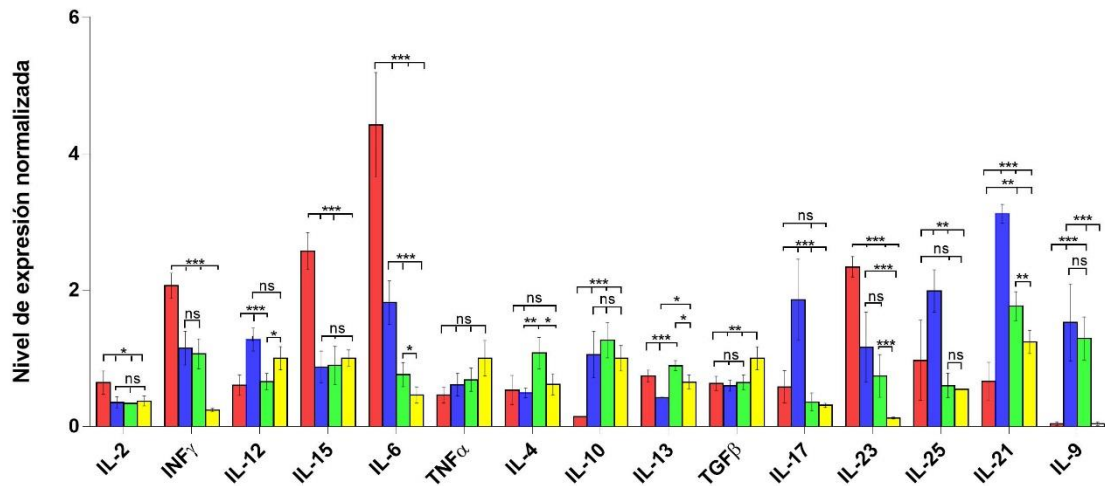


Figura 4.11. Determinación por PCR cuantitativa en tiempo real de niveles de expresión normalizada de interleucinas en PPs de los diferentes grupos de ratones. La barra roja es para el grupo Control (C), la barra azul es para el grupo de ratones Control Infectado con *A. tetraptera* (CI), la barra verde es para ratones donde se neutralizó la IL-23 y se infectaron con *A. tetraptera* (anti-IL-23^{mAB}-I) y la barra amarilla para ratones donde se neutralizó la IL-23 pero no fueron infectados (anti-IL-23^{mAB}-C). Los valores son la media de la expresión normalizada y la desviación estándar. El análisis estadístico usado fue *Tukey-kramer*, $p < 0.001$ (***), $p < 0.01$ (**) y $p < 0.05$ (*).

4.4.2.3. Cuantificación de cambios en la mucosa intestinal mediante microscopía láser confocal

El estudio mediante microscopía láser confocal de los cambios que acontecen en la mucosa intestinal en los diferentes grupos de animales tras el tratamiento con el anticuerpo monoclonal anti-IL-23, se describen a continuación.

En este sentido se han usado diferentes marcadores capaces de localizar las zonas ricas en glicoproteínas y por tanto zonas ricas en muco utilizando la lectina de germen de trigo (WGA), un anticuerpo anti-IL-17, y anticuerpos frente a las citoquinas CCL2, CCL17, CXCL15, CCL20 y OX40. De igual manera se realizó un marcaje con anti-GRO (“Growth-regulated oncogene-alpha”) también denominado como CXCL1. Como marcadores específicos de células se usaron anticuerpos frente a CD138 que marca células plasmáticas y un anticuerpo anti-Dcamk11 marcador de las células Tuft. Para llevar a cabo las medidas de fluorescencia se midió la fluorescencia a nivel de toda la imagen, y se cuantificó el área ocupada en 4 mediciones de 100 μm^2 cada una, contándose el número de células fluorescente presentes.

El estudio de la expresión de la IL-17 se llevó a cabo tanto por PCR cuantitativa en tiempo real en bazo, NLM y PPs, como se ha mostrado anteriormente, así como mediante la inmunolocalización en las secciones finas de intestino mediante microscopía láser confocal con un anticuerpo anti-IL17, al objeto de localizar la presencia de esta interleucina directamente en los tejidos y no los niveles de expresión de mRNA que es lo que se determina en las técnicas moleculares antes descritas.

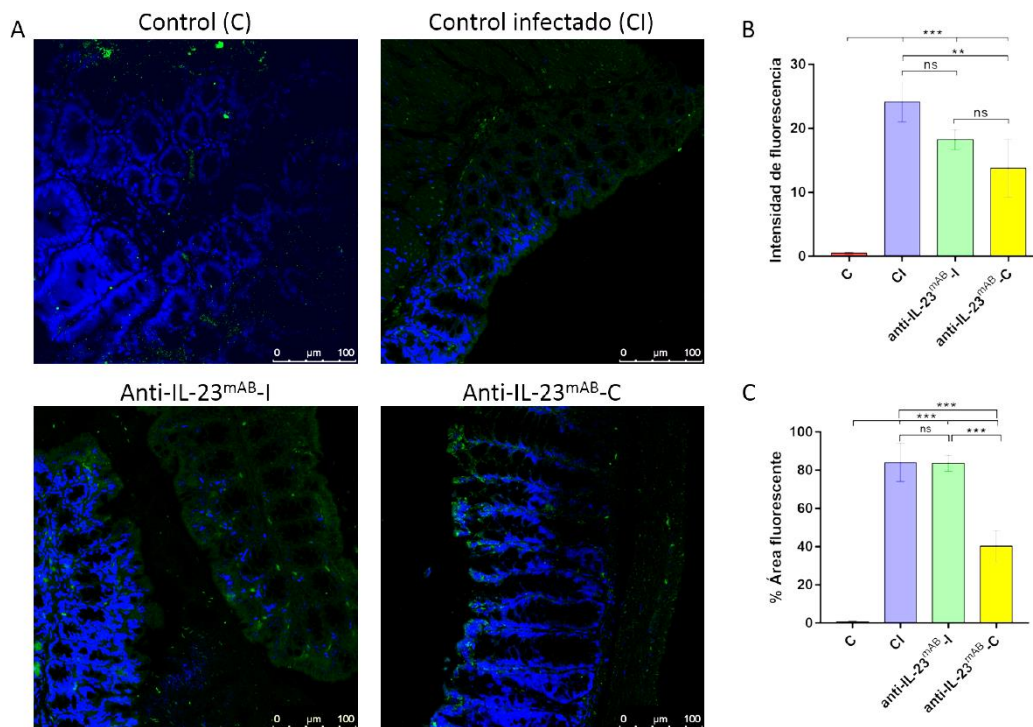


Figura 12. (A) Evaluación de la respuesta inmune frente a IL-17 en secciones finas de intestino de diferentes grupos de ratones mediante microscopía láser confocal revelado con un anticonejo IgG marcado con FITC. Los núcleos celulares se marcaron con DAPI (azul). (B) Cuantificación de la media de intensidad de fluorescencia frente a IL-17, obtenidas de cuatro mediciones de 100 μm^2 cada una en los diferentes grupos experimentales. (C) Porcentaje medio de área que presenta fluorescencia frente a IL-17 en las mismas mediciones de 100 μm^2 anteriormente mencionadas.

Cada barra representa la media de las mediciones con su respectiva desviación estándar. Las diferencias fueron estadísticamente muy significativas (***) cuando $p < 0.001$, significativas (**) cuando $p < 0.01$, poco significativas (*) cuando $p < 0.05$ y no significativas (ns) cuando $p > 0.05$ siguiendo el análisis estadístico de *Tukey-kramer*.

Los niveles de fluorescencia que se observaron en las secciones finas frente a IL-17 aparecen reflejados en la figura 4.12A. Donde se aprecia como la intensidad de fluorescencia casi no aparece en el grupo control (C). Los mayores niveles de intensidad se pudieron observar en los grupos de ratones infectados con *A. tetraoptera* (CI y anti-IL-23^{mAB}-I), seguido de un valor considerable de intensidad de fluorescencia para la IL-17 en el grupo no infectado y tratado con IL-23 (anti-IL-23^{mAB}-C). El análisis de los datos de las medidas de intensidad de fluorescencia fueron altamente significativos (***) entre los diferentes grupos.

De igual forma, los valores de intensidad de fluorescencia se representan en la figura 4.12B, siendo coincidentes con los valores de área fluorescente representados en la figura 4.12C. Las mayores áreas aparecen en los grupos de ratones infectados con el nematodo (CI y anti-IL-23^{mAB}-I) si bien no aparecieron diferencias significativas entre estos dos grupos.

Los resultados del estudio de la producción de muco a nivel de mucosa intestinal en secciones finas del intestino de los ratones de los diferentes grupos experimentales se reflejan en la figura 4.13A. La determinación del contenido de muco así como el área ocupada en las criptas intestinales se determinó, como se describió anteriormente mediante el uso de la lectina de germen de trigo (WGA) marcada con FITC.

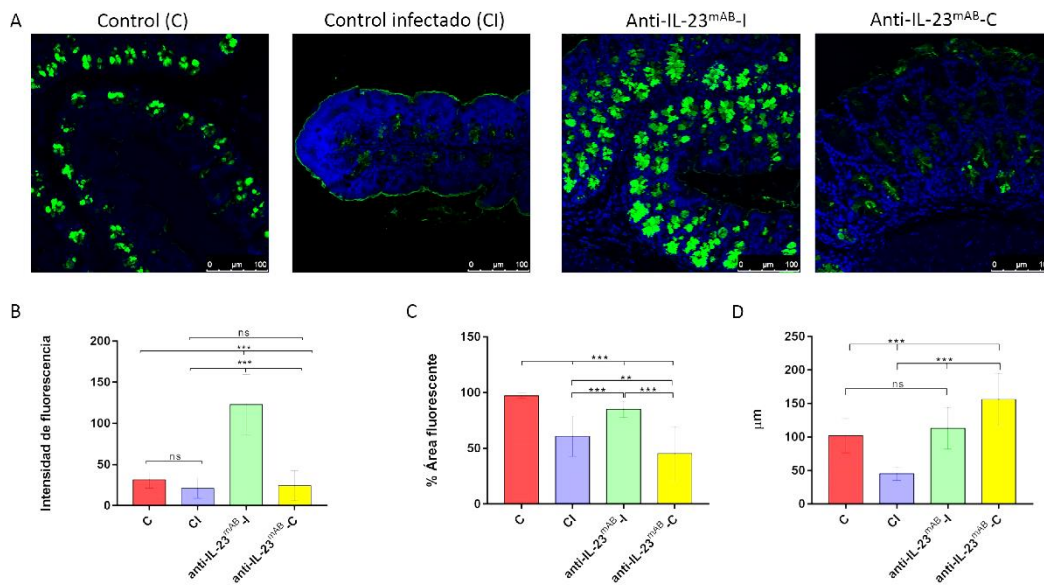


Figura 4.13. (A) Evaluación de la presencia de glicoproteínas componentes del muco de las criptas intestinales de los diferentes grupos evaluada mediante la lectina de germen de trigo (WGA) marcada con FITC (verde) en secciones finas de intestino de diferentes grupos de ratones por microscopía láser confocal. Los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul). (B) Cuantificación de la media de intensidad de fluorescencia frente a lectina de germen de trigo WGA en las criptas de la mucosa de colon que aparecen en las imágenes de microscopía láser confocal. (C) Porcentaje de área fluorescente reconocida por la lectina de germen de trigo (WGA) en las criptas de colon presentes en las imágenes de microscopía láser confocal. (D) Media del perímetro (µm) de dichas criptas en cada tratamiento.

Cada barra representa la media de las mediciones con su respectiva desviación estándar. Las diferencias fueron estadísticamente muy significativas (***) cuando $p < 0.001$, significativas (**) cuando $p < 0.01$, poco significativas (*) cuando $p < 0.05$ y no significativas (ns) cuando $p > 0.05$ siguiendo el análisis estadístico de *Tukey-kramer*.

Los niveles de intensidad de fluorescencia, figura 4.13B, fueron significativos (***) en el grupo anti-IL-23^{mAB}-I con respecto al grupo C, CI y anti-IL-23^{mAB}-C, mientras que el grupo CI no tuvo resultados significativos (ns) frente al grupo anti-IL-23^{mAB}-C, igual acontece con los valores de intensidad de fluorescencia entre los grupos C y CI que no fueron significativos (ns).

Los resultados de la medida del perímetro y porcentaje de área fluorescente correspondiente al contenido de muco de las criptas del intestino de los ratones de los diferentes grupos utilizados en el experimento, así como el muco que aparece en las mismas se representan en la figura 4.13C y D.

El mayor perímetro (***) se observa en el grupo anti-IL-23^{mAB}-C, seguido del grupo anti-IL-23^{mAB}-I, lo que indicaría la relación existente entre una respuesta inflamatoria Th17 y la producción de muco en el intestino. El grupo C y el CI, aunque las medidas de perímetro del grupo C y anti-IL-23^{mAB}-I fueron muy parecidas, y no resultaron significativas (ns). El mayor porcentaje de área fluorescente (***) se encuentra en el grupo C, seguido del grupo anti-IL-23^{mAB}-I, CI y anti-IL-23^{mAB}-C, siendo los valores de porcentaje de fluorescencia menos significativos (**) entre estos dos últimos grupos de los ratones usados en el experimento. Lo que podría indicar que la presencia del parásito, de una forma directa trata de reducir la producción de muco en las criptas y que esta se encuentra relacionada con una respuesta mediada por la IL-23.

Los resultados del marcaje en los diferentes grupos experimentales con el anticuerpo frente a la citoquina CCL2 se observan en la figura 4.14A. Para medir las diferencias entre unos grupos, se procedió a calcular el nivel de intensidad de fluorescencia en la imagen y el porcentaje de área ocupado en zonas de 100 μm^2 . Tal y como se ha descrito anteriormente. El marcaje en rojo corresponde a las zonas reconocidas por el anticuerpo frente al CCL2 y revelado con un anti-cabra IgG Alexa Fluor® 594 y en azul los núcleos de las células teñidas con DAPI.

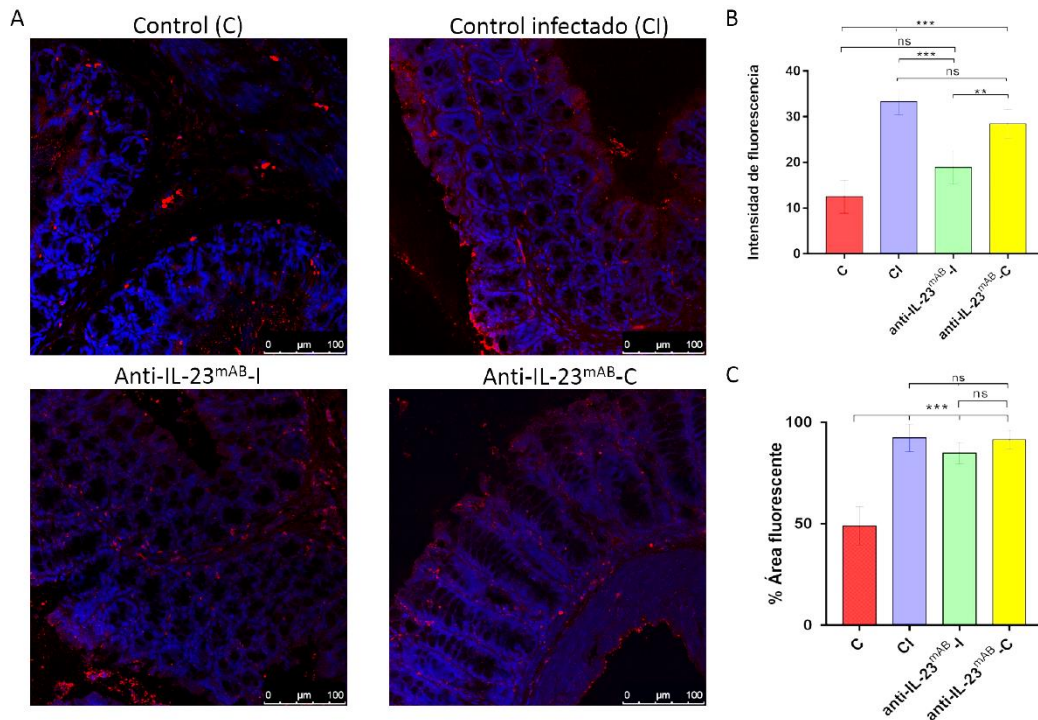


Figura 4.14. (A) Evaluación de la respuesta inmune frente a la citoquina CCL2 en secciones finas de intestino de diferentes grupos de ratones mediante microscopía láser confocal revelado con un anti-cabra IgG Alexa Fluor® 594 (rojo). Los núcleos celulares se marcaron con DAPI (azul). (B) Cuantificación de la media de intensidad de fluorescencia, de cuatro mediciones de $100 \mu\text{m}^2$ cada una, en las imágenes de microscopía láser confocal frente a la citoquina CCL2. (C) Porcentaje medio de área que presenta fluorescencia frente a CCL2 en las mismas mediciones de $100 \mu\text{m}^2$ anteriormente mencionadas.

Cada barra representa la media de las mediciones con su respectiva desviación estándar. Las diferencias fueron estadísticamente muy significativas (***) cuando $p < 0.001$, significativas (**) cuando $p < 0.01$, poco significativas (*) cuando $p < 0.05$ y no significativas (ns) cuando $p > 0.05$ siguiendo el análisis estadístico de *Tukey-kramer*.

Los mayores niveles de fluorescencia (figura 4.14B) se encuentran en el grupo Control Infectado (CI), seguido de los grupos de ratones donde se neutralizó la IL-23, anti-IL-23^{mAB}-C y anti-IL-23^{mAB}-I y por último el que menor intensidad de fluorescencia presenta es el grupo Control no infectado (C). Los resultados mostraron significación de $p < 0.001$ (***)

Los resultados de las medidas de las áreas fluorescentes, representados en la figura 4.14C muestran como las mayores áreas aparecen en el grupo CI seguido del grupo tratado con anti-IL-23^{mAB}-C y el grupo anti-IL-23^{mAB}-I, aunque los valores entre

CI y este último no presentaron diferencias significativas. El grupo que mostró menor área fluorescente fue el grupo C, con respecto a los otros tres grupos experimentales.

Las imágenes de las secciones finas de los diferentes grupos de animales a los que se les enfrentó el anticuerpo frente a la citoquina CCL17 aparecen reflejados a continuación en la figura 4.15A donde se aprecia que dicho marcaje aparece alrededor de las vellosidades.

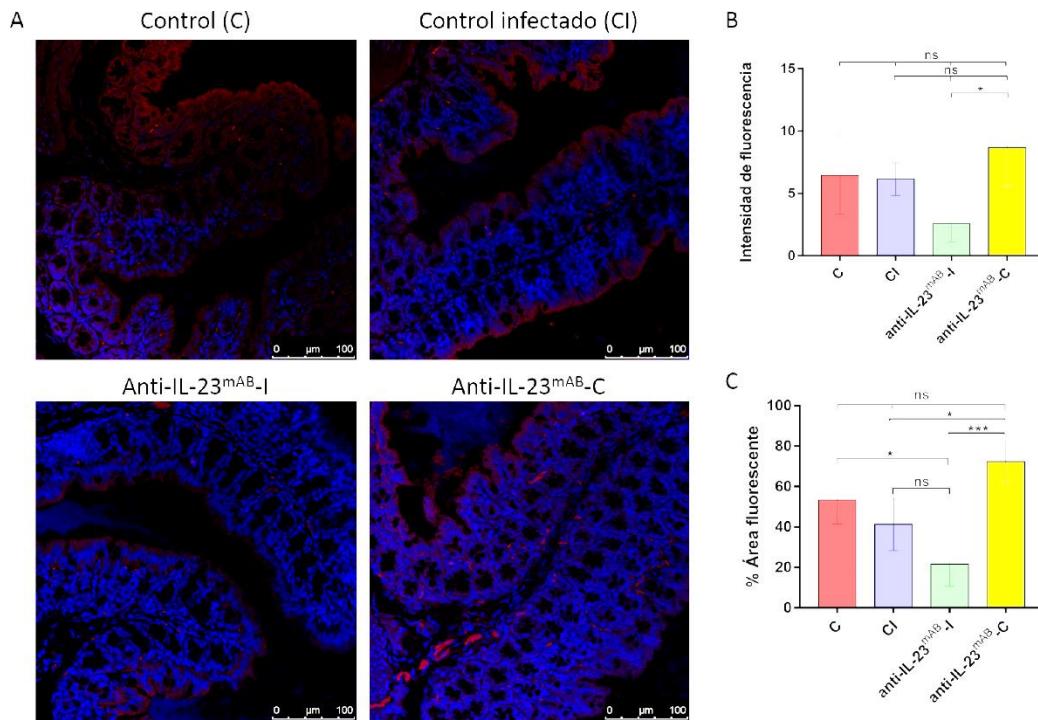


Figura 4.15. (A) Evaluación de la respuesta inmune frente a la citoquina CCL17 en secciones finas de intestino de diferentes grupos de ratones mediante microscopía láser confocal revelado con un anti-cabra IgG Alexa Fluor® 594 (rojo). Los núcleos celulares se marcaron con DAPI (azul). (B) Cuantificación de la media de intensidad de fluorescencia, en cuatro medidas de 100 μm² cada una, de las imágenes de microscopía láser confocal para la citoquina CCL17. (C) Porcentaje medio de área que presenta fluorescencia frente a CCL17 en las mismas mediciones de 100 μm² anteriormente mencionadas.

Cada barra representa la media de las mediciones con su respectiva desviación estándar. Las diferencias fueron estadísticamente muy significativas (***) cuando $p < 0.001$, significativas (**) cuando $p < 0.01$, poco significativas (*) cuando $p < 0.05$ y no significativas (ns) cuando $p > 0.05$ siguiendo el análisis estadístico de *Tukey-kramer*.

Los mayores niveles de intensidad de fluorescencia con el anti-CCL17 (figura 4.15B), aparecen en el grupo anti-IL-23^{mAB}-C, con niveles de significación de $p < 0.001$ (***) con respecto al grupo anti-IL-23^{mAB}-I, en el cual mostró el valor más bajo de intensidad, siendo también significativo (**) con respecto al grupo CI y poco significativo (*) con respecto al grupo C. Los valores de intensidad de fluorescencia medidos en los grupos C y CI no fueron significativos (ns) entre sí, pero ambos son significativos al compararlos con el grupo anti-IL-23^{mAB}-I.

Los valores de porcentaje del área fluorescente representados en la figura 4.15C, coinciden con los valores de intensidad de fluorescencia, con un mayor porcentaje de área fluorescente en el grupo anti-IL-23^{mAB}-C, seguido del grupo C y el CI, mientras que el valor más bajo aparece en el grupo anti-IL-23^{mAB}-I.

CXCL15 o también conocida como “Lungkine” se estudió en la mucosa intestinal con un anticuerpo anti-CXCL15 (figura 4.16). Esta citoquina se expresa principalmente en mucosas y en especial en pulmón, de aquí el nombre, y es un importante mediador de la migración de neutrófilos, el marcaje resultante fue de color verde dado que el fluorocromo usado para el revelado fue un anti-conejo IgG FITC. Dicha citoquina se localizó en la mucosa y en los bordes del intestino como se muestra en la figura 4.16A.

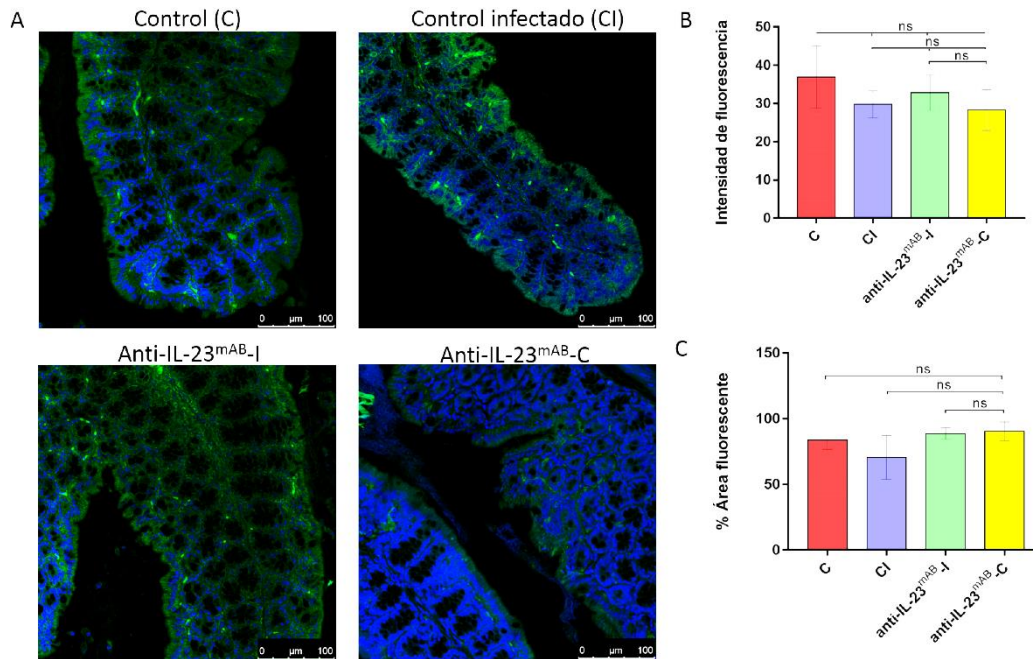


Figura 4.16. (A) Evaluación de la respuesta inmune frente a la citoquina CXCL15 en secciones finas de intestino de diferentes grupos de ratones mediante microscopía láser confocal revelado con un anti-conejo IgG FITC (verde). Los núcleos celulares se marcaron con DAPI (azul). (B) Cuantificación de la media de intensidad de fluorescencia, de cuatro mediciones de 100 μm² cada una, en las imágenes de microscopía láser confocal frente a la citoquina CXCL15. (C) Porcentaje medio de área que presenta fluorescencia frente a CXCL15 en las mismas mediciones de 100 μm² anteriormente mencionadas.

Cada barra representa la media de las mediciones con su respectiva desviación estándar. Las diferencias fueron estadísticamente muy significativas (***) cuando $p < 0.001$, significativas (**) cuando $p < 0.01$, poco significativas (*) cuando $p < 0.05$ y no significativas (ns) cuando $p > 0.05$ siguiendo el análisis estadístico de *Tukey-kramer*.

Los valores de intensidad de fluorescencia más elevados, cuando se evaluó la CXCL15, se encontraron en el grupo C, siendo significativos con respecto a los demás grupos (CI, anti-IL-23^{mAB}-I y anti-IL-23^{mAB}-C), mientras que estos grupos entre sí no mostraron diferencias significativas destacables (figura 4.16B).

Si hablamos de porcentaje de área ocupada, representado en la figura 4.16.C, no se encontraron diferencias significativas (ns) al comparar todos los grupos utilizados en el experimento.

Los niveles de fluorescencia para el OX40 se observan en la figura 4.17A donde la señal aparece preferentemente en el borde del “cepillo” de la mucosa y en el borde que limita las criptas, aunque a simple vista ya se puede apreciar que hay menos señal

en los grupos control (C y CI) que en los grupos donde la IL-23 está neutralizada (anti-IL-23^{mAB}-I y anti-IL-23^{mAB}-C).

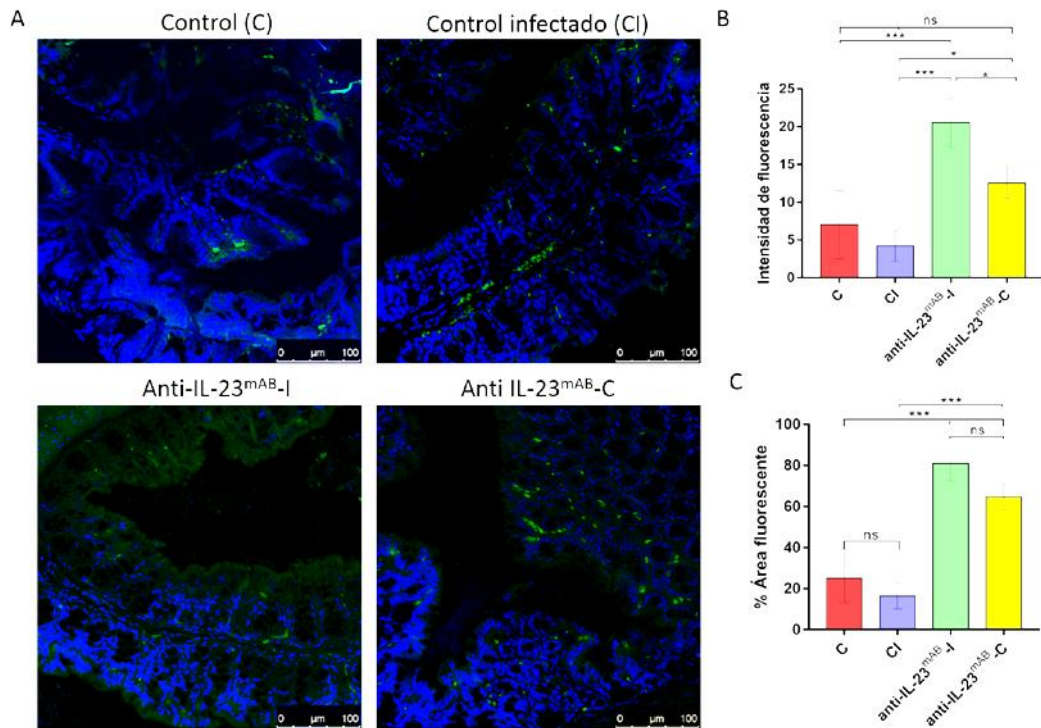


Figura 4.17. (A) Evaluación de la respuesta inmune frente al marcador OX40 en secciones finas de intestino de diferentes grupos de ratones mediante microscopía láser confocal con un anticuerpo anti-OX40 marcado con FITC (verde). Los núcleos celulares se marcaron con DAPI (azul). (B) Cuantificación de la media de intensidad de fluorescencia, de cuatro mediciones de 100 μm^2 cada una, en las imágenes de microscopía láser confocal frente a OX40. (C) Porcentaje medio de área que presenta fluorescencia frente a OX40 en las mismas mediciones de 100 μm^2 anteriormente mencionadas.

Cada barra representa la media de las mediciones con su respectiva desviación estándar. Las diferencias fueron estadísticamente muy significativas (***) cuando $p < 0.001$, significativas (**) cuando $p < 0.01$, poco significativas (*) cuando $p < 0.05$ y no significativas (ns) cuando $p > 0.05$ siguiendo el análisis estadístico de *Tukey-kramer*.

Los resultados del análisis de la intensidad de fluorescencia emitida por anti-OX40 se mostraron en la figura 4.17B, se puede observar que hay un aumento significativo de intensidad en el grupo anti-IL-23^{mAB}-I, seguido del grupo anti-IL-23^{mAB}-C, frente a los grupos control, C y CI.

Los resultados de porcentaje de área fluorescente, representados en la figura 4.17C, coinciden exactamente con los de intensidad de fluorescencia, siendo mayores en

los grupos donde está neutralizada la IL-23, de estos dos grupos fue mayor el grupo infectado con *A. tetraptera*. Y seguidos de los grupos control. Con un mayor porcentaje de área ocupada en el grupo Control no infectado (C) que en el grupo Control Infectado (CI).

Los niveles de expresión mostrados por la citoquina CCL20 en los diferentes grupos se muestran en la figura 4.18, la señal fluorescente aparece muy leve en los grupos de ratones no infectados, figura 4.18A.

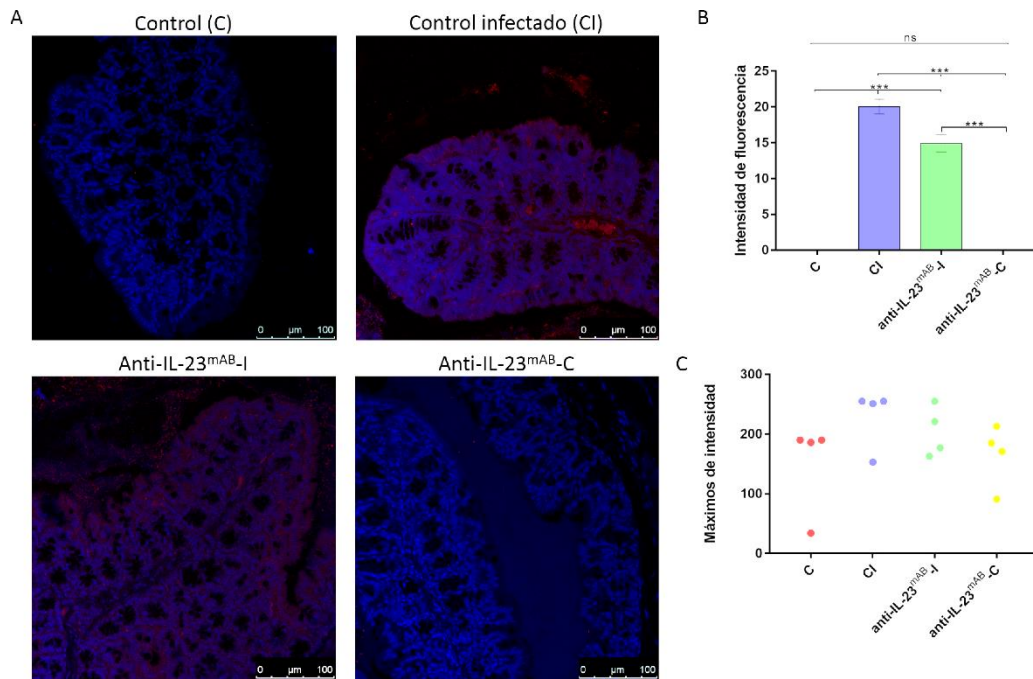


Figura 4.18. (A) Evaluación de la respuesta inmune frente a la citoquina CCL20 en secciones finas de intestino de diferentes grupos de ratones mediante microscopía láser confocal revelado con un anti-conejo IgG Alexa Fluor® 647. Los núcleos celulares se marcaron con DAPI (azul). (B) Cuantificación de la media de intensidad de fluorescencia, de cuatro mediciones de 100 μm^2 cada una, en las imágenes de microscopía láser confocal frente a la citoquina CCL20. (C) Cuatro puntos máximos de 0 a 256 de intensidad de fluorescencia en las mediciones de 100 μm^2 a cada grupo experimental.

Cada barra representa la media de las mediciones con su respectiva desviación estándar. Las diferencias fueron estadísticamente muy significativas (***) cuando $p < 0.001$, significativas (**) cuando $p < 0.01$, poco significativas (*) cuando $p < 0.05$ y no significativas (ns) cuando $p > 0.05$ siguiendo el análisis estadístico de *Tukey-kramer*.

Cuando medimos los niveles de intensidad de fluorescencia (figura 4.18B) sólo aparece señal en los grupos de ratones infectados, siendo significativamente (***) mayor en el grupo de ratones Control Infectado (CI) que en los ratones tratados con anti-IL-23^{mAB} (anti- IL-23^{mAB}-I).

También representamos gráficamente los valores máximos y los mínimos en la escala de grises de los valores de intensidad que aparecen en cada grupo de ratones para la CCL20. Con un máximo de 256 y un mínimo de 0. Como se aprecia en la figura 4.18C, los valores máximos corresponden a los grupos con mayor intensidad de fluorescencia (CI y anti- IL-23^{mAB}-I).

Los niveles de expresión de GRO (“Growth-regulated oncogene-alpha”), también denominado CXCL1 que participa en la atracción y acumulación de macrófagos a los lugares de inflamación formando parte de las denominadas “macrophage inflammatory proteins”, se midieron mediante un anticuerpo anti-GRO. La figura 4.19A muestra una acumulación de fluorocromo en color verde en los bordes de las vellosidades y alrededor de las criptas, detectando una intensidad de fluorescencia mayor en el grupo CI.

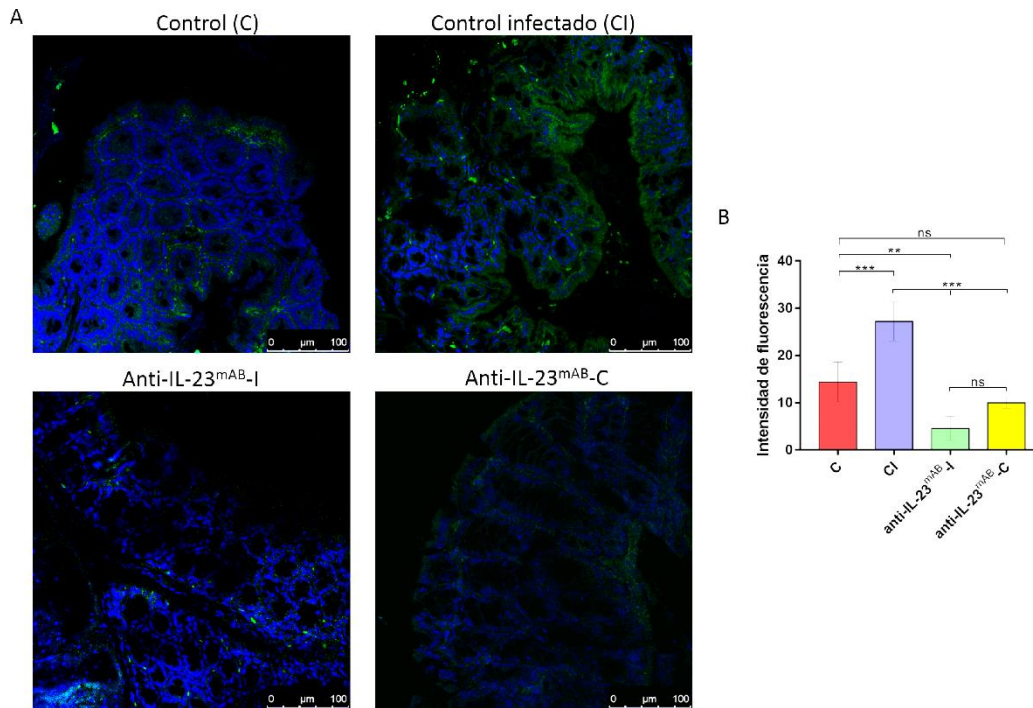


Figura 4.19. (A) Evaluación de la respuesta inmune frente a la citoquina GRO en secciones finas de intestino de diferentes grupos de ratones mediante microscopía láser confocal revelado con un anti-conejo IgG marcado con FITC (verde). Los núcleos celulares se marcaron con DAPI (azul). (B) Cuantificación de la media de intensidad de fluorescencia, de cuatro mediciones de $100 \mu\text{m}^2$ cada una, en las imágenes de microscopía láser confocal frente a la citoquina GRO. Cada barra representa la media de las mediciones con su respectiva desviación estándar. Las diferencias fueron estadísticamente muy significativas (***) cuando $p < 0.001$, significativas (**) cuando $p < 0.01$, poco significativas (*) cuando $p < 0.05$ y no significativas (ns) cuando $p > 0.05$ siguiendo el análisis estadístico de *Tukey-kramer*.

Las medidas de la intensidad de fluorescencia en cada grupo de ratones experimentales se representaron en la figura 4.19B y mostraron que, el máximo valor de intensidad de fluorescencia lo tiene el grupo CI seguido del grupo Control sin infectar (C). En los grupos de ratones donde la IL-23 está neutralizada se observó lo contrario, presentan el menor valor de intensidad el grupo infectado con respecto al grupo no infectado, presentando este último (anti-IL-23^{mAB}-C) valores de intensidad de fluorescencia más bajos que los dos grupos control (C y CI). Todos los grupos mostraron valores significativos entre ellos. Estos resultados mostrarían como la infección por *A. tetraptera* induce un proceso inflamatorio a nivel de la mucosa que se ve disminuido cuando se eliminó la acción de la interleucina inflamatoria IL-23. Lo que

vendría a demostrar que la expresión de esta citoquina se encuentra mediada por la acción de la IL-23.

En la figura 4.20A podemos observar la señal fluorescente correspondiente a células plasmáticas gracias al anticuerpo anti-CD138 específico para dichas células. En los grupos CI y anti-IL-23^{mAB}-C y anti-IL-23^{mAB}-I se pueden observar las células alrededor de las criptas y en especial más abundantes en el último grupo citado.

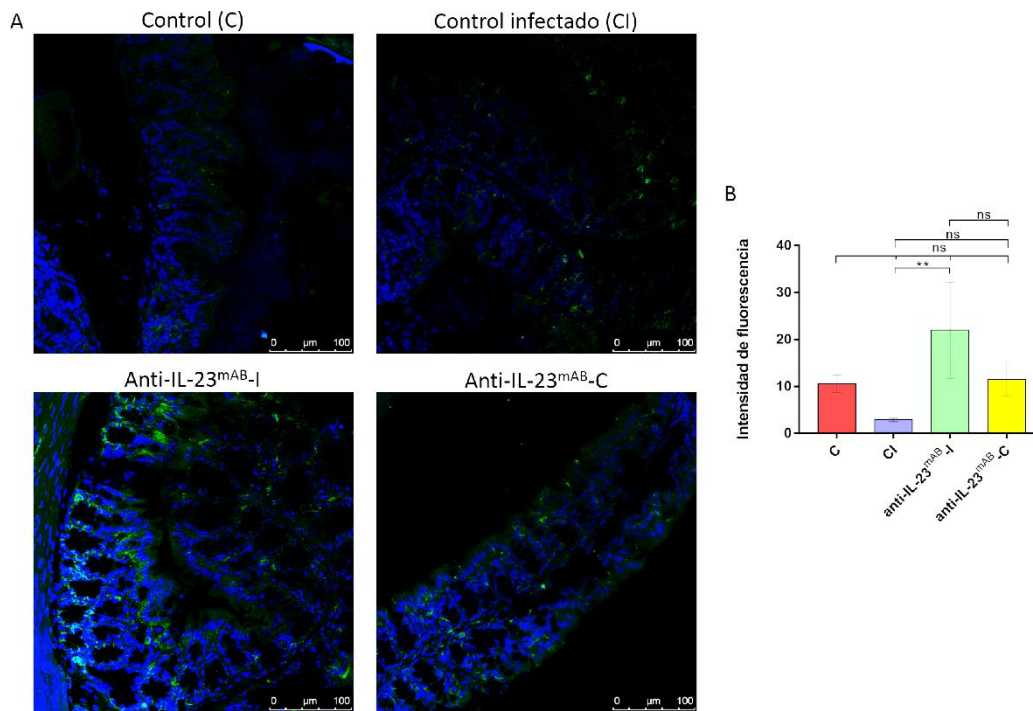


Figura 4.20. (A) Evaluación de la respuesta inmune frente a células plasmáticas en secciones finas de intestino de diferentes grupos de ratones mediante microscopía láser confocal con un anticuerpo primario anti-CD138 revelado con un anti-rata IgG FITC (verde). Los núcleos celulares se marcaron con DAPI (azul). (B) Cuantificación de la media de intensidad de fluorescencia, de cuatro mediciones de 100 μm² cada una, en las imágenes de microscopía láser confocal con el anticuerpo anti-CD138. Cada barra representa la media de las mediciones con su respectiva desviación estándar. Las diferencias fueron estadísticamente muy significativas (***) cuando $p < 0.001$, significativas (**) cuando $p < 0.01$, poco significativas (*) cuando $p < 0.05$ y no significativas (ns) cuando $p > 0.05$ siguiendo el análisis de *Tukey-kramer*.

Quizás una regulación entre la IL-21 e IL-25 conlleve junto a los niveles elevados de IL-4 a inducir la acumulación de células plasmáticas que llevarían a una respuesta tipo humoral en los animales tratados con los anticuerpos frente a la IL-23.

Las diferencias en intensidad de fluorescencia cuando revelamos las secciones finas con el anti-CD138 (figura 4.20B), solo muestran diferencias significativas (**)

entre los grupos de ratones que han sido infectados con el parásito, tanto el grupo control (CI) como el grupo de ratones que tiene neutralizada la IL-23 (anti-IL-23^{mAB}-I), mostrando este último un valor de intensidad más elevado. Los demás grupos C, y anti-IL-23^{mAB}-C, que no han sido infectados, presentan valores de fluorescencia muy similares entre sí, aunque nunca superiores al grupo anti-IL-23^{mAB}-I, siendo el valor más bajo para el grupo CI.

A continuación se presentan los resultados del estudio de intensidad de fluorescencia en las células Tuft (figura 4.21), a las que recientemente se les ha descrito como responsables de la liberación de IL-25 a nivel intestinal y que desencadena la eliminación de los parásitos, mediante el anticuerpo Dcamk1-1 específico de este tipo de células.

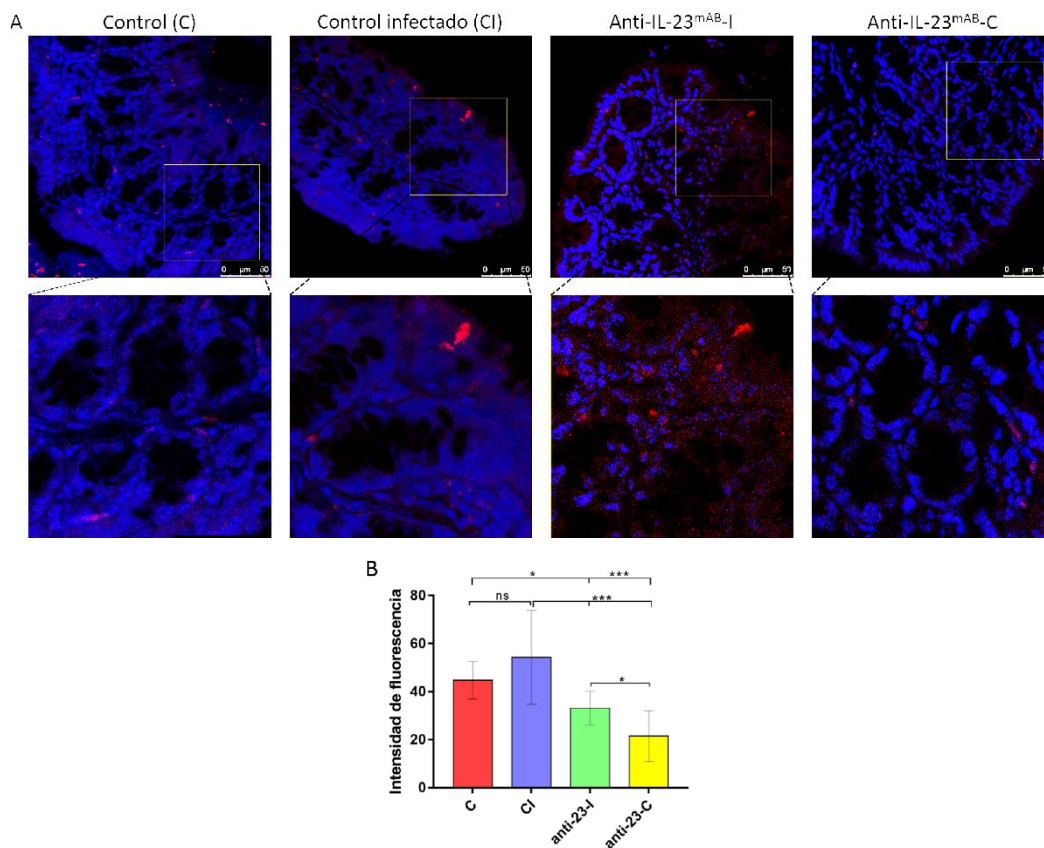


Figura 4.21. (A) Evaluación de la respuesta inmune frente a células Tuft en secciones finas de intestino de diferentes grupos de ratones mediante microscopía láser confocal con un anticuerpo primario anti-Dcamk1 revelado con un anti-conejo IgG Alexa Fluor[®] 647 (rojo). Los núcleos celulares se marcaron con DAPI (azul). (B) Cuantificación de la media de intensidad de fluorescencia de las células fluorescentes que aparecen en cada tratamiento experimental. Cada barra representa la media de las mediciones con su respectiva desviación estándar. Las

diferencias fueron estadísticamente muy significativas (***) cuando $p < 0.001$, significativas (**) cuando $p < 0.01$, poco significativas (*) cuando $p < 0.05$ y no significativas (ns) cuando $p > 0.05$ siguiendo el análisis estadístico de *Tukey-kramer*.

La intensidad de las células fluorescentes presentes en las imágenes de microscopía láser confocal se representa en la figura 4.21B. Los grupos con valores más altos de intensidad de fluorescencia son los grupos control (C y CI), mientras que con los grupos donde se neutralizó la IL-23 presentó mayor intensidad de fluorescencia el grupo anti-IL-23^{mAB}-I. Con niveles de intensidad entre estos dos grupos (anti-IL-23^{mAB}-I y anti-IL-23^{mAB}-C) poco significativos entre ellos (*).

A continuación, se presenta la Tabla 4 a modo de resumen con los marcadores y las zonas del intestino (vellosidad, túnica, lámina propia y criptas) donde aparece dicha señal de fluorescencia. Indicándose con ++++ la máxima señal.

Tabla 4. Resumen de zonas del intestino y localización de muco, interleucinas y citoquinas.

Marcador	Zonas del intestino	C	CI	Anti-IL-23 ^{mAB} -I	Anti-IL-23 ^{mAB} -C
IL-17					
	Vellosidad				
	Túnica				
	Lámina propia	+	+	+	+
	Criptas	+	+	+++	+++
Muco					
	Vellosidad				
	Túnica		+		
	Lámina propia				
	Criptas	++	+	++++	+
CCL2					
	Vellosidad	+			
	Túnica	+			++
	Lámina propia	+	++	+	++
	Criptas	+	++	+	++

Marcador	Zonas del intestino	C	CI	Anti-IL-23 ^{mAB} -I	Anti-IL-23 ^{mAB} -C
CCL17					
	Vellosidad				
	Túnica				
	Lámina propia				+++
	Criptas				
CXCL15					
	Vellosidad		+++	++	+++
	Túnica			++	
	Lámina propia		+	+++	
	Criptas	++++		++	
CCL20					
	Vellosidad				
	Túnica				
	Lámina propia		++	+	++
	Criptas	+++		+	
OX40					
	Vellosidad				
	Túnica				
	Lámina propia		++		
	Criptas			+	
GRO					
	Vellosidad				
	Túnica				
	Lámina propia			++	
	Criptas	+++	+++	+	

Marcador	Zonas del intestino	C	CI	Anti-IL-23 ^{mAB} -I	Anti-IL-23 ^{mAB} -C
CD138					
	Vellosidad			++	+
	Túnica				
	Lámina propia	+	++		+
	Criptas			+++	
Dcamkl-1					
	Vellosidad	+	++	+	+
	Túnica				
	Lámina propia				
	Criptas				

4.5. Evaluación de la carga parasitaria, determinación de nivel de expresión de interleucinas y observación de cambios en la mucosa intestinal de ratones infectados por *T. muris* inmunizados con el péptido rPP2A y el lipopéptido rPP2A-OVS

4.5.1. Evaluación de los pesos de los animales tratados, como evaluación de los efectos adversos de la inmunización

Para evaluar los posibles efectos adversos producidos después del tratamiento de inmunización intranasal que pudiera inducirse en los ratones por las diferentes fórmulas administradas a los diferentes grupos de animales, se tomaron medidas de peso en los animales durante todo el periodo que dura el experimento. Todas las medidas se compararon con los ratones del grupo Control. Los resultados, como se observa en la figura 4.22, muestran que no hubo diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los grupos al final del experimento, aunque se aprecia un leve aumento de peso en los grupos tratados con rPP2A-OVS y rPP2A-PB con respecto al CI correspondiente a los ratones no tratados pero infectados por *T. muris*.

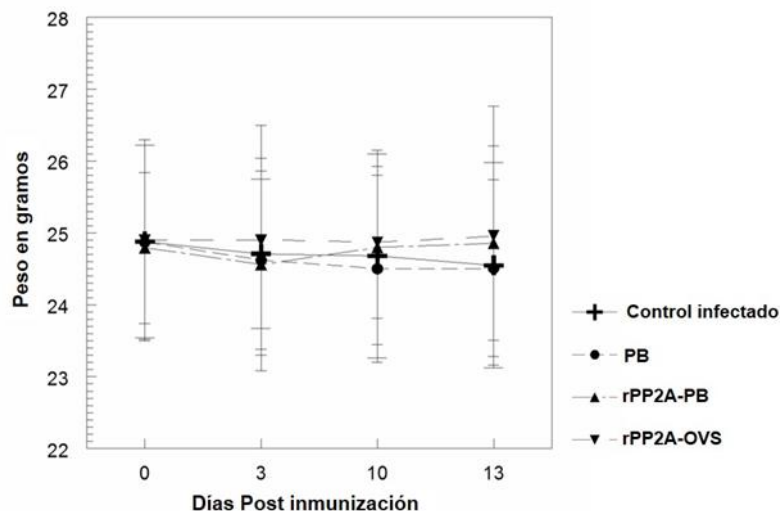


Figura 22. Peso en gramos de los diferentes grupos de ratones experimentales después de la segunda inmunización. Donde no se observaron diferencias significativas (ns) $p > 0.05$ según el análisis *Tukey-Kramer*.

El estudio de la media del número de huevos expulsados por cada grupo de ratones después de la inmunización se refleja de forma gráfica en la figura 4.23. Donde se representa que en la primera semana después de la inmunización los ratones inmunizados con las fórmulas que incluían el rPP2A alcanzaron porcentajes de 88.93 % y 92.73 % de reducción en el número de huevos en los grupos rPP2A-PB y rPP2A-OVS respectivamente. Curiosamente, en los ratones tratados sólo con PB a los 7 días después del tratamiento se alcanzó una reducción del 7.67 %. A los 12 días después de la inmunización, los grupos inmunizados con rPP2A-PB y rPP2A-OVS alcanzaron valores mínimos, no siendo significativos entre ellos, pero altamente significativos con respecto al grupo CI (prueba de *Tukey-kramer* ($p < 0,001$)) y para el grupo inmunizado con PB. A las 2 semanas después del tratamiento, los ratones tratados con PB disminuyeron 16.13 % con respecto al Control infectado, disminuyendo drásticamente a 99.85 % el número de huevos en los animales tratados con rPP2A-PB y 99.01% para los tratados con rPP2A-OVS. Esta reducción no sólo se mantuvo constante sino que persistió hasta el día 18 del experimento.

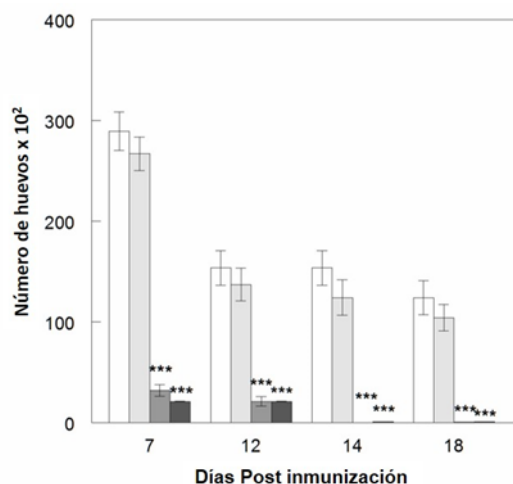


Figura 4.23. Número de huevos en cada uno de los grupos experimentales a los 7, 12, 14 y 18 días post inmunización. La barra blanca corresponde al grupo Control infectado, la barra gris claro corresponde al grupo de Paredes Bacterianas (PB), la barra gris oscuro corresponde al grupo de rPP2A-PB y la barra negra corresponde al grupo rPP2A-OVS. El estudio estadístico fue sometido a un análisis *Tukey-Kramer* donde $p > 0.001$ es muy significativo (***).

El número de vermes en los animales centinela, sacrificados a los 14 días post infestación, antes de iniciar la inmunización, fue de 83 ± 31.85 % lo que prueba que la infección tuvo éxito y *T. muris* se estableció en el intestino de los ratones correctamente. El descenso en el número de vermes, comparado con el grupo Control infectado al final del experimento cuando se sacrificaron los animales, aparece reflejado en la figura 4.24, en ella se muestra cómo en los animales inmunizados con rPP2A-OVS se produjo una reducción de vermes del 97.90 %, del 59.88 % en el grupo de los animales inmunizados con PP2A-PB y del 24.47 % de reducción cuando se usaron únicamente PB.

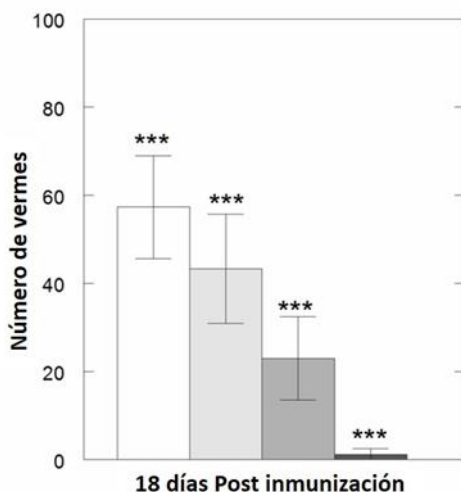


Figura 4.24. Media del número de vermes en cada grupo de ratones experimentales después de 18 días de la primera inmunización. La barra blanca corresponde al grupo Control infectado, la barra gris claro corresponde al grupo de Paredes Bacterianas (PB), la barra gris oscuro corresponde al grupo de rPP2A-PB y la barra negra corresponde al grupo rPP2A-OVS. El estudio estadístico fue sometido a un análisis *Tukey-Kramer* donde $p > 0.001$ es muy significativo (***).

4.5.2. Determinación de la expresión de interleucinas por PCR cuantitativa en tiempo real en órganos de ratón

Los niveles de expresión de las interleucinas en órganos linfoides, NLM y PPs, están representados en la figura 4.25 y la figura 4.26 respectivamente. Concretamente se estudiaron los niveles de expresión de IL-2, INF- γ , IL-12, IL-15, IL-6, TNF- α , G-CSF, IL-4, IL-10, TGF- β , IL-17, IL-23, IL-25, IL-21 e IL-9.

En los NLM (figura 4.25) se observa como en el grupo de animales Control infectado hay una respuesta elevada de IL-23, seguida de IL-4, IL-2 e IL-17. Mientras que en los animales donde se inmunizó de forma intranasal con PB hay un incremento de G-CSF, IL-6 e IL-2 sobre los otros grupos ($p < 0.001$), sin embargo en grupos inmunizados con rPP2A-PB, la respuesta predominante fue de IL-25 ($p < 0.001$) e IL-2 aunque menos significativa con respecto a los demás grupos ($p < 0.05$). Y en los inmunizados con rPP2A-OVS se aprecia una elevación altamente significativa ($p < 0.001$) de la IL-23 acompañada de IL-17, IL-9 y TNF- α .

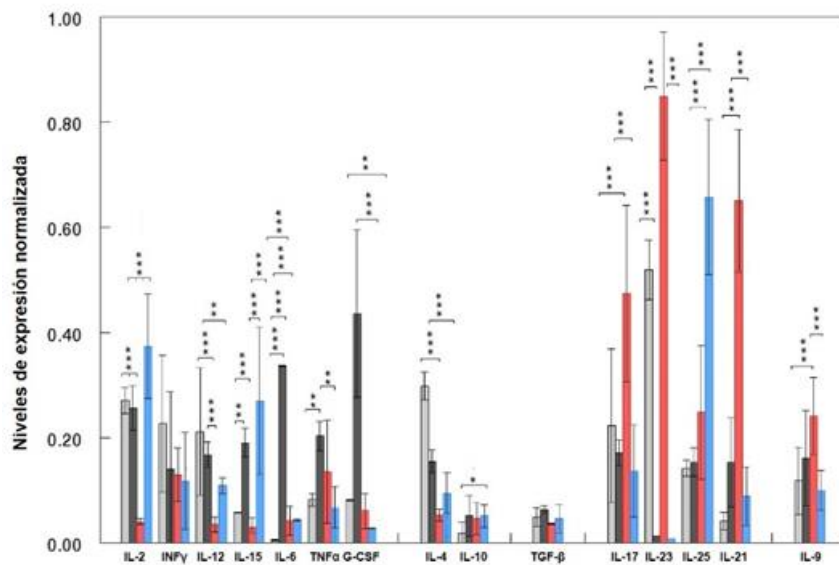


Figura 4.25. Determinación por PCR cuantitativa en tiempo real de niveles de expresión normalizada de interleucinas en NLM de los diferentes grupos de ratones inmunizados. La barra gris es para el grupo Control infectado, la barra negra es para el grupo de ratones inmunizados con Paredes Bacterianas (PB), la barra roja es para ratones inmunizados con el lipopéptido (rPP2A-OVS) y la barra azul para ratones inmunizados con rPP2A más Paredes Bacterianas (rPP2A-PB). Los valores son la media de la expresión normalizada y la desviación estándar. El análisis estadístico usado fue *Tukey-kramer*, $p < 0.001$ (***) , $p < 0.01$ (**) y $p < 0.05$ (*).

En las PPs (figura 4.26) de los animales del grupo Control infectado se desarrolló una elevada respuesta de IL-23 ($p < 0.001$), seguida por orden de expresión, de la IL-6, IL-17 e IL-21, con niveles relativamente medios ($p < 0.01$) de IL-2, IFN- γ y G-CSF. El grupo PB desarrolla una respuesta de IL-17 elevada ($p < 0.001$), acompañada de un nivel medio para IL-23 ($p < 0.01$) si bien éste resultó 3.5 veces menor que el registrado en el grupo Control infectado. Las respuestas Th2 como la IL-4 e IL-10 fueron en general muy bajas a excepción del grupo rPP2A-PB donde se registra la máxima respuesta para la IL-4. Asimismo, este grupo mostró la máxima respuesta para IFN- γ y una respuesta intermedia para las interleucinas IL-23 e IL-25, seguida por la IL-9. Sin embargo en los animales rPP2A-OVS la respuesta en las PPs fue mayoritariamente de IL-9 seguida de IL-25, y con niveles bajos para IL-17.

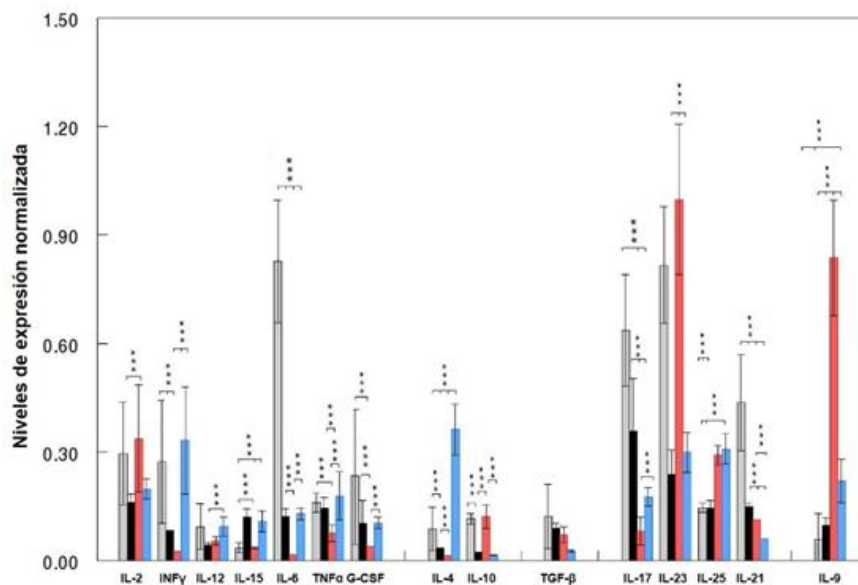


Figura 4.26. Determinación por PCR cuantitativa en tiempo real de niveles de expresión normalizada de interleucinas (en el eje de la x) en PPs de los diferentes grupos de ratones inmunizados. La barra gris es para el grupo Control infectado, la barra negra es para el grupo de ratones inmunizados con Paredes Bacterianas (PB), la barra roja es para ratones inmunizados con el lipopéptido (rPP2A-OVS) y la barra azul para ratones inmunizados con rPP2A más Paredes Bacterianas (rPP2A-PB). Los valores son la media de la expresión normalizada y la desviación estándar. El análisis estadístico usado fue *Tukey-kramer*, $p < 0.001$ (***), $p < 0.01$ (**) y $p < 0.05$ (*).

4.5.3. Cuantificación de cambios en la mucosa intestinal mediante microscopía láser confocal

Los cambios en la mucosa intestinal de ratones sometidos a cada tratamiento se evaluaron, según se consideró con cada marcador, con los parámetros; intensidad de fluorescencia, área fluorescente y conteo de número de células fluorescentes.

El análisis mediante microscopía láser confocal en las secciones histológicas finas de intestino de los diferentes grupos animales para evaluar los niveles de muco de las criptas en la mucosa del colon, usando la lectina de germen de trigo WGA unida a FITC, muestra cómo los animales tratados con rPP2A-OVS presentan mayores áreas fluorescentes en el interior de las criptas que en el resto de los grupos y mayor intensidad de fluorescencia. Estas diferencias se mostraron significativas $p < 0.001$ (***) con respecto al resto de los grupos. Por el contrario, los valores con relación al porcentaje de área que muestran fluorescencia en el grupo Control infectado y en el grupo inmunizado con rPP2A-PB resultaron similares (figura 4.27).

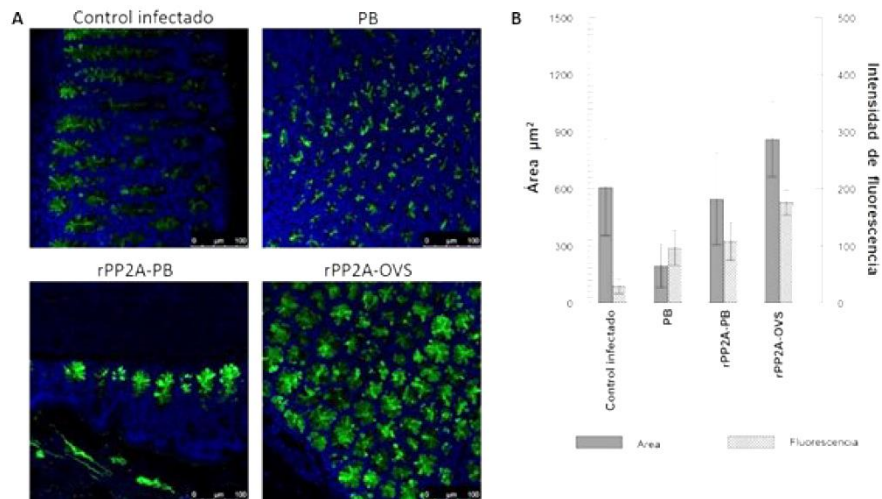


Figura 4.27. (A) Nivel de muco en áreas fluorescentes de las criptas de la mucosa del colon usando una lectina de germen de trigo (WGA) marcada con FITC (verde). (B) Cuantificación de los valores medios de intensidad de fluorescencia en los diferentes grupos inmunizados. La barra negra corresponde a la media del área que presenta fluorescencia más su desviación estándar y la barra gris corresponde con la media de la intensidad de fluorescencia más su desviación estándar. Las diferencias fueron estadísticamente muy significativas (***) cuando $p < 0.001$, significativas (**) cuando $p < 0.01$, poco significativas (*) cuando $p < 0.05$ y no significativas (ns) cuando $p > 0.05$ siguiendo el análisis de *Tukey-Kramer*. Los núcleos se marcaron con DAPI (azul).

En la figura 4.28, aparecen reflejadas tanto las imágenes obtenidas con microscopía láser confocal de los niveles de reconocimiento de CCL20 (Alexa Fluor® 647), como el reconocimiento por parte del anticuerpo específico con el fluorocromo isotiocianato de fluoresceína, conocido por su abreviatura en inglés FITC, frente a neutrófilos en un área de $2000 \mu\text{m}^2$ en las secciones finas de intestino de los animales de los diferentes grupos, teniendo en cuenta los valores de intensidad de fluorescencia y el porcentaje de área que ocupa dicha fluorescencia respecto al área total medida (figura 4.28B, C, D). Se observa que cuando se trataron las secciones finas de intestino con el anticuerpo frente a neutrófilos, el mayor número de células con fluorescencia aparece en la mucosa que rodea a las criptas del colon y en los bordes del intestino, mientras que en los bordes de la mucosa se aprecia el color verde, quizás como consecuencia de los productos de secreción de dichos neutrófilos. En los grupos Control infectado, PB y rPP2A-PB la intensidad de fluorescencia no mostró diferencias significativas, el grupo de animales tratados con rPP2A-OVS mostró diferencias altamente significativas (***) con respecto a los otros grupos.

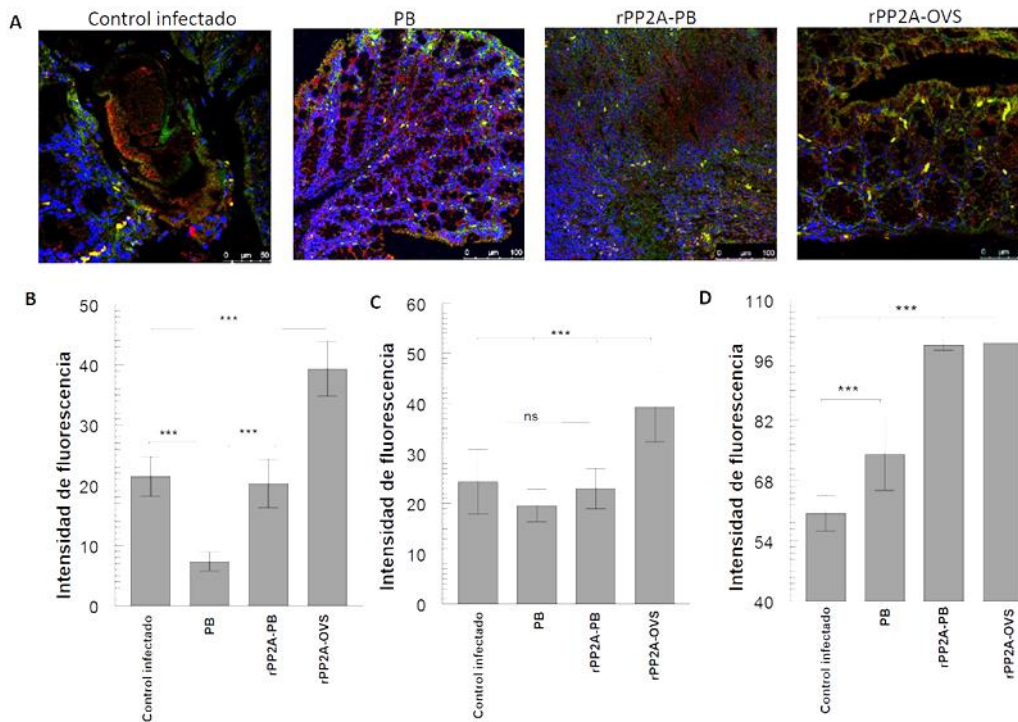


Figura 4.28. Estudios de microscopía láser confocal de neutrófilos y la citoquina CCL20. **(A)** La microscopía láser confocal de reclutamiento de neutrófilos (anti-neutrófilos marcado con FITC) y CCL20 (revelado con anti-conejo IgG Alexa Fluor® 647 (rojo) en las secciones intestinales finas en el grupo de ratones Control infectado y ratones inmunizados con PB, rPP2A-PB y rPP2A-OVS. Los núcleos se marcaron con DAPI (azul). **(B)** Media de los valores de intensidad de fluorescencia más su desviación estándar de los neutrófilos medidos en un área de $2,000 \mu\text{m}^2$. **(C)** Media de los valores de intensidad de fluorescencia de CCL20 más su desviación estándar medidos en las criptas intestinales. **(D)** Porcentaje de área fluorescente más su desviación estándar del marcaje con CCL20 medidos en las criptas intestinales. Las diferencias fueron estadísticamente muy significativas (***) cuando $p < 0.001$, significativas (**) cuando $p < 0.01$, poco significativas (*) cuando $p < 0.05$ y no significativas (ns) cuando $p > 0.05$ siguiendo el análisis de *Tukey-Kramer*.

Los niveles de reconocimiento de CCL20 valorados como intensidad de color rojo en el grupo rPP2A-OVS presentó niveles de intensidad de fluorescencia significativos (***) frente a los otros grupos, mientras los grupos Control infectado y rPP2A-PB fueron significativamente elevados frente al grupo PB (figura 4.28C). Por el contrario, cuando se evaluó el porcentaje de fluorescencia por superficie de las criptas intestinales dieron valores significativamente más altos (***) en los grupos donde se incluyó el péptido rPP2A (rPP2A-OVS y rPP2-PB) frente a los grupos Control

infectado y PB, si bien el porcentaje de fluorescencia por unidad de superficie del grupo PB fue significativamente mayor frente al mostrado por CI (figura 4.28D).

Los niveles de fluorescencia obtenidos al estudiar la “eotaxin” o CCL11 (Alexa Fluor® 633) evidencian en la figura 4.29A cómo la fluorescencia aparece sobre el epitelio que rodea las criptas intestinales y los grupos presentaron diferencias significativas entre ellos, en especial el tratado con el lipopéptido (rPP2A-OVS) y con rPP2A-PB, que mostraron la mayor significación (***) en la intensidad de fluorescencia frente al resto de los grupos (figura 4.29B).

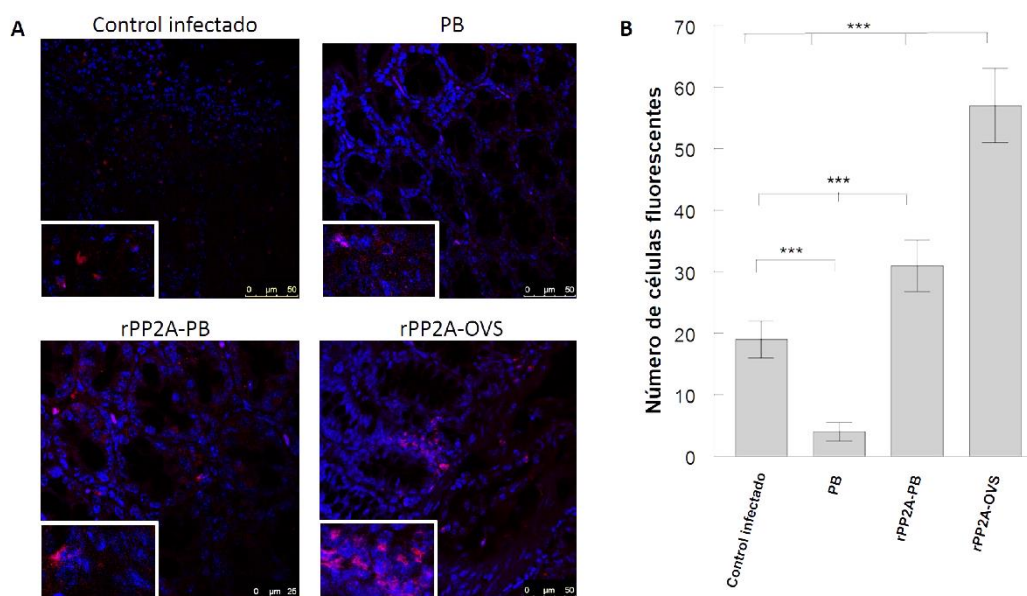


Figura 4.29. (A) Evaluación de la fluorescencia resultante del marcaje con un anti-CCL11 revelado con un anti-rata IgG marcado con Alexa Fluor® 633 (rojo) de secciones finas de intestino en los grupos de ratones Control infectado y ratones inmunizados con PB, rPP2A-PB y rPP2A-OVS. Los núcleos se marcaron con DAPI (azul). (B) Media y desviación estándar del número de células fluorescentes contadas en un área de $125 \mu\text{m}^2$. Las diferencias fueron estadísticamente muy significativas (***) cuando $p < 0.001$, significativas (**) cuando $p < 0.01$, poco significativas (*) cuando $p < 0.05$ y no significativas (ns) cuando $p > 0.05$ siguiendo el análisis de *Tukey-Kramer*.

Los niveles de fluorescencia para el OX40 (FITC) se observan en la figura 4.30A donde la señal aparece en color verde preferentemente en el borde del “cepillo” de la mucosa y en el epitelio que bordea las criptas intestinales y fueron en los intestinos del grupo rPP2A-PB donde se encontraron los mayores niveles de expresión siendo no significativos en los otros tres grupos ensayados (figura 4.30B).

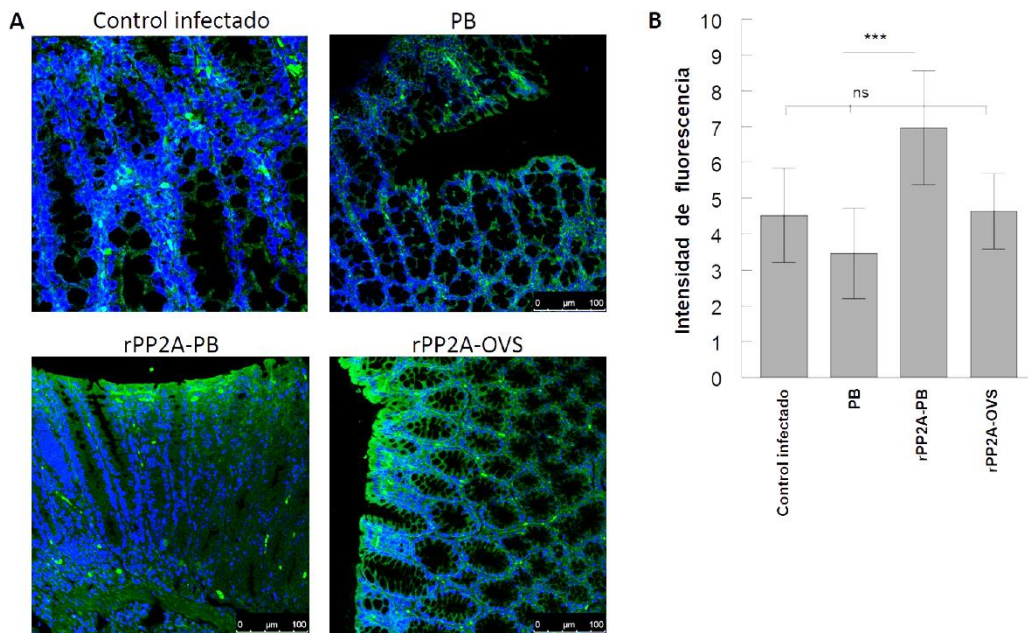


Figura 4.30. (A) Evaluación de la fluorescencia resultante del marcaje con un anti-OX40 marcado con FITC (verde) de secciones finas de intestino en los grupos de ratones Control infectado, PB, rPP2A-PB y rPP2A-OVS. Los núcleos se marcaron con DAPI (azul). (B) Media y desviación estándar de la intensidad de fluorescencia en un área de $1000 \mu\text{m}^2$. Las diferencias fueron estadísticamente muy significativas (***) cuando $p < 0.001$, significativas (**) cuando $p < 0.01$, poco significativas (*) cuando $p < 0.05$ y no significativas (ns) cuando $p > 0.05$ siguiendo el análisis estadístico de *Tukey-Kramer*.

La expresión de CD138 es altamente específica para las células plasmáticas dado que dicho receptor no se expresa en los plasmoblastos indiferenciados [345]. En la figura 4.31A se observa la localización de las células plasmáticas CD138, en las proximidades de la lámina propia y en el interior de las vellosidades intestinales de los animales inmunizados, este marcaje reveló que el grupo CI poseía diferencias significativas (***) en cuanto al número de células con respecto a los otros grupos, no observándose diferencias entre los grupos inmunizados.

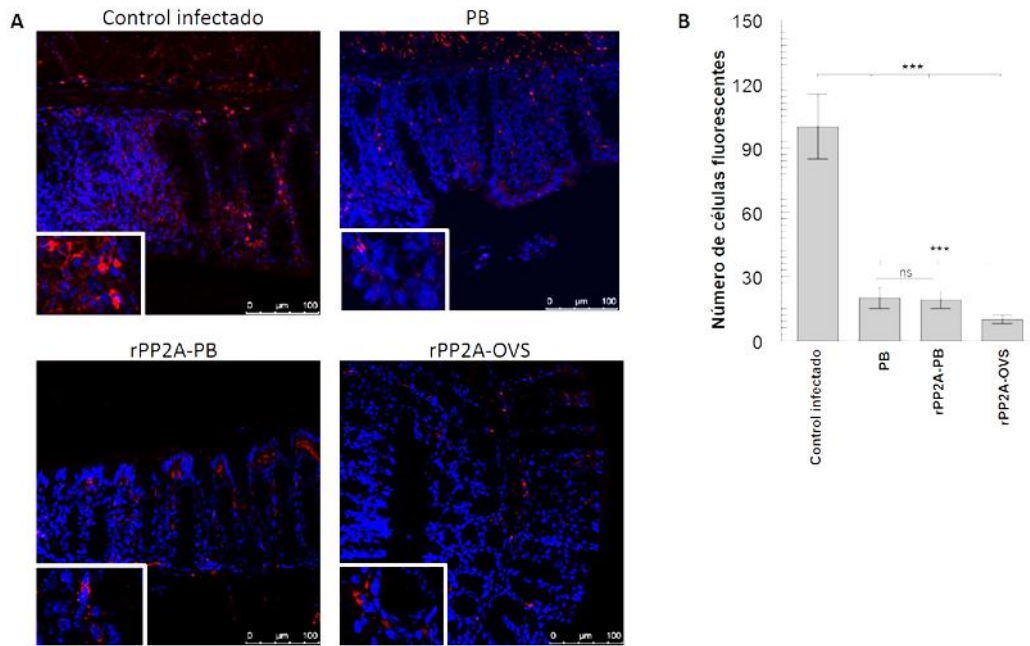


Figura 4.31. (A) Estudio de microscopía láser confocal de células plasmáticas (anti-CD138 revelado con un anti-rata IgG Alexa Fluor® 633, rojo) en secciones finas de intestino en grupos de ratones Control infectado y ratones inmunizados con PB, rPP2A-PB y rPP2A-OVS. Los núcleos se marcaron con DAPI (azul). (B) Media y desviación estándar del número de células fluorescentes contadas en un área de 170 μm^2 . Las diferencias fueron estadísticamente muy significativas (***) cuando $p < 0.001$, significativas (**) cuando $p < 0.01$, poco significativas (*) cuando $p < 0.05$ y no significativas (ns) cuando $p > 0.05$ siguiendo el análisis estadístico de *Tukey-Kramer*.

Respecto al recuento y estudio de intensidad de fluorescencia y tamaño de células Tuft mediante el anticuerpo frente a Dcamk11 revelado con anti-conejo IgG Alexa Fluor® 647 (figura 4.32) se obtuvo que en todos los grupos, el número de células por área estudiada (un cuadrado de 138 μm de lado) no varió entre los grupos, e igual ocurrió para el tamaño medio de las células reconocidas por el anticuerpo. Sin embargo la intensidad de fluorescencia en las células fue altamente significativa (***) en el grupo rPP2A-OVS frente al resto de los grupos, mostrando los grupos rPP2A-PB y PB significación en la intensidad de fluorescencia respecto al grupo Control infectado.

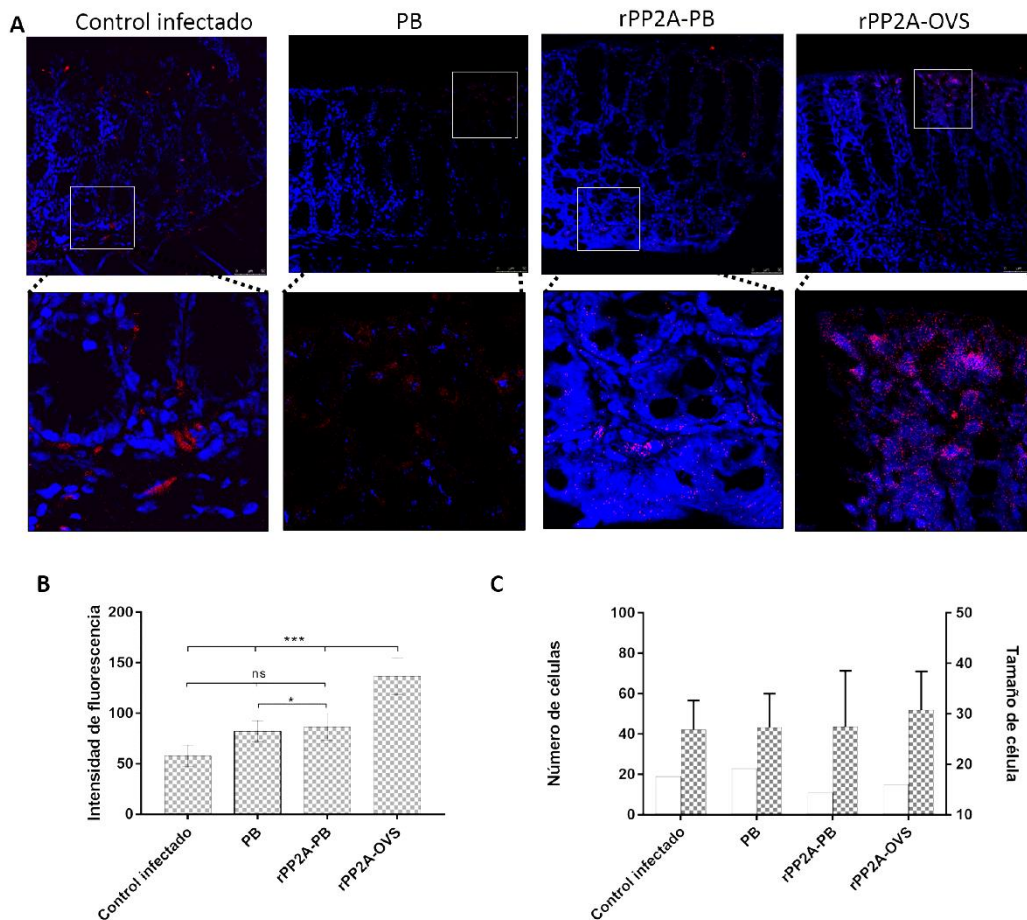


Figura 4.32. (A) Estudios de microscopía láser confocal de células Tuft con anti-Dcamk11 (rojo) en secciones intestinales. Los núcleos se marcaron con DAPI (azul). (B) Media y desviación estándar de los valores de intensidad de fluorescencia de las células Tuft medidos en un área de $138 \mu\text{m}^2$. (C) Con barra gris se representa el número de células fluorescentes y con barra sombreada se representan las medias más su desviación estándar del tamaño de las células Tuft. Las diferencias fueron estadísticamente muy significativas (***) cuando $p < 0.001$, significativas (**) cuando $p < 0.01$, poco significativas (*) cuando $p < 0.05$ y no significativas (ns) cuando $p > 0.05$ siguiendo el análisis estadístico de *Tukey-Kramer*.

A continuación, al igual que hicimos con las imágenes de microscopía láser confocal del ensayo con *A. tetraoptera*, como ayuda para observar la señal de fluorescencia de cada uno de los marcadores en las secciones finas de intestino, se muestra una Tabla 5 con los marcadores y las zonas del intestino (vellosidad, túnica, lámina propia y criptas) donde aparece dicha señal de fluorescencia. Indicándose con ++++ la máxima señal.

Tabla 5. Resumen de zonas del intestino y localización de muco y citoquinas

Marcador	Zonas del intestino	Control	infectado	PB	rPP2A	rPP2A-I
Muco						
	Cepillo vellosidad					
	Túnica					
	Lámina propia					
	Criptas	+		++	+++	+++
CCL11						
	Cepillo vellosidad			+	+	+++
	Túnica					
	Lámina propia					
	Criptas					
OX40						
	Cepillo vellosidad	+		+	++	+++
	Túnica	++		+	++	++
	Lámina propia				++	
	Criptas	+		+	++	
CD138						
	Cepillo vellosidad			+	+	+
	Túnica	+		+	+	+
	Lámina propia	+++				
	Criptas					
Neutrófilos						
	Cepillo vellosidad			+++		+++
	Túnica	+++		++	+	+++
	Lámina propia	+++			+	
	Criptas					

Marcador	Zonas del intestino	Control infectado	PB	rPP2A	rPP2A-I
CCL20					
	Cepillo vellosidad		++		+++
	Túnica	++	+++	+	+++
	Lámina propia	+++		+	++
	Criptas				
Tuft					
	Cepillo vellosidad		++		+++
	Túnica	++	+++	+	+++
	Lámina propia	+++		+	++
	Criptas				

5. DISCUSIÓN

5. Discusión

El uso de péptidos en inmunoprofilaxis tiene una serie de ventajas, su pureza, su costo y la seguridad de desarrollar una inmunización específica. Sin embargo la baja, a veces nula inmunogenicidad de los péptidos sintéticos o recombinantes por sí solos, obliga al empleo de potentes adyuvantes, los cuales a veces, son difícilmente tolerados por sus efectos adversos [346]. Desde los trabajos de Hopp en 1984 [205] donde encontró un incremento de la respuesta inmune inducida, tras unir covalentemente péptidos a cadenas alquílicas para formar lipopéptidos, se ha seguido esta estrategia por numerosos autores a fin de incrementar la inmunogenicidad tanto de péptidos sintéticos, como de los recombinantes. Este éxito de los lipopéptidos como adyuvante ha sido ratificado posteriormente. Si bien, no se comprende totalmente el mecanismo molecular del porqué son capaces de desencadenar dicha respuesta, habiéndoles atribuido la capacidad de agregarse formando micelas o partículas, lo que entre otras cosas protegería a los epítomos de la degradación por las enzimas séricas [204, 210, 347, 348], o quizás condicionaría el tipo de presentación antigénica. En un medio acuoso, al menos teóricamente, las partes hidrofóbicas lipídicas quedarían hacia el interior formando un núcleo lipófilo, mientras los péptidos más hidrofílicos deberían quedar al exterior, permitiendo así una mayor eficiencia en la presentación a las APC (células presentadoras de antígenos) [348, 349]. En este sentido, la observación mediante tinción negativa por MET de la suspensión de rPP2A unido a moléculas de OVS aparece en la figura 3.2 donde se aprecia cómo tras la unión a OVS se forman micelas con un tamaño medio de 46.66 ± 6.40 nm.

La inocuidad de la administración de las distintas preparaciones usadas en el ensayo se pone de manifiesto por la ausencia de cambios en el peso de los animales inoculados. Y en cuanto a la efectividad de la activación inmunológica frente a *T. muris*, se observó un brusco descenso en el número de huevos del nematodo eliminados en heces ya desde el séptimo día post administración intranasal de las preparaciones en las que estaba presente la rPP2A, el lipopéptido (rPP2A-OVS) o r2PP2A junto a las Paredes Bacterianas (rPP2A-PB). En el caso de la inmunización con *T. muris*, llama la atención como en el grupo que fue tratado solo con las PB, sin el antígeno recombinante, se observa una media en el número de huevos en heces menor que en las heces de los ratones pertenecientes al grupo Control infectado, aunque no de forma tan marcada como con las fórmulas donde se incluyó el péptido, cuando la inmunización se

realizó con la rPP2A más las Paredes Bacterianas (rPP2A-PB). Algo similar ocurrió en el número de adultos de *A. tetraptera* (resultados obtenidos en el Laboratorio de Parasitología Universidad de Valencia por la Dra. Trelis) y con *H. contortus* and *T. circumcincta* [350].

El efecto protector tanto de los lipopolisacáridos (LPS), como de las paredes bacterianas frente a la infección por helmintos ya ha sido descrito por otros autores [351-353] pudiendo atribuirse estos efectos a la activación inmunológica por parte de los LPS presentes en las PB que actuarían como agonistas de los TLRs presentes en una amplia gama de células [354, 355]. Tras su activación los TLRs modulan la respuesta inmune induciendo la expresión, entre otras, de la citoquina CCL20 [356, 357]. Esta citoquina es expresada entre otras por las células epiteliales intestinales cuando hay inflamación [358-360].

La respuesta inflamatoria es producida por la respuesta inmune combinada Th1 y la estrictamente inflamatoria, denominada Th17, respuesta en la que interviene fundamentalmente la IL-17 mediada por la activación de la IL-23. Esta última interleucina, no solo es estimuladora de la Th17 sino que permite el mantenimiento de la respuesta Th17 y producción de otras interleucinas derivadas de dicha respuesta. La IL-25, interleucina relacionada con la IL-17 (IL-17E) promueve como más tarde veremos una respuesta Th2 a través de las células Tuft disparando la IL-13 y participando activamente en la expulsión de los nematodos intestinales.

En el caso de infección por *A. tetraptera* se observa a nivel de bazo de los animales infectados (CI), unos niveles expresión de IL-4 muy elevados similares a lo descrito en la bibliografía para las infecciones por nematodos gastrointestinales [60]. Sin embargo en el caso de los experimentos llevados a cabo con *T. muris*, en los animales inoculados de forma intranasal solo con el adyuvante que está compuesto de paredes bacterianas, se observó que la expresión de IL-4 fue la más baja en los cuatro grupos al contrario de lo que ocurre con la IL-2, IL-21, IL-13 e IL-25 donde en los grupos vacunados mostraron los niveles de expresión más elevados. Estas respuestas evidencian la inducción de una respuesta tipo inflamatoria a nivel del bazo con una significación biológica importante dados los niveles, en especial, de la IL-25 y la implicación en la respuesta frente a helmintos.

Cuando evaluamos el nivel de expresión de estas interleucinas en los ratones infectados con *A. tetraptera* en las PPs se encontraron que los niveles de IL-17 en los

ratones infectados por el nematodo fueron significativamente más elevados que el grupo control sin infectar (C), al igual que ocurrió con la expresión de la IL-23.

Los niveles de expresión de la IL-25, en los grupos de animales infectados con *T. muris*, la diferencia fue significativamente positiva en los grupos de ratones a los que se les inmunizó intranasalmente con el péptido rPP2A. El máximo de expresión de la IL-21 se obtuvo en el grupo Control Infectado (CI). Mientras que en los NLM fue la expresión de la IL-23 la más elevada tanto en el grupo Control infectado (CI) como en el grupo inmunizado. Al igual que ocurre en las PPs, en los NLM fueron los grupos vacunados, los que mostraron los niveles más elevados de expresión de la IL-25, quizás este dato puede correlacionarse con el nivel de expulsión de los vermes adultos encontrados en los animales inmunizados. Hay que hacer notar que al igual que aparece descrito en la bibliografía, los niveles de expresión de las diferentes interleucinas varió dependiendo del tejido linfoide usado para estudiar su expresión, [361-363] y entre ellas fue el caso de la IL-4 descrita por los anteriores autores, también observada en nuestros resultados.

Los altos niveles de expresión de interleucinas procedentes de una respuesta Th17, y/o relacionadas con la producción de la IL-17, como son las IL-6 o TNF- β [364] en los ratones infectados con *A. tetraptera* nos llevaron a estudiar el efecto de un tratamiento con anticuerpos anti IL-23 de forma previa a la infección con los huevos embrionados del parásito, y tras la infección previa al sacrificio para su evaluación de la carga parasitaria. Los resultados de la elevada protección (93.3 %) obtenida en los animales tratados, nos llevó a estudiar la expresión de citoquinas y de las interleucinas en los animales tratados con el anticuerpo anti IL-23 que pudiese explicar dicha reducción en la parasitación.

La evaluación de los niveles de la citoquina CCL20 en los animales tratados con anticuerpos anti IL-23 e infectados con *A. tetraptera*, muestra como los ratones Control infectados (CI) y anti IL-23 infectados (anti-IL-23^{mAB}-I) son los dos únicos grupos donde se aprecian con intensidad los niveles de fluorescencia, mientras que los ratones control no infectados (C) y no infectados tratados con anti IL-23 (anti-IL-23^{mAB}-C) no mostraron fluorescencia. Esto vendría a demostrar que la parasitación por nematodos aun de una especie tan poco patógena como *A. tetráptera* induce una respuesta inflamatoria a nivel intestinal, capaz de desarrollar la expresión de CCL20. Dicha respuesta inflamatoria y el aumento de los niveles de CCL20 podría ser inducida tanto por la IL-17 como por la IL-6 [365]. Dado que la IL-23 es la interleucina responsable de

la regulación y mantenimiento de la expresión de la respuesta Th17 y en concreto de la IL-17 y que los animales fueron tratados dos días antes a la infección, podríamos considerar que la baja tasa de implantación de *A. tetraëtera* en el intestino podría ser consecuencia de la alteración del nicho necesario para el establecimiento y desarrollo del nematodo a nivel intestinal.

De hecho los niveles de expresión de IL-17 son los más elevados en la PPs del grupo Control Infectado (CI), junto a los niveles de las interleucinas IL-21, IL-25 e IL-6 siendo esta última interleucina más elevada en el grupo Control (C). En el caso de los NLM, los máximos niveles de expresión de la IL-6 fueron en el grupo tratado con el anticuerpo (anti-IL-23^{mAB}-C). Cabe destacar los elevados niveles de expresión en los NLM para la IL-9 del grupo tratado e infectado (anti-IL-23^{mAB}-I).

En el caso del grupo (anti-IL-23^{mAB}-I), los niveles de expresión de interleucinas en el bazo dieron los mayores niveles para las IL-15, IL-6, IL-13, IL-23 e IL-9, mientras que en NLM los niveles de expresión más altos observados en el grupo CI fueron para las IL-9, IL-21 e IL-25 y en el caso de las PPs los animales tratados y no infectados (anti-IL-23^{mAB}-C) fueron la expresión de las IL-23, IL-21 e IL-9 los que mostraron mayores niveles de expresión frente a los ratones infectados y los tratados con el anticuerpo anti IL-23. Posiblemente este microambiente sea el que encontraron las larvas de *A. tetraëtera* en el intestino cuando se liberaron tras la infección y entraron en contacto con la mucosa intestinal lo que les impidió su implantación. El papel en la expulsión de nematodos de la IL-25 e IL-9 en la expulsión de los helmintos se discute posteriormente.

Volviendo a la citoquina CCL20 es el CCR6 el considerado como el receptor de la misma y es tanto expresado por las células Th17 como las células Treg capaces estas últimas de expresar la IL-10 y el TGF- β [366]. Apareciendo también elevado este último factor (TGF- β), junto a IL-12 y TNF- α , interleucinas marcadoras de una respuesta Th1, en los animales a los que se les neutralizó la IL-23 y fueron infectados [367]. Podría ser que al anular o disminuir la Th17, los animales infectados dispararían una respuesta Th1 que intentaría ser compensada por el TGF- β e IL-10 producido en las células Treg.

La evaluación mediante inmunohistoquímica de los cortes de intestino en los diferentes grupos animales donde se infectó con *T. muris* y se usó el sistema de adyuvante OVS ligado a la rPP2A, reveló que aquellos tratados, bien con rPP2A-OVS o con rPP2A-PB mostraron niveles altos de fluorescencia en el área estudiada, así como

un número significativo de células que expresaban CCL20, con respecto a los grupos Control infectado y PB. El nivel de fluorescencia para esta citoquina que muestra el grupo Control infectado podría ser consecuencia de los factores secretados por *T. muris* capaces de estimular el TLR-4 [368] con la consiguiente estimulación inmunológica. Igual que ocurrió en el caso de los ratones infectados con *A. tetraptera* donde la fluorescencia de la citoquina apareció en la lámina propia y con menor intensidad en los ratones infectados y previamente tratados con el anticuerpo anti IL-23. Quizás a pesar de la posible excreción de factores liberados por el nematodo la modulación ejercida por los bajos niveles de IL-23 haga que la respuesta a la estimulación en los TLR no se ejecute correctamente. Sugiriendo que debe regularse la expresión de la CCL20 por la intervención de la respuesta derivada de Th17 y no solo consecuencia de una respuesta Th1.

La citoquina CCL2, específicamente atrae los monocitos y a las células T de memoria. Esta citoquina da lugar a una respuesta polarizada Th2. Mientras que la activación del receptor CCR2 conduce a la polarización hacia una respuesta Th1 [369], en nuestro caso los animales Control infectados (CI) con *A. tetraptera* fueron los que mostraron una mayor fluorescencia tanto en la lámina propia como en las criptas quizás como consecuencia de una respuesta típica de infección por nematodos y donde la Th2/Th9 juegan un papel importante en la inmunomodulación ejercida por el parásito, marcada por el aumento de la expresión de IL-4 en bazo ya observada en los animales infectados. Si bien este aumento de IL-4, también se puso de manifiesto en los NLM de los animales infectados por *T. muris* inmunizados intranasalmente con la rPP2A.

El sistema inmune intestinal incluye una serie de estructuras entre las que se encuentran las “cryptopatches” (CPs), los folículos linfoides aislados (FLAs), PPs y próximos al epitelio intestinal están los NLM. Las CPs constituyen pequeñas agrupaciones de células linfoides con linfocitos inmaduros y células dendríticas que expresan receptores para ROR γ τ y el receptor CCR6 pudiendo actuar como lugares de diferenciación linfocitaria en epitelios, así como iniciadores de inflamación [370]. En el epitelio intestinal, las células epiteliales asociadas a los folículos linfoides aislados expresan niveles significativamente más elevados de CCL20 que las criptas y que las células del *villi* intestinal [371]. Esta expresión de la citoquina, también se observa en otras células epiteliales asociadas a mucosas como las células epiteliales de la superficie de las amígdalas o las de los tejidos linfoides de la mucosa nasal (NALT) [372, 373]. La expresión de CCL20 normalmente expresada en niveles bajos, se estimula fuertemente

como consecuencia de señales pro inflamatorias incluyendo citoquinas y agonistas de los TLRs [374]. La expresión del receptor de CCL20, denominado CCR6, parece ser necesario en las células B para que se recluten a los NLM y las PPs, siendo este el lugar de inducción para la producción de las IgAs frente a los antígenos que estimulan las mucosas. Dicho receptor y la CCL20 participan en el desarrollo de las PPs, dado que en animales deficientes en CCR6 el desarrollo de las PPs no se completa igual como ocurre en los animales donde el receptor está presente [375].

La citoquina OX40 (CD134) es una molécula co-estimuladora expresada por las células T activadas que aparece a las 24 horas de la activación de las APCs con un máximo de producción entre los cuatro o cinco días tras la estimulación con el antígeno, y que juega un importante papel en la activación y proliferación de los linfocitos T actuando como quimio atrayente. Es una molécula co-estimuladora del receptor de la superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNFR) [376], que regula la producción de CCL20 [377]. En general OX40 proporciona una segunda vía de estimulación contribuyendo al reforzamiento de las funciones celulares de las células T [378, 379]. Se conoce que son las células Th17 las que expresan conjuntamente CCL20 y CCR6 y son a través de estas células activadas, las que producen la CCL20 [380-382]. Asimismo, la estimulación con OX40 aumenta la expresión en las células Th17 de la IL-21 y del receptor de la IL-23 [377]. En el caso de la infección por *A. tetraptera* la fluorescencia fue ligera, apareciendo en la lámina propia y las criptas de los grupos de animales infectados. Siendo aún más baja la fluorescencia para OX40, en el caso de los animales tratados con anticuerpos anti IL-23, para el caso de los animales infectados no tratados con el anti IL-23 en las PPs. Son los niveles de IL-21, IL-17 e IL-25 los que mayores niveles de expresión se encontraron de los cuatro grupos estudiados datos que coinciden con los obtenidos de OX40 donde habría quizás un mecanismo de retroalimentación entre las interleucinas y la citoquina.

A parte de las células linfoides, las células epiteliales se ha visto que expresan la citoquina CCL20 [383, 384], por mediación de la IL-17 [383, 385]. Sin embargo Zhong et al. en 2010 indicaron que la inducción de CCL20 por OX40 parece ser independiente de la IL-17, y comprueban que la activación y la quimiotaxis sí está mediada por OX40 [377]. Inhibiendo el OX40 aumenta la generación de IL-10 producida por las células Treg [386] por lo que participaría activando una típica respuesta inflamatoria Th1/Th17. Los bajos niveles de expresión de OX40 corresponderían también con los obtenidos con el TGF- β e IL-10 en los animales infectados por *A. tetraptera*.

La citoquina CCL17 es necesaria para la inducción de una respuesta inflamatoria a nivel de intestino en ratones con la activación de la Th1/Th17 reduciendo la expansión de las células Treg [387]. La CCL17 es expresada por numerosas células entre las que se encuentran las células Th CD4⁺, linfocitos T citotóxicos CD8⁺, NK (“natural killers”), macrófagos y células dendríticas [388-391]. Su receptor el CCR4 se expresa en células Th17, Th2 y células Treg. Si bien se conocen muchas funciones de la CCL17 y su receptor CCR4 a nivel pulmonar y cutáneo [392] donde reduce la inflamación y hace migrar las células dendríticas a los NLM [393], muy poco se conoce sobre la expresión de las células dendríticas y su función a nivel intestinal [387, 394]. La CCL17 induce la producción de IL-12 e IL-23 por parte de las células dendríticas, promoviendo la diferenciación en Th1 y Th17 y reduciendo los niveles de inducción de las células Foxp3⁺ y de las células Treg. Los estudios de esta citoquina mediante microscopía láser confocal permitieron observarla solo en la lámina propia de los animales tratados con el anticuerpo anti IL-23 y no infectados, lugar donde se encuentran las células linfoides capaces de expresar la CCL17.

Igualmente el receptor CCR6 aparece asociado junto al CCR3, receptor de la citoquina CCL11, también conocida como “eosinophil chemotactic protein” o como eotaxin-1, en las células Th9 [395, 396]. Estas células se diferencian en presencia de IL-4 y TGF- β , con la concurrencia del OX40, para producir IL-9 [397]. Dicha interleucina media, entre otras funciones, en la expulsión de los nematodos intestinales, [91, 398-401] en los procesos alérgicos [402, 403], o incluso en la eliminación de algunos tumores como el melanoma [404] induciendo la producción de IL-8, IL-13, y CCL20, así como metaplasia en las células de Goblet de la mucosa [403]. La citoquina CCL11 actúa de forma primaria en la respuesta eosinofílica de las infecciones intestinales por nematodos, así como la migración de estas células desde el torrente sanguíneo a los lugares de inflamación [405], siendo esta citoquina co-estimuladora de las células T [406]. Al igual que ocurría con los niveles de expresión de CCL20, los niveles máximos de expresión de CCL11 aparecen en los grupos de animales infectados con *T. muris* tratados intranasalmente con rPP2A-OVS o rPP2A-PB, mientras que los niveles de OX40 en el grupo Control infectado y rPP2A-OVS fueron similares, elevándose la media de expresión en el grupo rPP2A-PB, si bien ninguno de los otros grupos dio valores de significación semejantes entre ellos.

A pesar de ser *T. muris* un parásito específico de ratones no todas las cepas consanguíneas de ratones son susceptibles a la infección [26]. Tras la ingestión de los

huevos embrionados del nematodo incluso a dosis muy bajas, en todos las cepas de ratones, se desarrolla una colitis aguda, como consecuencia de la inflamación del colon, pero solo en aquellos ratones donde se desencadena una respuesta inflamatoria, se instaura la parasitación mientras que en aquellos hospedadores que desarrollan una respuesta Th2, por ejemplo en la cepa BALB/c, se produce la expulsión de los vermes en aproximadamente 20 días post infestación [34]. En los ratones AKR/OlaHsd, usados en este experimento, la infestación desencadena una respuesta inflamatoria Th1 dependiente en las PPs y, por tanto, una colitis crónica indicadora de la persistencia de los gusanos adultos en el intestino grueso ante la incapacidad del hospedador para expulsarlos hacia el día 20 p.i. [28, 29, 407]. En el presente estudio, el grupo de ratones Control infectados desarrollaron en las PPs elevados niveles de expresión de interleucinas inflamatorias dependientes de Th17 como IL-17, IL-23 e IL-21, al igual que también la expresión de IL-6; los niveles de expresión de IFN- γ e IL-2 y GM-CSF, si bien no alcanzan los valores de expresión de la IL-6, sí aparecen elevados. Sin embargo, en los NLM podemos considerar que existe un claro incremento de la Th1 con elevación de la IL-2, IL-12 e IFN- γ , con una elevación de la IL-4 (Th2) pero no de la IL-10 (Treg) y elevación menos patente de algunas de las interleucinas Th17 como la IL-23 y la IL-17. Lo que hace presuponer que la respuesta inflamatoria Th17 en las PPs corresponde a una respuesta inflamatoria local tipo Th17, mientras la correspondiente a los NLM correspondería más a una respuesta relativa sistémica Th1/Th17 quizás mediada por la expresión de la CCL20 en las células del epitelio intestinal.

La primera línea de defensa con la que se encuentran los nematodos en su hábitat intestinal la constituye la barrera de la mucosa, la superficie de las células intestinales están recubiertas por un gel, el muco, constituido mayoritariamente por mucinas, una serie de glicoproteínas que son secretadas por las células epiteliales caliciformes de Goblet, constituyendo estas células un componente esencial en la defensa y eliminación de los helmintos gastrointestinales [408-411]. El intestino grueso, lugar de implantación de *T. muris*, al igual que *A. tetráptera*, posee dos capas de muco; la capa interna que aparece ligada a la mucosa y la más externa, menos densa, siendo esta última la capa con la que están en contacto los parásitos. Las mucinas son el componente mayoritario del muco segregado por las células de Goblet, junto a otras moléculas como anticuerpos, defensinas segregadas por las células de Paneth y lisozimas que recubren todo el epitelio intestinal [412, 413]. La capa de muco permite mantener la superficie intestinal recubierta de péptidos con capacidad bactericida

asegurando la esterilidad de la misma frente a bacterias, pero también frente a la infección por otros parásitos incluyendo los nematodos, bien por la existencia de diferentes factores bioactivos como las moléculas parecidas a la “resistin”, “intelectin”, and “calcium-activated chloride channel-3”, las que se ha sugerido que juegan un importante papel en la infección por nematodos [414, 415]. Quizás otro posible mecanismo de defensa lo constituye la barrera física que ejerce el muco sobre los nematodos interfiriendo tanto en los mecanismos de alimentación, como en la movilidad de los vermes. Ello explica que en las infecciones por nematodos se induzca en el hospedador una hiperplasia de las células de Goblet productoras de dicho muco y que puede ser inducida por la IL-9 [408, 416] lo que hace que en ausencia de dicho muco se deteriore la resistencia natural a la infección por nematodos. Recientemente se ha investigado el papel que juega en la activación de las células de Goblet el receptor intracelular Nod en el proceso de inflamación y su efecto en la eliminación de *T. muris* [417] y supuestamente en la expulsión de otros nematodos. En nuestros resultados, los mayores niveles de intensidad de fluorescencia y área ocupada por el muco los encontramos en los animales inmunizados con la rPP2A e infectados con *T. muris* en el grupo donde se trataron con el lipopéptido (rPP2A-OVS) y en el grupo inmunizado con rPP2A-PB, grupos donde el nivel de reducción de los vermes fue máximo. El análisis de la producción de muco mediante la lectina WGA, prueba que estas dos fórmulas administradas intranasalmente son capaces de estimular, a través del tejido linfoide asociado a mucosas (MALT), las células de Goblet de la mucosa intestinal productoras del muco.

En el caso de los ratones infectados con *A. tetraoptera* es en el grupo donde se trató con el anticuerpo y fue infectado donde se demostró la mayor intensidad de fluorescencia, es decir la mayor cantidad de muco en las criptas. Los animales control no infectados tanto tratados con anti IL-23, como los no tratados y los Control Infectados, el nivel de fluorescencia fue similar y sensiblemente más bajo que en los animales tratados con el anticuerpo anti IL-23 e infectados. Con respecto al área fluorescente reconocida por la lectina WGA, los animales tratados e infectados junto al control, mostraron áreas fluorescentes similares en las criptas intestinales. Resultados similares se obtuvieron cuando se estudió la presencia de IL-17 en los cortes intestinales donde la fluorescencia se obtuvo mayoritariamente en las criptas intestinales, con algo de fluorescencia en la lámina propia.

Al igual que se evidenció con los niveles de reducción de los huevos expulsados de *T. muris* en heces, los porcentajes de reducción de la parasitación valorada en el número de vermes adultos, de los diferentes grupos oscilan del 24.47 %, que inducía el tratamiento con Paredes Bacterianas, al 98 % que indujo el lipopéptido.

De igual forma, los ratones vacunados intranasalmente con el péptido recombinante rPP2A condujo a una reducción de la parasitación del 86.15 %, con un número de vermes medio en los animales vacunados de 2.6 frente a los 13.8 de los animales control no vacunados, lo que indicaría una efectividad del tratamiento inmunoprolifático intranasal, tanto con el péptido como con el lipopéptido.

Por otro lado los experimentos donde a los ratones se les intentó disminuir los niveles de IL-23 y posteriormente se infectaron con *A. tetraoptera*, curiosamente como se comentó en resultados, mientras que en los animales control se obtuvo una tasa de infección del 80 % y un número medio de vermes recuperados del 11.4 ± 9.9 , mientras que en los animales tratados con el anticuerpo anti IL-23 mostraron al final del experimento un nivel de parasitación del 0.2 ± 0.45 con un número de vermes que osciló de 0 a 1 gusano. El porcentaje de protección en estos animales tratados fue del 93.3 %.

En los experimentos con *T. muris*, la reducción obtenida tras la administración de las Paredes Bacterianas es menor que la obtenida en el caso de los experimentos con rPP2A-PB experimentando en este último grupo una reducción del 59 %, lo que probaría la efectividad en la estimulación de la respuesta del antígeno recombinante. Así mismo, cuando estas Paredes Bacterianas fueron administradas junto al antígeno recombinante (rPP2A) el porcentaje de reducción del número de vermes sería comparable al que obtuvimos en otro ensayo experimental con diferentes modelos de nematodos parásitos gastrointestinales de ganado usando la misma combinación de antígeno, rPP2A-PB [111]. Por otro lado, al ligar el rPP2A con la OVS (rPP2A-OVS) las tasas de reducción de la parasitación fueron máximas alcanzando prácticamente el 98 %. Es en este mismo grupo de animales en el que se obtuvieron los mayores niveles de fluorescencia cuando se estudió la producción de glicoproteínas en la mucosa, y coincidió con los mayores niveles de expresión de las citoquinas CCL20 y CCL11 ambas ligadas con el proceso de atracción de células al lugar de la inflamación y estimulación de las células de Goblet. La CCL20 expresada por los macrófagos es capaz de reclutar células CCR6 Th17 [418], y para eosinófilos esta función la facilita la citoquina CCL11 [419]. Por otra parte, se conoce que las células Th17 reclutan a los

neutrófilos [420], esta podría ser la explicación del aumento de neutrófilos que aparecen en los animales del grupo rPP2A-OVS y los altos niveles de expresión de IL-17.

La citoquina CXCL15 ha sido considerada hasta no hace mucho tiempo como una citoquina capaz de expresarse en pulmón y atraer los neutrófilos en procesos inflamatorios [421]. En mucosa digestiva a esta citoquina se la relaciona con la misma función, estando presente pero en menor intensidad que en pulmón, en estómago e intestino delgado y en mucha menor intensidad en ciego. De nuestros resultados se desprende que los animales control muestran fluorescencia en vellosidades y criptas y los animales a los que se les disminuyó la IL-23 e infectados, son el grupo que muestra los mayores niveles de fluorescencia, y dicha fluorescencia se encuentra distribuida por todas las estructuras del corte. Un patrón de fluorescencia parecido se encontró cuando se estudió el GRO o CXCL1 también quimio atrayente de neutrófilos y donde se le encontró en todos los grupos salvo el grupo anti IL-23 no infectado. Los mayores niveles de fluorescencia en este caso fueron en los animales pertenecientes al grupo control infectado, lo que prueba una vez más la respuesta inflamatoria a nivel intestinal inducida por la parasitación.

En el epitelio intestinal existen otras células junto a las células de Goblet, involucradas en los procesos de hacer llegar los antígenos o directamente los microorganismos a las células dendríticas inmaduras [413], son las células M que recubren los folículos linfoides asociados al intestino y que regulan la respuesta inmune de la mucosa [422]. Otras células son las células Cup, células que difieren de las células M en el patrón de glicosilación de la membrana plasmática y que al parecer no transportan antígenos o patógenos a las células inmunes de la mucosa como lo hacen las células M [423] y las células Tuft [424] en las que hasta muy recientemente no se había encontrado su funcionalidad, habiéndose descrito que participaban muy activamente en la regulación inmunológica frente a los parásitos. Las células Tuft se diferencian del resto de células de la mucosa por poseer un sistema tubulovesicular y un penacho de microvellosidades hacia el lado luminal que les da su nombre “Tuft”. En ese conjunto de túbulos aparece una proteína la “microtubule-linked protein kinase”, conocida como Dcamkl-1 [425], lo que permite a estas células ser reconocidas mediante anticuerpos frente a dicha quinasa.

Se conoce que el número de células Tuft que aparece a nivel de intestino aumenta con la presencia de parásitos [426-428], en animales libres de parásitos, entre los que se incluyen protozoos intestinales, el número de células Tuft del epitelio

intestinal oscila entre el 0.4 al 1 % del total de las células del epitelio [425]. En nuestro experimento con el nematodo *T. muris* el número de células marcadas por el anti-Dcamkl-1 no varió entre grupos, y tampoco lo hizo el tamaño de las mismas. La posible explicación es que en todos los grupos se infectaron con un número similar de larvas del nematodo con lo que la parasitación incrementó, sin duda, el número de células Tuft que en nuestro caso osciló entre 13 y 20 en el área estudiada (un área de 138 μm^2) para cada uno de los diferentes tratamientos. A pesar de la fuerte reducción del 97.90 % en el número de vermes que se consiguió con los grupos inmunizados con rPP2A en ningún caso se erradicó al parásito, con lo que en todos los casos hubo presencia de vermes. Por lo que consideramos que la disminución del número de células Tuft no podía tener lugar al no haber ausencia de parásitos en la mucosa intestinal [426]. Sin embargo el nivel de fluorescencia, como indicativo de la actividad de las células Tuft, en el grupo Control infectado fue significativamente menor que el nivel de fluorescencia de los otros tres grupos, especialmente frente al grupo tratado intranasalmente con el lipopéptido (rPP2a-OVS) lo que indicaría que la presencia de los antígenos, junto a las PB o ligado al OVS estimula la actividad de dichas células. La activación podría ser debida a la estimulación de las mucosas por parte de los componentes de las PB [429], del antígeno (rPP2A) o del lipopéptido (rPP2A-OVS).

Se ha descrito como las bacterias intestinales promueven una respuesta a través de las células Tuft y la producción de IL-25 (IL-17E) [63], quizás una respuesta similar tiene lugar en la mucosa nasal, lo que indicaría una estimulación de las células Tuft mediada por la cooperación entre el sistema NALT-GALT (sistema linfoide asociado al tubo digestivo) por algunos de los factores de estimulación como las citoquinas. Este dato podría explicar los altos niveles de expresión de IL-25 en los NLM de los animales inmunizados con las preparaciones que llevan el antígeno recombinante (rPP2A-PB y rPP2A-OVS). Owyang et al. en 2006 [430] encontraron que la expresión de la IL-25 tiene lugar tanto en el ciego, como en los NLM, y que los animales resistentes a la infección por *T. muris* presentan niveles significativamente superiores de expresión de mRNA en las PPs que en los NLM. La cepa de ratones AKR/OlaHsd usada por nosotros y susceptible a la infección, muestra niveles de expresión de la IL-25 comparables tanto en los NLM, como en las PPs. Las células Tuft se consideran actualmente como la primera fuente de la producción de IL-25 inducida por los parásitos, a su vez, la IL-25 promueve la producción de IL-13 por parte de las ILC2

Se ha correlacionado el papel de las células Tuft con la presencia de eosinófilos [426] y la expansión de los eosinófilos se relaciona con la expansión de las células ILC2 en la parasitación por helmintos, mediada la migración de los eosinófilos desde la circulación, al lugar de la inflamación y sitio de infección por la citoquina CCL11 dada la presencia del receptor CCR3 en los eosinófilos [431]. Bajo la influencia de un ambiente Th2 con la combinación de la IL-5 y el G-CSF se contribuye así, al aumento de eosinófilos en sangre periférica [67]. Parece claro que la IL-9 contribuye a la atracción de eosinófilos al sitio de la inflamación como consecuencia de la producción de CCL11 [395] lo que aparentemente podría inducir a pensar que dicha respuesta IL-9 estaría encuadrada dentro de una respuesta Th2, como ha sido considerada por mucho tiempo [432].

Recientemente se ha descrito la funcionalidad de las células Tuft actuando como células quimiosensoras [433], participando en la inducción de fenómenos inflamatorios cerca de las células Tuft segregando tanto prostaglandinas como acetilcolina (Ach). La Ach entre otras acciones aumenta el flujo sanguíneo del tracto gastrointestinal así como el tono muscular gastrointestinal, aumentando las contracciones de las células del músculo liso que contribuye a la expulsión de los vermes.

La activación de dichas células medida en función del nivel de fluorescencia vendría controlada por los mediadores inducidos por la inactivación de los niveles de IL-23, posiblemente la IL-9 como se observa en los ratones tratados con el anticuerpo anti IL-23, lo que el aumento de dicha interleucina, contribuiría a desencadenar la respuesta Th9 que evita la implantación de las larvas de *A. tetraptera*.

Los niveles de expresión normalizados de IL-25, respecto a la expresión de la actina, fueron comparados respectivamente en PPs o NLM entre los cuatro grupos experimentales de ratones infectados con *T. muris*. Donde se muestran como el grupo de ratones a los que se les administró la rPP2A-PB expresaron niveles significativos de esta interleucina en los NLM en relación a los niveles de expresión medidos en PPs y con respecto a los demás grupos experimentales, mientras que no hubo significación entre estos últimos grupos. Si bien el valor medio del nivel de expresión del grupo rPP2A-OVS fue superior al de los grupos Control infectado y PB. Este nivel de expresión de IL-25 en los animales tratados con la rPP2A-OVS que aparece en NLM, no se correlacionó con los niveles de IL-25 en las PPs, donde los valores de este grupo fueron similares a los de rPP2A-PB, aunque ambos significativamente superiores a los

otros dos grupos control (Control infectado y PB), aunque como ya hemos dicho, con niveles de expresión diferentes a los encontrados en los NLM.

Justo al contrario sucedió, con los niveles de expresión encontrados para la IL-9 donde en las PPs los niveles fueron muy superiores a los de NLM. Curiosamente fue el grupo tratado con el lipopéptido (rPP2A-OVS) el que mostró mayores niveles de expresión de esta interleucina en las PPs donde alcanzó el máximo nivel de expresión.

Se conoce que las células T estimuladas “in vitro” con TGF- β e IL-4 y que expresan IL-9 producen altos niveles de mRNA para el receptor IL-17RB y dicho receptor es el receptor para la IL-25. Por otra parte el tratamiento de estas células T con IL-25 hace que se incremente la expresión de IL-9 lo que vendría a probar la inducción de esta interleucina por parte de la IL-25 [434] y ello supondría que el efecto en la expulsión de los vermes atribuido a la IL-25 potencialmente sería mediado por la IL-9, capaz a su vez de estimular la producción de IL-13, observada, y con efecto antiparasitario [435]. La IL-9 es pleiotrópica, entre otros efectos biológicos se encuentra la reducción en la expresión de la “claudin2” proteína de unión entre las células intestinales con lo que la producción de IL-9 por parte de estas células podría alterar la funcionalidad de la barrera intestinal [92] alterando el flujo intestinal hacia la luz del intestino [93]. Otra de las funciones observada para esta interleucina es el efecto sobre la contractibilidad intestinal que favorece la expulsión de los vermes [91].

La respuesta celular Th17 procede de la subpoblación de células T CD4⁺ para los receptores CCR6, IL-23R, y CD161, ejerciendo una serie de funciones efectoras específicas. Las células Th17 expresan el receptor ROR- γ t [81], y participan en el control de patógenos extracelulares ejerciendo un importante papel en los procesos de autoinmunidad [436]. El efecto “in vitro” de la exposición a TGF- β 1 en combinación con IL-6 [437], IL-21 [438] o IL-9 sobre las células Th17 induce la producción de grandes cantidades de IL-9 que actúan tanto sobre las células Treg, como en las Th17. En presencia de TGF- β y de IL-9 las células “naive” y células Th CD4⁺ se diferencian a Th17 [439], dichas células producirán IL-17, IL-21 e IL-23, y esta última incrementa la producción de la IL-17 “in vivo” [440]. La IL-17 induce la expresión de receptores CCR6 y migración celular [441]. IL-17A es el miembro tipo de una familia de interleucinas que comprende seis miembros IL-17A a IL-17F producidas por las células Th17 [442], junto a otra interleucina como la IL-23 de la que ya hemos hablado anteriormente [440]. La IL-17 induce péptidos antimicrobianos [443] y en el caso de las mucosas la estimulación de las células de Goblet [444].

La relación entre IL-17 y la respuesta inmunitaria Th2 es muy compleja. En este sentido [445] animales deficientes en IL-17A son incapaces de expresar IL-13 cuando se infectan con el nematodo *N. brasiliensis*. Este dato coincide con los obtenidos con ratones donde las interleucinas procedentes de una respuesta Th2 se reducen con respecto a las que se expresan en los ratones salvajes cuando hay bajos niveles de IL-17 [446, 447]. Esto sugiere que la IL-17 promueve una Th2 y que los neutrófilos que se atraen por la IL-17 quizás contribuyan a la resolución de las infecciones por nematodos gastrointestinales [448].

Se ha descrito anteriormente como los parásitos y las bacterias intestinales promueven una respuesta a través de las células Tuft para la producción de IL-25 y ésta participa en la producción de IL-5 e IL-13 típicas de Th2 [63] favoreciendo la producción de IL-5 y la eosinofilia que a su vez participa en la expulsión de los vermes [432]. También se ha descrito como los neutrófilos que son atraídos por la IL-17 contribuyen a aclarar la flora bacteriana intestinal [449], lo que parecería indicar un sistema de regulación IL-25/IL-17A en el que podrían participar estas diferentes poblaciones celulares. El CCR3 como ya se ha indicado es el receptor de la CCL11 y es uno de los que estimulan la migración de las células Th9. La IL-25 regula la función de las enfermedades inflamatorias autoinmunes por una acción directa sobre la IL-23 la cual al ser inhibida evitaría la activación por parte de la IL-23 de las células Th17 y la producción de la IL-17 [450]. Opuesta a la acción de la IL-25 sobre las células Th17 es la acción de la IL-21 que favorece la activación del receptor de la Th17 y en concreto de la IL-23 [451] restaurando el balance entre la respuesta Treg y Th17 [452]. La IL-21 ejerce su acción en poblaciones tanto de células linfoides como células mieloides, entre las que se incluye las APCs, macrófagos y Treg. La IL-21 inhibe directamente la capacidad de las células dendríticas para actuar como APCs e incrementa la capacidad fagocítica sobre los macrófagos. La IL-21 inhibe a los mastocitos la capacidad de liberar los mediadores inflamatorios, y activa en las células B la producción de anticuerpos y participa en la proliferación y diferenciación de las células plasmáticas [451]. Aunque quizás el mayor papel de la IL-21 es la acción sobre la respuesta de inmunoglobulinas procedentes de las células B, si bien no es necesaria para el desarrollo de las células B tanto en médula ósea como en la periferia. La IL-21 puede inducir CD40 en células B “naive” para dar isotipos de IgA, inducción que se inhibe por la IL-4 [453]. En relación a nuestros resultados, en el grupo rPP2A-PB aparecen los mayores niveles de expresión de la IL-4 en las PPs y los menores niveles de expresión de IL-21 con respecto a los

demás grupos (Control infectado, PB y rPP2A-OVS), al igual que en los NLM donde el grupo de ratones Control infectado muestra los mayores niveles de expresión de IL-4 y el más bajo nivel de expresión de IL-21. Los niveles de expresión de IL-21 en las PPs en el grupo Control infectado se correlacionan con el mayor número de células CD138 en la mucosa. Pudiendo relacionar la expresión de la IL-21 de las PPs con el mayor número de células plasmáticas encontradas en el intestino. Dicha estimulación de células plasmáticas deberá estar mediada por la respuesta inflamatoria como se confirma con los resultados obtenidos tras el tratamiento con el anticuerpo anti IL-23 en los ratones infectados con *A. tetraptera*.

En resumen, los resultados del presente estudio sugieren que el tratamiento de los ratones AKR/OlaHsd, susceptibles a la infección por *T. muris*, mediante la inmunización nasal con el péptido recombinante rPP2A solo o como lipopéptido, ligado a OVS y administrados al inicio de la fase crónica de la infección, son capaces de activar una respuesta combinada Th17/Th9, fundamentalmente en las PPs y orquestadas por las citoquinas IL-25, IL-17, IL-9, que trae como consecuencia la inhibición en la eliminación de huevos por parte los vermes adultos, seguida de la expulsión acelerada de los mismos. Esta estrategia de inmunización podría ser de gran utilidad en su aplicación, tanto en inmunoterapia como inmunopprofilaxis, para el control de las enfermedades producidas por nematodos parásitos de la mucosa intestinal y en aquellas enfermedades donde sea necesaria la activación a nivel de la mucosa intestinal de la respuesta Th9. Y de igual manera que la bajada de niveles de IL-23 condiciona el ambiente necesario para la expulsión de las larvas de nematodos recién implantados a nivel de la mucosa del intestino, quizás como consecuencia de la estimulación del binomio IL-25/IL-13, consecuencia de un aumento de IL-9 y los efectos desencadenantes tanto a nivel fisiológico e inmunológico que llevaría a la expulsión de los parásitos.

6. CONCLUSIONES

6. Conclusiones

1. La parasitación por los nematodos intestinales usados en esta tesis doctoral induce a una respuesta inflamatoria Th1/Th17 a nivel de los órganos linfoides intestinales como son las placas de Peyers, respuesta que ha sido evidenciada tanto por el incremento de citoquinas como por el de las interleucinas. La comparación de la respuesta es diferente dependiendo del órgano linfoide que se trate, bazo, placas de Peyers y nódulos linfáticos mesentéricos.
2. El uso del péptido recombinante PP2A, como antígenos vacunal es efectivo tras la inmunización intranasal de los animales, produciendo niveles de protección de la parasitación en los dos modelos de nematodos intestinales estudiados, *Aspicularis tetráptera* y *Trichuris muris*.
3. La inmunización intranasal con el lipopéptido formado por el péptido recombinante PP2A y la oleico vinil sulfona induce unas tasas de protección medidas por la eliminación de los vermes intestinales próximas al 100 % sin aparentemente alterar el estado fisiológico de los animales vacunados.
4. El lipopéptido en medios acuosos parece formar estructuras miscelares submicroscópicas que posiblemente faciliten la presentación y estimulación antigénica. Por otra parte la fórmula oleico vinil sulfona permite la formación de lipopéptidos sin la necesidad de complicadas manipulaciones biológicas o químicas mediante una química de tipo “click”, lo que podría ser fácilmente aplicable a cualquier péptido ya sea sintético o recombinante para su uso en vacunación.
5. Los animales tratados intranasalmente con el lipopéptido rPP2A inducen una respuesta Th17/Th9 que posiblemente sean las facilitadoras de la expulsión de los vermes intestinales observados en los resultados de la presente tesis doctoral.

La disminución de los niveles de IL-23 en los animales previa a la infección facilita un ambiente hostil que impide la implantación de los nematodos a nivel intestinal. Dicho ambiente vendría mediado por un aumento a nivel de la mucosa intestinal de la IL-25, IL-9 con aumento posterior de la IL-13 que facilitarían, por los efectos fisiológicos inducidos por ellas, la eliminación de los vermes intestinales.

6. Conclusions

1. Parasitism by intestinal nematodes used in this doctoral thesis induced a Th1/Th17 inflammatory response at the level of the intestinal lymphoid organs such as the Peyer's patches and mesenteric lymph nodes.
2. The use of PP2A recombinant peptide, such as vaccine antigens proved effective after the intranasal immunization of the animals, promoting protection levels against parasitism in the two models of intestinal nematodes studied, *Aspiculuris tetraptera* and *Trichuris muris*.
3. Intranasal immunization with the lipopeptide formed by the PP2A recombinant peptide and the oleic vinyl sulfone induced protection rates measured by the elimination of intestinal worms of nearly 100 % without apparently altering the physiological state of the animals vaccinated.
4. The lipopeptide in aqueous environments form sub-microscopic micelle structures that possibly facilitated antigen presentation and stimulation. Also, the oleic formula oleic vinyl sulfone permitted the formation of lipopeptides without the need of complex biological or chemical manipulations of "click" chemistry, which could easily be applied to any peptide, whether synthetic or recombinant, for use in vaccination.
5. The animals treated intranasally with the lipopeptide rPP2A induced a Th17/Th9 response that may have facilitated the expulsion of the intestinal worms observed in the results of the present doctoral thesis.

The lowering of the IL-23 levels in the mice treated prior to the infection encouraged a hostile environment that impeded the implantation of the nematodes at the intestinal level. This environment was mediated by a higher level of the intestinal mucosa of the IL-25, IL-9 with a subsequent increase in the IL-13 that would facilitate, by the physiological effects induced by them, the elimination of the intestinal worms.

7. BIBLIOGRAFÍA

7. Bibliografía

- 1 Grecnis, R. K. 2015 Immunity to Helminths: Resistance, Regulation, and Susceptibility to Gastrointestinal Nematodes. *Annual Review of Immunology*. **33**, 201-225. (doi:10.1146/annurev-immunol-032713-120218)
- 2 Knox, M. R., Besier, R. B., Le Jambre, L. F., Kaplan, R. M., Torres-Acosta, J. F. J., Miller, J., Sutherland, I. 2012 Novel approaches for the control of helminth parasites of livestock VI: Summary of discussions and conclusions. *Veterinary Parasitology*. **186**, 143-149. (doi:10.1016/j.vetpar.2011.11.054)
- 3 Perry, B. D., Randolph, T. F. 1999 Improving the assessment of the economic impact of parasitic diseases and of their control in production animals. *Veterinary Parasitology*. **84**, 145-168. (doi:10.1016/S0304-4017(99)00040-0)
- 4 Roeber, F., Jex, A. R., Gasser, R. B. 2013 Impact of gastrointestinal parasitic nematodes of sheep, and the role of advanced molecular tools for exploring epidemiology and drug resistance - an Australian perspective. *Parasites & Vectors*. **6**, 1-13. (10.1186/1756-3305-6-153)
- 5 Burgess, C. G. S., Bartley, Y., Redman, E., Skuce, P. J., Nath, M., Whitelaw, F., Tait, A., Gilleard, J. S., Jackson, F. 2012 A survey of the trichostrongylid nematode species present on UK sheep farms and associated anthelmintic control practices. *Veterinary Parasitology*. **189**, 299-307. (doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.04.009)
- 6 Zajac, A. M. 2006 Gastrointestinal Nematodes of Small Ruminants: Life Cycle, Anthelmintics, and Diagnosis. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. **22**, 529-541. (doi.org/10.1016/j.cvfa.2006.07.006)
- 7 Whitley, N. C., Oh, S. H., Lee, S. J., Schoenian, S., Kaplan, R. M., Storey, B., Terrill, T. H., Mobini, S., Burke, J. M., Miller, J. E., *et al.* 2014 Impact of integrated gastrointestinal nematode management training for U.S. goat and sheep producers. *Veterinary Parasitology*. **200**, 271-275. (doi:10.1016/j.vetpar.2013.10.029)
- 8 Waller, P., Echevarria, F., Eddi, C., Maciel, S., Nari, A., Hansen, J. 1996 The prevalence of anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep in southern Latin America: general overview. *Veterinary Parasitology*. **62**, 181-187
- 9 Grisi, L., Leite, R. C., Martins, J. R. d. S., Barros, A. T. M. d., Andreotti, R., Caçado, P. H. D., León, A. A. P. d., Pereira, J. B., Villela, H. S. 2014 Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. **23**, 150-156.

- 10 Mederos, A., Fernández, S., VanLeeuwen, J., Peregrine, A. S., Kelton, D., Menzies, P., LeBoeuf, A., Martin, R. 2010 Prevalence and distribution of gastrointestinal nematodes on 32 organic and conventional commercial sheep farms in Ontario and Quebec, Canada (2006–2008). *Veterinary Parasitology*. **170**, 244-252. (doi:10.1016/j.vetpar.2010.02.018)
- 11 Wang, C.-R., Lou, Y., Gao, J.-F., Qiu, J.-H., Zhang, Y., Gao, Y., Chang, Q.-C. 2016 Comparative analyses of the complete mitochondrial genomes of the two murine pinworms *Aspiculuris tetraptera* and *Syphacia obvelata*. *Gene*. **585**, 71-75. (doi:10.1016/j.gene.2016.03.037)
- 12 Taffs, L. F. 1976 Pinworm infections in laboratory rodents. *Laboratory animals*. **10**, 1-13.
- 13 Anya, A. O. 1966 Studies on the biology of some oxyurid nematodes. II. The hatching of eggs and development of *Aspiculuris tetraptera* Schulz, within the host. *Journal of Helminthology*. **40**, 261-268.
- 14 Behnke, J. M. 1974 The distribution of larval *Aspiculuris tetraptera* Schulz during a primary infection in *Mus musculus*, *Rattus norvegicus* and *Apodemus sylvaticus*. *Parasitology*. **69**, 391-402.
- 15 Phillipson, R. F. 1974 Intermittent egg production by *Aspiculuris tetraptera* in mice. *Parasitology*. **69**, 207-213. (doi.org/10.1017/S0031182000048058)
- 16 Neuser, V. 1974 Rhythmus der Eiproduktion bei *Aspiculuris tetraptera* (Schulz). *Zeitschrift für Parasitenkunde*. **43**, 169-180.
- 17 Hsu, K. C. 1951 Experimental studies on egg development, hatching and retrofection in *Aspiculuris tetraptera*. *Journal of Helminthology*. **25**, 131-160.
- 18 Chan, K. F. 1955 The distribution of larval stages of *Aspiculuris tetraptera* in the intestine of mice. *Journal of Parasitology*. **41**, 529-532.
- 19 Hurst, R. J. M., Else, K. J. 2013 *Trichuris muris* research revisited: a journey through time. *Parasitology*. **140**, 1325-1339. (doi:10.1017/S0031182013001054)
- 20 Araujo, A., Reinhard, K. J., Ferreira, L. F., Gardner, S. L. 2008 Parasites as probes for prehistoric human migrations? *Trends in Parasitology*. **24**, 112-115. (doi:10.1016/j.pt.2007.11.007)
- 21 Davaine, C. J. 1858 Recherches sur le developpement et la propagation du Trichocephale de l'homme et de l'Ascaride lombricoide. *Comptes rendus de l'academie des sciences* **46**, 1217-1219.

- 22 Fahmy, M. 1954 An investigation on the life cycle of *Trichuris muris*. *Parasitology*. **44**, 50-57.
- 23 Hayes, K. S., Bancroft, A. J., Goldrick, M., Portsmouth, C., Roberts, I. S., Grecnis, R. K. 2010 Exploitation of the intestinal microflora by the parasitic nematode *Trichuris muris*. *Science*. **328**, 1391-1394. (doi:10.1126/science.1187703)
- 24 Tilney, L. G., Connelly, P. S., Guild, G. M., Vranich, K. A., Artis, D. 2005 Adaptation of a nematode parasite to living within the mammalian epithelium. *Journal of Experimental Zoology Part A: Comparative Experimental Biology*. **303A**, 927-945. (doi:10.1002/jez.a.214)
- 25 Lee, T. D., Wright, K. A. 1978 The morphology of the attachment and probable feeding site of the nematode *Trichuris muris* (Schrank, 1788) Hall, 1916. *Canadian Journal of Zoology*. **56**, 1889-1905. (doi:10.1139/z78-258)
- 26 Cliffe, L. J., Grecnis, R. K. 2004 The *Trichuris muris* System: a Paradigm of Resistance and Susceptibility to Intestinal Nematode Infection. In *Advances in Parasitology*. **57**, 255-307. (doi: 10.1016/S0065-308X(04)57004-5)
- 27 Bancroft, J. D., Stevens, A. 1977 *Theory and Practice of Histological Techniques*. Churchill Livingstone, Edinburgh and London
- 28 Else, K. J., Finkelman, F. D., Maliszewski, C. R., Grecnis, R. K. 1994 Cytokine-mediated regulation of chronic intestinal helminth infection. *The Journal of Experimental Medicine*. **179**, 347-351. (doi:10.1084/jem.179.1.347)
- 29 Dea-Ayuela, M. A., Rama-Iñiguez, S., Bolás-Fernandez, F. 2008 Enhanced susceptibility to *Trichuris muris* infection of B10Br mice treated with the probiotic *Lactobacillus casei*. *International Immunopharmacology*. **8**, 28-35. (doi:10.1016/j.intimp.2007.10.003)
- 30 Levison, S. E., Fisher, P., Hankinson, J., Zeef, L., Eyre, S., Ollier, W. E., McLaughlin, J. T., Brass, A., Grecnis, R. K., Pennock, J. L. 2013 Genetic analysis of the *Trichuris muris*-induced model of colitis reveals QTL overlap and a novel gene cluster for establishing colonic inflammation. *BMC Genomics*. **14**, 127-127. (doi:10.1186/1471-2164-14-127)
- 31 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.
- 32 Shikhobalova, N. P. 1937 Experimental study of the chemotherapy of trichocephalosis. I. Trichocephalosis of white mice. *Medskya Parazit*. **6**, 389-400.

- 33 Pike, E. H. 1965 Bionomic, blood, and chromium51 investigations of *Trichuris muris* and studies with two related species. *Dissertation Abstracts*. **25**, 7430-7431.
- 34 Bancroft, A. J., Artis, D., Donaldson, D. D., Sypek, P. J., Grecis, R. K. 2000 Gastrointestinal nematode expulsion in IL-4 knockout mice is IL-13 dependent. *European Journal of Immunology*. **30**, 2083-2091. (doi:10.1002/1521-)
- 35 Hepworth, M. R., Grecis, R. K. 2009 Disruption of Th2 immunity results in a gender-specific expansion of IL-13 producing accessory NK cells during helminth infection. *The Journal of Immunology*. **183**, 3906-3914. (doi:10.4049/jimmunol.0900577)
- 36 Hayes, K. S., Bancroft, A. J., Grecis, R. K. 2007 The role of TNF- α in *Trichuris muris* infection I: influence of TNF- α receptor usage, gender and IL-13. *Parasite Immunology*. **29**, 575-582. (doi:10.1111/j.1365-3024.2007.00979.x)
- 37 Kuijk, L. M., Klaver, E. J., Kooij, G., van der Pol, S. M. A., Heijnen, P., Bruijns, S. C. M., Kringel, H., Pinelli, E., Kraal, G., de Vries, H. E., *et al.* 2012 Soluble helminth products suppress clinical signs in murine experimental autoimmune encephalomyelitis and differentially modulate human dendritic cell activation. *Molecular Immunology*. **51**, 210-218. (doi:10.1016/j.molimm.2012.03.020)
- 38 Dainichi, T., Maekawa, Y., Ishii, K., Zhang, T., Nashed, B. F., Sakai, T., Takashima, M., Himeno, K. 2001 Nippocystatin, a Cysteine Protease Inhibitor from *Nippostrongylus brasiliensis*, Inhibits Antigen Processing and Modulates Antigen-Specific Immune Response. *Infection and Immunity*. **69**, 7380-7386. (doi:10.1128/IAI.69.12.7380-7386.2001)
- 39 Manoury, B., Gregory, W. F., Maizels, R. M., Watts, C. 2001 Bm-CPI-2, a cystatin homolog secreted by the filarial parasite *Brugia malayi*, inhibits class II MHC-restricted antigen processing. *Current Biology*. **11**, 447-451. (doi:10.1016/S0960-9822(01)00118-X)
- 40 Schönemeyer, A., Lucius, R., Sonnenburg, B., Brattig, N., Sabat, R., Schilling, K., Bradley, J., Hartmann, S. 2001 Modulation of Human T Cell Responses and Macrophage Functions by Onchocystatin, a Secreted Protein of the Filarial Nematode *Onchocerca volvulus*. *The Journal of Immunology*. **167**, 3207-3215. (doi:10.4049/jimmunol.167.6.3207)
- 41 Zang, X., Maizels, R. M. 2001 Serine proteinase inhibitors from nematodes and the arms race between host and pathogen. *Trends in Biochemical Sciences*. **26**, 191-197. (doi:10.1016/S0968-0004(00)01761-8)

- 42 Jex, A. R., Nejsum, P., Schwarz, E. M., Hu, L., Young, N. D., Hall, R. S., Korhonen, P. K., Liao, S., Thamsborg, S., Xia, J., *et al.* 2014 Genome and transcriptome of the porcine whipworm *Trichuris suis*. *Nature genetics*. **46**, 701-706. (doi:10.1038/ng.3012)
- 43 Podolska, M., Nadolna, K. 2014 Acetylcholinesterase secreted by *Anisakis simplex* larvae (Nematoda: Anisakidae) parasitizing herring, *Clupea harengus*: an inverse relationship of enzyme activity in the host–parasite system. *Parasitology Research*. **113**, 2231-2238. (doi:10.1007/s00436-014-3878-9)
- 44 Tundup, S., Srivastava, L., Harn, J. D. A. 2012 Polarization of host immune responses by helminth-expressed glycans. *Annals of the New York Academy of Sciences*. **1253**, E1-E13. (doi:10.1111/j.1749-6632.2012.06618.x)
- 45 McSorley, H. J., Harcus, Y. M., Murray, J., Taylor, M. D., Maizels, R. M. 2008 Expansion of Foxp3+ Regulatory T Cells in Mice Infected with the Filarial Parasite *Brugia malayi*. *The Journal of Immunology*. **181**, 6456-6466. (doi:10.4049/jimmunol.181.9.6456)
- 46 Loukas, A., Maizels, R. M. 2000 Helminth C-type Lectins and Host–Parasite Interactions. *Parasitology Today*. **16**, 333-339. (doi:10.1016/S0169-4758(00)01704-X)
- 47 Donnelly, S., O'Neill, S. M., Sekiya, M., Mulcahy, G., Dalton, J. P. 2005 Thioredoxin Peroxidase Secreted by *Fasciola hepatica* Induces the Alternative Activation of Macrophages. *Infection and Immunity*. **73**, 166-173. (doi:10.1128/IAI.73.1.166-173.2005)
- 48 Lässer, C., Eldh, M., Lötvall, J. 2012 Isolation and Characterization of RNA-Containing Exosomes. *Journal of Visualized Experiments*. **59**, e3037. (doi:10.3791/3037)
- 49 Marcilla, A., Trelis, M., Cortés, A., Sotillo, J., Cantalapiedra, F., Minguez, M. T., Valero, M. L., Sánchez del Pino, M. M., Muñoz-Antoli, C., Toledo, R., *et al.* 2012 Extracellular Vesicles from Parasitic Helminths Contain Specific Excretory/Secretory Proteins and Are Internalized in Intestinal Host Cells. *PLoS ONE*. **7**, e45974. (doi:10.1371/journal.pone.0045974)
- 50 Balic, A., Bowles, V. M., Meeusen, E. N. 2000 The immunobiology of gastrointestinal nematode infections in ruminants. *Advances in parasitology*. **45**, 181-241.
- 51 Meeusen, E. N. T., Balic, A., Bowles, V. 2005 Cells, cytokines and other molecules associated with rejection of gastrointestinal nematode parasites. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. **108**, 121-125. (doi:10.1016/j.vetimm.2005.07.002)

- 52 McClure, S. J., Emery, D. L., Bendixsen, T., Davey, R. J. 1998 Attempts to generate immunity against *Trichostrongylus colubriformis* and *Haemonchus contortus* in young lambs by vaccination with viable parasites. *International Journal for Parasitology*. **28**, 739-746. (doi:10.1016/S0020-7519(98)00040-X)
- 53 Emery, D. L., McClure, S. J., Davey, R. J. 2000 Protection of Merino lambs against *Haemonchus contortus* by trickle infection of neonates. *Parasitology International*. **49**, 165-170. (doi:10.1016/S1383-5769(00)00038-6)
- 54 Macaldowie, C., Jackson, F., Huntley, J., Mackellar, A., Jackson, E. 2003 A comparison of larval development and mucosal mast cell responses in worm-naïve goat yearlings, kids and lambs undergoing primary and secondary challenge with *Teladorsagia circumcincta*. *Veterinary Parasitology*. **114**, 1-13. (doi:10.1016/S0304-4017(03)00110-9)
- 55 Hoste, H., Torres-Acosta, J. F., Paolini, V., Aguilar-Caballero, A., Etter, E., Lefrileux, Y., Chartier, C., Broqua, C. 2005 Interactions between nutrition and gastrointestinal infections with parasitic nematodes in goats. *Small Ruminant Research*. **60**, 141-151. (doi:10.1016/j.smallrumres.2005.06.008)
- 56 Terefe, G., Lacroux, C., Andreoletti, O., Grisez, C., Prevot, F., Bergeaud, J. P., Penicaud, J., Rouillon, V., Gruner, L., Brunel, J. C., *et al.* 2007 Immune response to *Haemonchus contortus* infection in susceptible (INRA 401) and resistant (Barbados Black Belly) breeds of lambs. *Parasite Immunology*. **29**, 415-424. (doi:10.1111/j.1365-3024.2007.00958.x)
- 57 O'Connor, L. J., Kahn, L. P., Walkden-Brown, S. W. 2007 The effects of amount, timing and distribution of simulated rainfall on the development of *Haemonchus contortus* to the infective larval stage. *Veterinary Parasitology*. **146**, 90-101. (doi:10.1016/j.vetpar.2007.02.002)
- 58 O'Connor, L. J., Walkden-Brown, S. W., Kahn, L. P. 2006 Ecology of the free-living stages of major trichostrongylid parasites of sheep. *Vet Parasitol*. **142**, (doi:10.1016/j.vetpar.2006.08.035)
- 59 Mosmann, T. R., Cherwinski, H., Bond, M. W., Giedlin, M. A., Coffman, R. L. 1986 Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *The Journal of Immunology*. **136**, 2348-2357.

- 60 Else, K. J., Finkelman, F. D. 1998 Invited review Intestinal nematode parasites, cytokines and effector mechanisms. *International Journal for Parasitology*. **28**, 1145-1158. (doi:10.1016/S0020-7519(98)00087-3)
- 61 Pond, L., Wassom, D. L., Hayes, C. E. 1989 Evidence for differential induction of helper T cell subsets during *Trichinella spiralis* infection. *The Journal of Immunology*. **143**, 4232-4237.
- 62 Kopf, M., Gros, G. L., Bachmann, M., Lamers, M. C., Bluethmann, H., Kohler, G. 1993 Disruption of the murine IL-4 gene blocks Th2 cytokine responses. *Nature*. **362**, 245-248.
- 63 Fallon, P. G., Ballantyne, S. J., Mangan, N. E., Barlow, J. L., Dasvarma, A., Hewett, D. R., McIlgorm, A., Jolin, H. E., McKenzie, A. N. J. 2006 Identification of an interleukin (IL)-25-dependent cell population that provides IL-4, IL-5, and IL-13 at the onset of helminth expulsion. *The Journal of Experimental Medicine*. **203**, 1105-1116. (doi:10.1084/jem.20051615)
- 64 Gronke, K., Diefenbach, A. 2016 Tuft cell-derived IL-25 activates and maintains ILC2. *Immunol Cell Biol*. **94**, 221-223. (doi:10.1038/icb.2016.10)
- 65 Allen, J. E., Sutherland, T. E. 2014 Host protective roles of type 2 immunity: Parasite killing and tissue repair, flip sides of the same coin. *Seminars in Immunology*. **26**, 329-340. (doi:10.1016/j.smim.2014.06.003)
- 66 Anthony, R. M., Urban, J. F., Alem, F., Hamed, H. A., Roza, C. T., Boucher, J.-L., Van Rooijen, N., Gause, W. C. 2006 Memory Th2 cells induce alternatively activated macrophages to mediate protection against nematode parasites. *Nat Med*. **12**, 955-960. (doi:10.1038/nm1451)
- 67 Behm, C. A., Ovington, K. S. 2000 The role of eosinophils in parasitic helminth infections: insights from genetically modified mice. *Parasitology Today*. **16**, 202-209. (doi:10.1016/S0169-4758(99)01620-8)
- 68 Urban, J. F., Madden, K. B., Svetica, A., Cheever, A., Trotta, P. P., Gause, W. C., Katona, I. M., Finkelman, F. D. 1992 The importance of Th2 cytokines in protective immunity to nematodes. *Immunological Reviews*. **127**, 205-220. (doi:10.1111/j.1600-065X.1992.tb01415.x)
- 69 Crotty, S. 2011 Follicular Helper CD4 T Cells (TFH). *Annual Review of Immunology*. **29**, 621-663. (doi:10.1146/annurev-immunol-031210-101400)

- 70 Zhang, J., Roberts, A. I., Liu, C., Ren, G., Xu, G., Zhang, L., Devadas, S., Shi, Y. 2013 A novel subset of helper T cells promotes immune responses by secreting GM-CSF. *Cell Death Differ.* **20**, 1731-1741. (doi:10.1038/cdd.2013.130)
- 71 Harrington, L. E., Hatton, R. D., Mangan, P. R., Turner, H., Murphy, T. L., Murphy, K. M., Weaver, C. T. 2005 Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol.* **6**, 1123-1132. (doi:10.1038/ni1254)
- 72 Park, H., Li, Z., Yang, X. O., Chang, S. H., Nurieva, R., Wang, Y.-H., Wang, Y., Hood, L., Zhu, Z., Tian, Q., *et al.* 2005 A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol.* **6**, 1133-1141. (doi:10.1038/ni1261)
- 73 Langrish, C. L., Chen, Y., Blumenschein, W. M., Mattson, J., Basham, B., Sedgwick, J. D., McClanahan, T., Kastelein, R. A., Cua, D. J. 2005 IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *The Journal of Experimental Medicine.* **201**, 233-240. (doi:10.1084/jem.20041257)
- 74 Chung, Y., Chang, S. H., Martinez, G. J., Yang, X. O., Nurieva, R., Kang, H. S., Ma, L., Watowich, S. S., Jetten, A. M., Tian, Q., *et al.* 2009 Critical Regulation of Early Th17 Cell Differentiation by Interleukin-1 Signaling. *Immunity.* **30**, 576-587. (doi:10.1016/j.immuni.2009.02.007)
- 75 Hirahara, K., Ghoreschi, K., Laurence, A., Yang, X.-P., Kanno, Y., O'Shea, J. J. 2010 Signal transduction pathways and transcriptional regulation in Th17 cell differentiation. *Cytokine & Growth Factor Reviews.* **21**, 425-434. (doi:10.1016/j.cytogfr.2010.10.006)
- 76 Korn, T., Bettelli, E., Oukka, M., Kuchroo, V. K. 2009 IL-17 and Th17 Cells. *Annual Review of Immunology.* **27**, 485-517. (doi:10.1146/annurev.immunol.021908.132710)
- 77 Sutton, C. E., Lalor, S. J., Sweeney, C. M., Brereton, C. F., Lavelle, E. C., Mills, K. H. G. 2009 Interleukin-1 and IL-23 induce innate IL-17 production from $\gamma\delta$ T Cells, amplifying Th17 responses and autoimmunity. *Immunity.* **31**, 331-341. (doi:10.1016/j.immuni.2009.08.001)
- 78 Yang, L., Anderson, D. E., Baecher-Allan, C., Hastings, W. D., Bettelli, E., Oukka, M., Kuchroo, V. K., Hafler, D. A. 2008 IL-21 and TGF- β are required for differentiation of human TH17 cells. *Nature.* **454**, 350-352. (doi:10.1038/nature07021)

- 79 Das, J., Ren, G., Zhang, L., Roberts, A. I., Zhao, X., Bothwell, A. L. M., Van Kaer, L., Shi, Y., Das, G. 2009 Transforming growth factor β is dispensable for the molecular orchestration of Th17 cell differentiation. *The Journal of Experimental Medicine*. **206**, 2407-2416. (doi:10.1084/jem.20082286)
- 80 Ghoreschi, K., Laurence, A., Yang, X.-P., Tato, C. M., McGeachy, M. J., Konkel, J., Ramos, H. L., Wei, L., Davidson, T., Bouladoux, N., *et al.* 2010 Generation of Pathogenic Th17 Cells in the absence of TGF- β signaling. *Nature*. **467**, 967-971. (doi:10.1038/nature09447)
- 81 Ivanov, I., McKenzie, B. S., Zhou, L., Tadokoro, C. E., Lepelley, A., Lafaille, J. J., Cua, D. J., Littman, D. R. 2006 The orphan nuclear receptor ROR γ t directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T-helper cells. *Cell*. **126**, 1121-1133. (doi:10.1016/j.cell.2006.07.035)
- 82 Mathur, A. N., Chang, H.-C., Zisoulis, D. G., Stritesky, G. L., Yu, Q., O'Malley, J. T., Kapur, R., Levy, D. E., Kansas, G. S., Kaplan, M. H. 2007 Stat3 and Stat4 direct development of IL-17-secreting Th cells. *The Journal of Immunology*. **178**, 4901-4907. (doi:10.4049/jimmunol.178.8.4901)
- 83 Weaver, C. T., Hatton, R. D., Mangan, P. R., Harrington, L. E. 2007 IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annual Review of Immunology*. **25**, 821-852. (doi:10.1146/annurev.immunol.25.022106.141557)
- 84 Kolls, J. K., Lindén, A. 2004 Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity*. **21**, 467-476. (doi:10.1016/j.immuni.2004.08.018)
- 85 Huber, S., Gagliani, N., Esplugues, E., O'Connor Jr, W., Huber, Francis J., Chaudhry, A., Kamanaka, M., Kobayashi, Y., Booth, Carmen J., Rudensky, Alexander Y., *et al.* 2011 Th17 Cells Express Interleukin-10 Receptor and Are Controlled by Foxp3⁻ and Foxp3⁺ Regulatory CD4⁺ T Cells in an Interleukin-10-Dependent Manner. *Immunity*. **34**, 554-565. (doi:10.1016/j.immuni.2011.01.020)
- 86 Chaudhry, A., Samstein, Robert M., Treuting, P., Liang, Y., Pils, Marina C., Heinrich, J.-M., Jack, Robert S., Wunderlich, F. T., Brünig, Jens C., Müller, W., *et al.* 2011 Interleukin-10 signaling in regulatory T cells is required for suppression of Th17 cell-mediated inflammation. *Immunity*. **34**, 566-578. (doi:10.1016/j.immuni.2011.03.018)
- 87 Figueiredo, A. S., Schumacher, A. 2016 The T helper type 17/regulatory T cell paradigm in pregnancy. *Immunology*. **148**, 13-21. (doi:10.1111/imm.12595)

- 88 Schmitt, E., Germann, T., Goedert, S., Hoehn, P., Huels, C., Koelsch, S., Kühn, R., Müller, W., Palm, N., Rüde, E. 1994 IL-9 production of naive CD4+ T cells depends on IL-2, is synergistically enhanced by a combination of TGF-beta and IL-4, and is inhibited by IFN-gamma. *The Journal of Immunology*. **153**, 3989-3996.
- 89 Schmitt, E., Brandwijk, R. V., Snick, J. V., Siebold, B., Rüde, E. 1989 Tcγfiii/p40 is produced by naive murine cd4+ t cells but is not a general t cell growth factor. *European Journal of Immunology*. **19**, 2167-2170. (doi:10.1002/eji.1830191130)
- 90 Kaplan, M. H., Hufford, M. M., Olson, M. R. 2015 The development and in vivo function of T helper 9 cells. *Nat Rev Immunol*. **15**, 295-307. (doi:10.1038/nri3824)
- 91 Khan, W. I., Richard, M., Akiho, H., Blennerhasset, P. A., Humphreys, N. E., Grecis, R. K., Van Snick, J., Collins, S. M. 2003 Modulation of intestinal muscle contraction by interleukin-9 (IL-9) or IL-9 neutralization: correlation with worm expulsion in murine nematode infections. *Infection and Immunity*. **71**, 2430-2438. (doi:10.1128/IAI.71.5.2430-2438.2003)
- 92 Gerlach, K., Hwang, Y., Nikolaev, A., Atreya, R., Dornhoff, H., Steiner, S., Lehr, H.-A., Wirtz, S., Vieth, M., Waisman, A., *et al.* 2014 TH9 cells that express the transcription factor PU.1 drive T cell-mediated colitis via IL-9 receptor signaling in intestinal epithelial cells. *Nat Immunol*. **15**, 676-686. (doi:10.1038/ni.2920)
- 93 Gerlach, K., McKenzie, A. N., Neurath, M. F., Weigmann, B. 2015 IL-9 regulates intestinal barrier function in experimental T cell-mediated colitis. *Tissue Barriers*. **3**, e983777. (doi:10.4161/21688370.2014.983777)
- 94 Blankenhaus, B., Reitz, M., Brenz, Y., Eschbach, M. L., Hartmann, W., Haben, I., Sparwasser, T., Huehn, J., Köhl, A., Feyerabend, T. B., *et al.* 2014 Foxp3(+) regulatory T Cells delay expulsion of intestinal nematodes by suppression of IL-9-driven mast cell activation in BALB/c but not in C57BL/6 mice. *PLoS Pathogens*. **10**, e1003913. (doi:10.1371/journal.ppat.1003913)
- 95 Echevarria, F. A., M, Borba, M. F. S., Pinheiro, A. C., Waller, P. J., Hansen, J. W. 1996 The prevalence of anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep in southern Latin America: Brazil. *Veterinary Parasitology*. **62**, 199-206.
- 96 Waller, P. J. 1997 Anthelmintic resistance. *Vet Parasitol*. **72**, 391-405. (doi:10.1016/s0304-4017(97)00107-6)
- 97 Kaplan, R. M. 2004 Drug resistance in nematodes of veterinary importance: a status report. *Trends Parasitol*. **20**, 477-481. (doi:10.1016/j.pt.2004.08.001)

- 98 Jackson, F., Coop, R. L. 2000 The development of anthelmintic resistance in sheep nematodes. *Parasitology*. **120**, 95-107.
- 99 Kaminsky, R. 2003 Drug resistance in nematodes: a paper tiger or a real problem? *Current Opinion in Infectious Diseases*. **16**, 559-564.
- 100 Wrigley, J., McArthur, M., McKenna, P. B., Mariadass, B. 2006 Resistance to a triple combination of broad-spectrum anthelmintics in naturally-acquired *Ostertagia circumcincta* infections in sheep. *New Zealand veterinary journal* **54**, 47-49.
- 101 Hertzberg, H., Bauer, C. 2000 Anthelmintic resistance in gastrointestinal Strongylidae in sheep and goats: new data on prevalence, epidemiology, preventive measures and alternatives to anthelmintic drugs. *Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift*. **113**, 122-128.
- 102 Ducray, P., Gauvry, N., Pautrat, F., Goebel, T., Fruechtel, J., Desaulles, Y., Weber, S. S., Bouvier, J., Wagner, T., Froelich, O., *et al.* 2008 Discovery of amino-acetonitrile derivatives, a new class of synthetic anthelmintic compounds. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. **18**, 2935-2938. (doi:10.1016/j.bmcl.2008.03.071)
- 103 Kaminsky, R., Gauvry, N., Schorderet Weber, S., Skripsky, T., Bouvier, J., Wenger, A., Schroeder, F., Desaulles, Y., Hotz, R., Goebel, T., *et al.* 2008 Identification of the amino-acetonitrile derivative monepantel (AAD 1566) as a new anthelmintic drug development candidate. *Parasitology Research*. **103**, 931-939. (doi:10.1007/s00436-008-1080-7)
- 104 Bain, R. K. 1999 Irradiated vaccines for helminth control in livestock. *International Journal for Parasitology*. **29**, 185-191. (doi:10.1016/S0020-7519(98)00187-8)
- 105 Loukas, A., Bethony, J., Brooker, S., Hotez, P. 2006 Hookworm vaccines: past, present, and future. *The Lancet Infectious Diseases*. **6**, 733-741. (doi:10.1016/S1473-3099(06)70630-2)
- 106 Smith, W. D., Zarlenga, D. S. 2006 Developments and hurdles in generating vaccines for controlling helminth parasites of grazing ruminants. *Veterinary Parasitology*. **139**, 347-359. (doi:10.1016/j.vetpar.2006.04.024)
- 107 Newton, S. E., Munn, E. A. 1999 The Development of Vaccines against Gastrointestinal Nematode Parasites, Particularly *Haemonchus contortus*. *Parasitology Today*. **15**, 116-122. (doi:10.1016/S0169-4758(99)01399-X)
- 108 Schallig, H. D. F. H., van Leeuwen, M. A. W., Hendrikx, W. M. L. 1994 Immune responses of Texel sheep to excretory/secretory products of adult *Haemonchus contortus*. *Parasitology*. **108**, 351-357. (doi:10.1017/S0031182000076198)

- 109 Vervelde, L., Kooyman, F. N. J., Van Leeuwen, M. A. W., Schallig, H. D. F. H., Mackellar, A., Huntley, J. F., Cornelissen, A. W. C. A. 2001 Age-related protective immunity after vaccination with *Haemonchus contortus* excretory/secretory proteins. *Parasite Immunology*. **23**, 419-426. (doi:10.1046/j.1365-3024.2001.00391.x)
- 110 Domínguez-Toraño, I. A., Cuquerella, M., Gómez-Muñoz, M. t., Méndez, S., J.fernández-Pérez, F., M.alunda, J. 2000 Vaccination of Manchego lambs against *Haemonchus contortus* with a somatic fraction (p26/23) of adult parasites. *Parasite Immunology*. **22**, 131-138. (doi:10.1046/j.1365-3024.2000.00283.x)
- 111 Fawzi, E. M., González-Sánchez, M. E., Corral, M. J., Cuquerella, M., Alunda, J. M. 2014 Vaccination of lambs against *Haemonchus contortus* infection with a somatic protein (Hc23) from adult helminths. *International Journal for Parasitology*. **44**, 429-436. (doi:10.1016/j.ijpara.2014.02.009)
- 112 Van Meulder, F., Ratman, D., Van Coppennolle, S., Borloo, J., Li, R. W., Chiers, K., Van den Broeck, W., De Bosscher, K., Claerebout, E., Geldhof, P. 2015 Analysis of the protective immune response following intramuscular vaccination of calves against the intestinal parasite *Cooperia oncophora*. *International Journal for Parasitology*. **45**, 637-646. (doi: 10.1016/j.ijpara.2015.03.007)
- 113 Bassetto, C. C., Amarante, A. F. T. 2015 Vaccination of sheep and cattle against haemonchosis. *Journal of Helminthology*. **89**, 517-525. (doi:10.1017/S0022149X15000279)
- 114 Nisbet, A. J., McNeilly, T. N., Wildblood, L. A., Morrison, A. A., Bartley, D. J., Bartley, Y., Longhi, C., McKendrick, I. J., Palarea-Albaladejo, J., Matthews, J. B. 2013 Successful immunization against a parasitic nematode by vaccination with recombinant proteins. *Vaccine*. **31**, 4017-4023. (doi:10.1016/j.vaccine.2013.05.026)
- 115 Geldhof, P., Claerebout, E., Knox, D., Vercauteren, I., Looszova, A., Vercruysse, J. 2002 Vaccination of calves against *Ostertagia ostertagi* with cysteine proteinase enriched protein fractions. *Parasite Immunology*. **24**, 263-270. (doi:10.1046/j.1365-3024.2002.00461.x)
- 116 Geldhof, P., Meyvis, Y., Vercruysse, J., Claerebout, E. 2008 Vaccine testing of a recombinant activation-associated secreted protein (ASP1) from *Ostertagia ostertagi*. *Parasite Immunology*. **30**, 57-60. (doi:10.1111/j.1365-3024.2007.01001.x)
- 117 Tsuji, N., Suzuki, K., Kasuga-Aoki, H., Isobe, T., Arakawa, T., Matsumoto, Y. 2003 Mice Intranasally Immunized with a Recombinant 16-Kilodalton Antigen from

- Roundworm *Ascaris* Parasites Are Protected against Larval Migration of *Ascaris suum*. *Infection and Immunity*. **71**, 5314-5323. (doi:10.1128/iai.71.9.5314-5323.2003)
- 118 Tsuji, N., Miyoshi, T., Islam, M. K., Isobe, T., Yoshihara, S., Arakawa, T., Matsumoto, Y., Yokomizo, Y. 2004 Recombinant *Ascaris* 16-Kilodalton Protein-Induced Protection against *Ascaris suum* Larval Migration after Intranasal Vaccination in Pigs. *Journal of Infectious Diseases*. **190**, 1812-1820. (doi:10.1086/425074)
- 119 Strube, C., Haake, C., Sager, H., Schorderet Weber, S., Kaminsky, R., Buschbaum, S., Joekel, D., Schicht, S., Kremmer, E., Korrell, J., *et al.* 2015 Vaccination with recombinant paramyosin against the bovine lungworm *Dictyocaulus viviparus* considerably reduces worm burden and larvae shedding. *Parasites & Vectors*. **8**, 1-12. (doi:10.1186/s13071-015-0733-5)
- 120 Espino, A. M., Osuna, A., Gil, R., Hillyer, G. V. 2005 *Fasciola hepatica*: Humoral and cytokine responses to a member of the saposin-like protein family following delivery as a DNA vaccine in mice. *Experimental Parasitology*. **110**, 374-383. (doi:10.1016/j.exppara.2005.03.029)
- 121 Zhu, Y., Q, H., W, R., A, N., L, L. 2006 Studies on the protective effect of the mutant of Sj23 DNA vaccine against schistosomiasis. *Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi*. **24**, 437-440.
- 122 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)
- 123 Liu, P., Wang, Z. Q., Liu, R. D., Jiang, P., Long, S. R., Liu, L. N., Zhang, X. Z., Cheng, X. C., Yu, C., Ren, H. J., *et al.* 2015 Oral vaccination of mice with *Trichinella spiralis* nudix hydrolase DNA vaccine delivered by attenuated *Salmonella* elicited protective immunity. *Experimental Parasitology*. **153**, 29-38. (doi:10.1016/j.exppara.2015.02.008)
- 124 Ramon, G. 1924 Sur la toxine et sur l'anatoxine diphtériques. *Ann. Inst. steur.* **38**, 1-18.
- 125 Glenny, A. T., Pope, C. G., Waddington, H., Wallace, U. 1926 Immunological Notes: XVII-XXIV. *J Pathology Bacteriology*. **23**, 31-40.

- 126 Freund, J., Casals, J., Hosmer, E. 1937 Sensitization and antibody formation after injection of tubercle bacilli and parafin oil *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. **37**, 509-513.
- 127 Stuart-Harris, C. H. 1969 Adjuvant influenza vaccines *World Health Organ.* **41**, 617-621.
- 128 Johnson, A. G., Gaines, S., Landy, M. 1956 Studies on the O antigen of *Salmonella typhosa*. V. Enhancement of antibody response to protein antigens by the purified lipopolysaccharide. *The Journal of Experimental Medicine*. **103**, 225-246. (doi:10.1084/jem.103.2.225)
- 129 Weiner, G. J., Liu, H.-M., Wooldridge, J. E., Dahle, C. E., Krieg, A. M. 1997 Immunostimulatory oligodeoxynucleotides containing the CpG motif are effective as immune adjuvants in tumor antigen immunization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **94**, 10833-10837.
- 130 Vogel, F. 1988 Adjuvants in perspective. *Dev Biol Stand.* **92**, 241-248.
- 131 Waters, R. V., Terrell, T. G., Jones, G. H. 1986 Uveitis induction in the rabbit by muramyl dipeptides. *Infection and Immunity*. **51**, 816-825.
- 132 Allison, A. C., Byars, N. E. 1991 Immunological adjuvants: desirable properties and side-effects. *Molecular Immunology*. **28**, 279-284.
- 133 Edelman, R. 1980 Vaccine Adjuvants. *Review of Infectious Diseases*. **2**, 370-383.(doi:10.1093/clinids/2.3.370)
- 134 Neutra, M. R., Pringault, E., Kraehenbuhl, J.-P. 1996 Antigen sampling across epithelial barriers and induction of mucosal immune responses. *Annual Review of Immunology*. **14**, 275-300. (doi:10.1146/annurev.immunol.14.1.275)
- 135 Jennings, R., Simms, J. R., Heath, A. W. 1998 Adjuvants and delivery systems for viral vaccines--mechanisms and potential. *Developments in biological standardization*. **92**, 19-28.
- 136 Schirmbeck, R., Melber, K., Mertens, T., Reimann, J. 1994 Antibody and cytotoxic T-cell responses to soluble hepatitis B virus (HBV) S antigen in mice: implication for the pathogenesis of HBV-induced hepatitis. *Journal of Virology*. **68**, 1418-1425.
- 137 Brewer, J. M., Conacher, M., Satoskar, A., Bluethmann, H., Alexander, J. 1996 In interleukin-4-deficient mice, alum not only generates T helper 1 responses equivalent to Freund's complete adjuvant, but continues to induce T helper 2 cytokine production. *European Journal of Immunology*. **26**, 2062-2066. (doi:10.1002/eji.1830260915)

- 138 Giannini, S. L., Hanon, E., Moris, P., Van Mechelen, M., Morel, S., Dessy, F., Fourneau, M. A., Colau, B., Suzich, J., Losonksy, G., *et al.* 2006 Enhanced humoral and memory B cellular immunity using HPV16/18 L1 VLP vaccine formulated with the MPL/aluminium salt combination (AS04) compared to aluminium salt only. *Vaccine*. **24**, 5937-5949. (doi:10.1016/j.vaccine.2006.06.005)
- 139 Audibert, F. M., Lise, L. D. 1993 Adjuvants: current status, clinical perspectives and future prospects. *Immunology Today*. **14**, 281-284. (doi:10.1016/0167-5699(93)90046-N)
- 140 Goto, N., Kato, H., Maeyama, J., Eto, K., Yoshihara, S. 1993 Studies on the toxicities of aluminium hydroxide and calcium phosphate as immunological adjuvants for vaccines. *Vaccine*. **11**, 914-918.
- 141 Swegert, C. V., Dave, K. R., Katyare, S. S. 1999 Effect of aluminium-induced Alzheimer like condition on oxidative energy metabolism in rat liver, brain and heart mitochondria. *Mechanisms of Ageing and Development*. **112**, 27-42. (doi:10.1016/S0047-6374(99)00051-2)
- 142 Gupta, R. K., Siber, G. R. 1995 Adjuvants for human vaccines—current status, problems and future prospects. *Vaccine*. **13**, 1263-1276. (doi:10.1016/0264-410X(95)00011-O)
- 143 Walls, R. S. 1977 Eosinophil response to alum adjuvants: involvement of T cells in non-antigen-dependent mechanisms. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. **156**, 431-435.
- 144 Relyveld, E. H. 1986 Preparation and use of calcium phosphate adsorbed vaccines. *Developments in biological standardization*. **65**, 131-136.
- 145 Cho, W.-S., Dart, K., Nowakowska, D. J., Zheng, X., Donaldson, K., Howie, S. E. M. 2012 Adjuvanticity and toxicity of cobalt oxide nanoparticles as an alternative vaccine adjuvant. *Nanomedicine*. **7**, 1495-1505. (doi:10.2217/nnm.12.35)
- 146 Xu, X., Zhang, D., Sun, W., Zhang, Q., Zhang, J., Xue, X., Shen, L., Pan, W. 2009 A *Schistosoma japonicum* chimeric protein with a novel adjuvant induced a polarized Th1 immune response and protection against liver egg burdens. *BMC Infectious Diseases*. **9**, 1-14. (doi:10.1186/1471-2334-9-54)
- 147 Martínez-Fernández, A. R., Nogal-Ruiz, J. J., López-Abán, J., Ramajo, V., Oleaga, A., Manga-González, Y., Hillyer, G. V., Muro, A. 2004 Vaccination of mice and sheep with Fh12 FABP from *Fasciola hepatica* using the new adjuvant/immunomodulator

- system ADAD. *Veterinary Parasitology*. **126**, 287-298. (doi:10.1016/j.vetpar.2004.07.023)
- 148 Woodard, L., Jasman, R. 1985 Stable oil-in-water emulsions: preparation and use as vaccine vehicles for lipophilic adjuvants. *Vaccine*. **3**, 137-144.
- 149 Aucouturier, J., Dupuis, L., Deville, S., Ascarateil, S., Ganne, V. 2002 Montanide ISA 720 and 51: a new generation of water in oil emulsions as adjuvants for human vaccines. *Expert Review of Vaccines*. **1**, 111-118.
- 150 Morein, B., Sundquist, B., Höglund, S., Dalsgaard, K., Osterhaus, A. 1984 Iscom, a novel structure for antigenic presentation of membrane proteins from enveloped viruses. *Nature*. **308**, 457-460.
- 151 Kensil, C. R. 1996 Saponins as vaccine adjuvants. *Critical reviews in therapeutic drug carrier systems*. **13**, 1-55.
- 152 Kauffmann, C., Machado, A. M., Fleck, J. D., Provensi, G., Pires, V. S., Guillaume, D., Sonnet, P., Reginatto, F. H., Schenkel, E. P., Gosmann, G. 2004 Constituents from leaves of *Quillaja brasiliensis*. *Natural product research*. **18**, 153-157.
- 153 Guo, S., Kenne, L. 2000 Characterization of some O-acetylated saponins from *Quillaja saponaria* Molina. *Phytochemistry*. **54**, 615-623. (doi:10.1016/S0031-9422(00)00161-8)
- 154 Waite, D. C., Jacobson, E. W., Ennis, F. A., Edelman, R., White, B., Kammer, R., Anderson, C., Kensil, C. R. 2001 Three double-blind, randomized trials evaluating the safety and tolerance of different formulations of the saponin adjuvant QS-21. *Vaccine*. **19**, 3957-3967. (doi:10.1016/S0264-410X(01)00142-6)
- 155 Marty-Roix, R., Vladimer, G. I., Pouliot, K., Weng, D., Buglione-Corbett, R., West, K., MacMicking, J. D., Chee, J. D., Wang, S., Lu, S., *et al.* 2016 Identification of QS-21 as an Inflammasome-activating Molecular Component of Saponin Adjuvants. *Journal of Biological Chemistry*. **291**, 1123-1136. (doi:10.1074/jbc.M115.683011)
- 156 de Costa, F., Yendo, A. C. A., Cibulski, S. P., Fleck, J. D., Roehle, P. M., Spilki, F. R., Gosmann, G., Fett-Neto, A. G. 2014 Alternative Inactivated Poliovirus Vaccines Adjuvanted with *Quillaja brasiliensis* or Quil-A Saponins Are Equally Effective in Inducing Specific Immune Responses. *PLoS ONE*. **9**, e105374. (doi:10.1371/journal.pone.0105374)
- 157 Cibulski, S. P., Mourglia-Ettlin, G., Teixeira, T. F., Quirici, L., Roehle, P. M., Ferreira, F., Silveira, F. 2016 Novel ISCOMs from *Quillaja brasiliensis* saponins

- induce mucosal and systemic antibody production, T-cell responses and improved antigen uptake. *Vaccine*. **34**, 1162-1171. (doi:10.1016/j.vaccine.2016.01.029)
- 158 Leroux-Roels, G., Van Belle, P., Vandepapeliere, P., Horsmans, Y., Janssens, M., Carletti, I., Garçon, N., Wettendorff, M., Van Mechelen, M. 2015 Vaccine Adjuvant Systems containing monophosphoryl lipid A and QS-21 induce strong humoral and cellular immune responses against hepatitis B surface antigen which persist for at least 4 years after vaccination. *Vaccine*. **33**, 1084-1091. (doi:10.1016/j.vaccine.2014.10.078)
- 159 Ragupathi, G., Gardner, J. R., Livingston, P. O., Gin, D. Y. 2011 Natural and synthetic saponin adjuvant QS-21 for vaccines against cancer. *Expert Review of Vaccines*. **10**, 463-470. (doi:10.1586/erv.11.18)
- 160 Guo, R., Geng, S., Jiao, H., Pan, Z., Chen, X., Jiao, X. 2016 Evaluation of protective efficacy of a novel inactivated *Salmonella Pullorum* ghost vaccine against virulent challenge in chickens. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. **173**, 27-33. (doi:10.1016/j.vetimm.2016.03.015)
- 161 Jalava, K., Hensel, A., Szostak, M., Resch, S., Lubitz, W. 2002 Bacterial ghosts as vaccine candidates for veterinary applications. *Journal of Controlled Release*. **85**, 17-25. (doi:10.1016/S0168-3659(02)00267-5)
- 162 Mayr, U. B., Kudela, P., Atrasheuskaya, A., Bukin, E., Ignatyev, G., Lubitz, W. 2012 Rectal single dose immunization of mice with *Escherichia coli* O157:H7 bacterial ghosts induces efficient humoral and cellular immune responses and protects against the lethal heterologous challenge. *Microbial biotechnology*. **5**, 283-294. (doi:10.1111/j.1751-7915.2011.00316.x)
- 163 Barton, G. M., Medzhitov, R. 2002 Control of adaptive immune responses by Toll-like receptors. *Current Opinion in Immunology*. **14**, 380-383. (doi:10.1016/S0952-7915(02)00343-6)
- 164 Ogawa, C., Liu, Y.-J., Kobayashi, K. S. 2011 Muramyl dipeptide and its derivatives: peptide adjuvant in immunological disorders and cancer therapy. *Current bioactive compounds*. **7**, 180-197. (doi:10.2174/157340711796817913)
- 165 Gobec, M., Mlinarič-Raščan, I., Dolenc, M. S., Jakopin, Ž. 2016 Structural requirements of acylated Gly-l-Ala-d-Glu analogs for activation of the innate immune receptor NOD2. *European Journal of Medicinal Chemistry*. **116**, 1-12. (doi:10.1016/j.ejmech.2016.03.030)
- 166 Kolanowski, S. T. H. M., Lissenberg-Thunnissen, S. N., Emal, D., van Ham, S. M., ten Brinke, A. 2016 Monophosphoryl lipid A-induced pro-inflammatory cytokine

expression does not require CD14 in primary human dendritic cells. *Inflammation Research*. **65**, 449-458. (doi:10.1007/s00011-016-0927-0)

167 Khan, A. A., Chee, S. H., McLaughlin, R. J., Harper, J. L., Kamena, F., Timmer, M. S. M., Stocker, B. L. 2011 Long-Chain Lipids are required for the innate immune recognition of trehalose diesters by macrophages. *A European Journal of chemical biology*. **12**, 2572–2576. (doi:10.1002/cbic.201100451)

168 Ma, Y. 2016 Recent advances in nontoxic *Escherichia coli* heat-labile toxin and its derivative adjuvants. *Expert Review of Vaccines*. 1-11. (doi:10.1080/14760584.2016.1182868)

169 Douce, G., Fontana, M., Pizza, M., Rappuoli, R., Dougan, G. 1997 Intranasal immunogenicity and adjuvanticity of site-directed mutant derivatives of cholera toxin. *Infection and Immunity*. **65**, 2821-2828.

170 Sunahara, R. K., Dessauer, C. W., Whisnant, R. E., Kleuss, C., Gilman, A. G. 1997 Interaction of Gs α with the Cytosolic Domains of Mammalian Adenylyl Cyclase. *Journal of Biological Chemistry*. **272**, 22265-22271. (doi:10.1074/jbc.272.35.22265)

171 Lycke, N., Tsuji, T., Holmgren, J. 1992 The adjuvant effect of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli* heat-labile enterotoxins is linked to their ADP-ribosyltransferase activity. *European Journal of Immunology*. **22**, 2277-2281. (doi:10.1002/eji.1830220915)

172 Williamson, E., Westrich, G. M., Viney, J. L. 1999 Modulating Dendritic Cells to Optimize Mucosal Immunization Protocols. *The Journal of Immunology*. **163**, 3668-3675.

173 Datta, S. K., Sabet, M., Nguyen, K. P. L., Valdez, P. A., Gonzalez-Navajas, J. M., Islam, S., Mihajlov, I., Fierer, J., Insel, P. A., Webster, N. J., *et al.* 2010 Mucosal adjuvant activity of cholera toxin requires Th17 cells and protects against inhalation anthrax. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **107**, 10638-10643. (doi:10.1073/pnas.1002348107)

174 Xu-Amano, J., Kiyono, H., Jackson, R. J., Staats, H. F., Fujihashi, K., Burrows, P. D., Elson, C. O., Pillai, S., McGhee, J. R. 1993 Helper T cell subsets for immunoglobulin A responses: oral immunization with tetanus toxoid and cholera toxin as adjuvant selectively induces Th2 cells in mucosa associated tissues. *The Journal of Experimental Medicine*. **178**, 1309-1320. (doi:10.1084/jem.178.4.1309)

175 Yamamoto, S., Kiyono, H., Yamamoto, M., Imaoka, K., Yamamoto, M., Fujihashi, K., Van Ginkel, F. W., Noda, M., Takeda, Y., McGhee, J. R. 1997 A nontoxic mutant of

- cholera toxin elicits Th2-type responses for enhanced mucosal immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **94**, 5267-5272.
- 176 Mattsson, J., Schon, K., Ekman, L., Fahlen-Yrlid, L., Yrlid, U., Lycke, N. Y. 2015 Cholera toxin adjuvant promotes a balanced Th1/Th2/Th17 response independently of IL-12 and IL-17 by acting on G α in CD11b⁺ DCs. *Mucosal Immunol.* **8**, 815-827. (doi:10.1038/mi.2014.111)
- 177 Sun, J. B., Czerkinsky, C., Holmgren, J. 2010 Mucosally induced Immunological Tolerance, Regulatory T Cells and the Adjuvant Effect by Cholera Toxin B Subunit. *Scandinavian Journal of Immunology.* **71**, 1-11. (doi:10.1111/j.1365-3083.2009.02321.x)
- 178 Matsuo, K., Yoshikawa, T., Asanuma, H., Iwasaki, T., Hagiwara, Y., Chen, Z., Kadowaki, S.-e., Tsujimoto, H., Kurata, T., Tamura, S.-i. 2000 Induction of innate immunity by nasal influenza vaccine administered in combination with an adjuvant (cholera toxin). *Vaccine.* **18**, 2713-2722. (doi:10.1016/S0264-410X(00)00055-4)
- 179 Shek, P. N., Yung, B. Y., Stanacev, N. Z. 1983 Comparison between multilamellar and unilamellar liposomes in enhancing antibody formation. *Immunology.* **49**, 37-44.
- 180 Allison, A. G., Gregoriadis, G. 1974 Liposomes as immunological adjuvants. *Nature.* **252**, 252. (doi:10.1038/252252a0)
- 181 Heath, T. D., Edwards, D. C., Ryman, B. E. 1976 The Adjuvant Properties of Liposomes. *Biochemical Society Transactions.* **4**, 129-133.
- 182 Bozzuto, G., Molinari, A. 2015 Liposomes as nanomedical devices. *International Journal of Nanomedicine.* **10**, 975-999. (doi:10.2147/IJN.S68861)
- 183 Kim, Y. J., Liu, Y., Li, S., Rohrs, J., Zhang, R., Zhang, X., Wang, P. 2015 Co-Eradication of Breast Cancer Cells and Cancer Stem Cells by Cross-Linked Multilamellar Liposomes Enhances Tumor Treatment. *Molecular Pharmaceutics.* **12**, 2811-2822. (doi:10.1021/mp500754r)
- 184 Wang, X., Li, D., Ghali, L., Xia, R., Munoz, L. P., Garelick, H., Bell, C., Wen, X. 2016 Therapeutic Potential of Delivering Arsenic Trioxide into HPV-Infected Cervical Cancer Cells Using Liposomal Nanotechnology. *Nanoscale Research Letters.* **11**, 1-8. (doi:10.1186/s11671-016-1307-y)
- 185 Tanaka, Y., Taneichi, M., Kasai, M., Kakiuchi, T., Uchida, T. 2010 Liposome-Coupled Antigens Are Internalized by Antigen-Presenting Cells via Pinocytosis and Cross-Presented to CD8⁺ T Cells. *PLoS ONE.* **5**, e15225. (doi:10.1371/journal.pone.0015225)

- 186 Taneichi, M., Tanaka, Y., Kakiuchi, T., Uchida, T. 2010 Liposome-Coupled Peptides Induce Long-Lived Memory CD8⁺ T Cells Without CD4⁺ T Cells. *PLoS ONE*. **5**, e15091. (doi:10.1371/journal.pone.0015091)
- 187 Mardani, G., Bolhassani, A., Agi, E., Shahbazi, S., Mehdi Sadat, S. 2016 Protein vaccination with HPV16 E7/Pep-1 nanoparticles elicits a protective T-helper cell-mediated immune response. *IUBMB Life*. **68**, 459-467. (doi:10.1002/iub.1503)
- 188 Bae, J., Park, J. W. 2015 Preparation of an injectable depot system for long-term delivery of alendronate and evaluation of its anti-osteoporotic effect in an ovariectomized rat model. *International Journal of Pharmaceutics*. **480**, 37-47. (doi:10.1016/j.ijpharm.2015.01.020)
- 189 Orning, P., Hoem, K. S., Coron, A. E., Skjåk-Bræk, G., Mollnes, T. E., Brekke, O.-L., Espevik, T., Rokstad, A. M. 2016 Alginate microsphere compositions dictate different mechanisms of complement activation with consequences for cytokine release and leukocyte activation. *Journal of Controlled Release*. **229**, 58-69. (doi:10.1016/j.jconrel.2016.03.021)
- 190 Samal, J., Hoban, D. B., Naughton, C., Concannon, R., Dowd, E., Pandit, A. 2015 Fibrin-based microsphere reservoirs for delivery of neurotrophic factors to the brain. *Nanomedicine*. **10**, 765-783. (doi:10.2217/nnm.14.221)
- 191 Lio, D., Yeo, D., Xu, C. 2016 Control of Alginate Core Size in Alginate-Poly (Lactic-Co-Glycolic) Acid Microparticles. *Nanoscale Research Letters*. **11**, 1-6. (doi:10.1186/s11671-015-1222-7)
- 192 Malyala, P., O'Hagan, D. T., Singh, M. 2009 Enhancing the therapeutic efficacy of CpG oligonucleotides using biodegradable microparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews*. **61**, 218-225. (doi:10.1016/j.addr.2008.12.009)
- 193 Manmohan, S., Jina, K., Mildred, U., Padma, M., James, C., Derek, T. O. H. 2006 Polylactide-Co-Glycolide Microparticles with Surface Adsorbed Antigens as Vaccine Delivery Systems. *Current Drug Delivery*. **3**, 115-120. (doi:10.2174/156720106775197565)
- 194 Zhang, N.-Z., Xu, Y., Wang, M., Chen, J., Huang, S.-Y., Gao, Q., Zhu, X.-Q. 2016 Vaccination with *Toxoplasma gondii* calcium-dependent protein kinase 6 and rhoptyr protein 18 encapsulated in poly(lactide-co-glycolide) microspheres induces long-term protective immunity in mice. *BMC Infectious Diseases*. **16**, 1-11. (doi:10.1186/s12879-016-1496-0)

- 195 Ballesteros, N. A., Alonso, M., Saint-Jean, S. R., Perez-Prieto, S. I. 2015 An oral DNA vaccine against infectious haematopoietic necrosis virus (IHNV) encapsulated in alginate microspheres induces dose-dependent immune responses and significant protection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish & Shellfish Immunology*. **45**, 877-888. (doi:10.1016/j.fsi.2015.05.045)
- 196 Walters, A. A., Krastev, C., Hill, A. V. S., Milicic, A. 2015 Next generation vaccines: single-dose encapsulated vaccines for improved global immunisation coverage and efficacy. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. **67**, 400-408. (doi:10.1111/jphp.12367)
- 197 Gamvrellis, A., Gloster, S., Jefferies, M., Mottram, P. L., Smooker, P., Plebanski, M., Scheerlinck, J.-P. Y. 2013 Characterisation of local immune responses induced by a novel nano-particle based carrier-adjuvant in sheep. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. **155**, 21-29. (doi:10.1016/j.vetimm.2013.05.015)
- 198 Lendemans, D. G., Egert, A. M., Hook, S., Rades, T. 2007 Cage-like complexes formed by DOTAP, Quil-A and cholesterol. *International Journal of Pharmaceutics*. **332**, 192-195. (doi:10.1016/j.ijpharm.2006.09.029)
- 199 Beacock-Sharp, H., Donachie, A. M., Robson, N. C., Mowat, A. M. 2003 A role for dendritic cells in the priming of antigen-specific CD4+ and CD8+ T lymphocytes by immune-stimulating complexes in vivo. *International Immunology*. **15**, 711-720. (doi:10.1093/intimm/dxg067)
- 200 Bigaeva, E., Doorn, E. v., Liu, H., Hak, E. 2016 Meta-Analysis on Randomized Controlled Trials of Vaccines with QS-21 or ISCOMATRIX Adjuvant: Safety and Tolerability. *PLoS ONE*. **11**, e0154757. (doi:10.1371/journal.pone.0154757)
- 201 Thrane, S., Janitzek, C. M., Matondo, S., Resende, M., Gustavsson, T., de Jongh, W. A., Clemmensen, S., Roeffen, W., van de Vegte-Bolmer, M., van Gemert, G. J., *et al.* 2016 Bacterial superglue enables easy development of efficient virus-like particle based vaccines. *Journal of Nanobiotechnology*. **14**, 1-16. (doi:10.1186/s12951-016-0181-1)
- 202 Tamminen, K., Malm, M., Vesikari, T., Blazevic, V. 2016 Mucosal Antibodies Induced by Intranasal but Not Intramuscular Immunization Block Norovirus GII.4 Virus-Like Particle Receptor Binding. *Viral Immunology*. (doi:10.1089/vim.2015.0141)
- 203 Aguilar, J. C., Lobaina, Y., Muzio, V., Garcia, D., Penton, E., Iglesias, E., Pichardo, D., Urquiza, D., Rodriguez, D., Silva, D., *et al.* 2004 Development of a nasal vaccine for chronic hepatitis B infection that uses the ability of hepatitis B core antigen

to stimulate a strong Th1 response against hepatitis B surface antigen. *Immunol Cell Biol.* **82**, 539-546.

204 Benmohamed, L., Gras-Masse, H., Tartar, A., Daubersies, P., Brahimi, K., Bossus, M., Thomas, A., Druilhe, P. 1997 Lipopeptide immunization without adjuvant induces potent and long-lasting B, T helper, and cytotoxic T lymphocyte responses against a malaria liver stage antigen in mice and chimpanzees. *European Journal of Immunology.* **27**, 1242-1253. (doi:10.1002/eji.1830270528)

205 Hopp, T. P. 1984 Immunogenicity of a synthetic HBsAg peptide: enhancement by conjugation to a fatty acid carrier. *Molecular Immunology.* **21**, 13-16.

206 Schild, H., Deres, K., Wiesmüller, K.-H., Jung, G., Rammensee, H.-G. 1991 Efficiency of peptides and lipopeptides for in vivo priming of virus-specific cytotoxic T cells. *European Journal of Immunology.* **21**, 2649-2654. (doi:10.1002/eji.1830211102)

207 Nardelli, B., Tam, J. P. 1993 Cellular immune responses induced by in vivo priming with a lipid-conjugated multimeric antigen peptide. *Immunology.* **79**, 355-361.

208 Deprez, B., Sauzet, J.-P., Boutillon, C., Martinon, F., Tartar, A., Sergheraert, C., Guillet, J.-G., Gomard, E., Gras-Masse, H. 1996 Comparative efficiency of simple lipopeptide constructs for in vivo induction of virus-specific CTL. *Vaccine.* **14**, 375-382. (doi:10.1016/0264-410X(95)00220-U)

209 Loleit, M., Ihlenfeldt, H. G., Brünjes, J., Jung, G., Müller, B., Hoffmann, P., Bessler, W. G., Pierres, M., Haas, G. 1996 Synthetic peptides coupled to the lipotriptide P3CSS induce in vivo B and Thelper cell responses to HIV-1 reverse transcriptase. *Immunobiology.* **195**, 61-76.

210 Benmohamed, L., Thomas, A., Bossus, M., Brahimi, K., Wubben, J., Gras-Masse, H., Druilhe, P. 2000 High immunogenicity in chimpanzees of peptides and lipopeptides derived from four new *Plasmodium falciparum* pre-erythrocytic molecules. *Vaccine.* **18**, 2843-2855. (doi:10.1016/S0264-410X(00)00068-2)

211 BenMohamed, L., Krishnan, R., Auge, C., Primus, J. F., Diamond, D. J. 2002 Intranasal administration of a synthetic lipopeptide without adjuvant induces systemic immune responses. *Immunology.* **106**, 113-121. (doi:10.1046/j.1365-2567.2002.01396.x)

212 Stephenson, R., You, H., McManus, D., Toth, I. 2014 Schistosome Vaccine Adjuvants in Preclinical and Clinical Research. *Vaccines.* **2**, 654.

213 Li, Z., Wang, G., Wang, Y., Zhang, C., Huang, B., Li, Q., Li, L., Xue, B., Ding, P., Cai, X., *et al.* 2015 Immune responses of pigs immunized with a recombinant porcine

- reproductive and respiratory syndrome virus expressing porcine GM-CSF. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. **168**, 40-48. (doi:10.1016/j.vetimm.2015.08.003)
- 214 Osada, T., Berglund, P., Morse, M. A., Hubby, B., Lewis, W., Niedzwiecki, D., Yang, X. Y., Hobeika, A., Burnett, B., Devi, G. R., *et al.* 2012 Co-delivery of antigen and IL-12 by Venezuelan equine encephalitis virus replicon particles enhances antigen-specific immune responses and antitumor effects. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. **61**, 1941-1951. (doi:10.1007/s00262-012-1248-y)
- 215 Eberl, M., Beck, E., Coulson, P. S., Okamura, H., Wilson, R. A., Mountford, A. P. 2000 IL-18 potentiates the adjuvant properties of IL-12 in the induction of a strong Th1 type immune response against a recombinant antigen. *Vaccine*. **18**, 2002-2008. (doi:10.1016/S0264-410X(99)00532-0)
- 216 Khan, T., Heffron, C. L., High, K. P., Roberts, P. C. 2014 Membrane-bound IL-12 and IL-23 serve as potent mucosal adjuvants when co-presented on whole inactivated influenza vaccines. *Virology Journal*. **11**, 1-8. (doi:10.1186/1743-422x-11-78)
- 217 Bobanga, I. D., Petrosiute, A., Huang, A. Y. 2013 Chemokines as Cancer Vaccine Adjuvants. *Vaccines*. **1**, 444-462. (doi:10.3390/vaccines1040444)
- 218 Zhang, W., Zheng, X., Cheng, N., Gai, W., Xue, X., Wang, Y., Gao, Y., Shan, J., Yang, S., Xia, X. 2016 *Isatis indigotica* root polysaccharides as adjuvants for an inactivated rabies virus vaccine. *International Journal of Biological Macromolecules*. **87**, 7-15. (doi:10.1016/j.ijbiomac.2016.02.023)
- 219 Tizard, I. R., Carpenter, R. H., McAnalley, B. H., Kemp, M. C. 1989 The biological activities of mannans and related complex carbohydrates. *Molecular biotherapy*. **1**, 290-296.
- 220 Sheets, M. A., Unger, B. A., Giggelman, G. F. J., Tizard, I. R. 1991 Studies of the effect of acemannan on retrovirus infections: clinical stabilization of feline leukemia virus-infected cats. *Molecular biotherapy*. **3**, 41-45.
- 221 Cooper, P. D. 1995 Vaccine adjuvants based on gamma inulin. *Pharmaceutical biotechnology*. **6**, 559-580.
- 222 Silva, D. G., Cooper, P. D., Petrovsky, N. 2004 Inulin-derived adjuvants efficiently promote both Th1 and Th2 immune responses. *Immunol Cell Biol*. **82**, 611-616.
- 223 Mutwiri, G., Gerdts, V., Lopez, M., A, B. L. 2007 Innate immunity and new adjuvants. *Revue scientifique et technique*. **26**, 147-156.
- 224 Mutwiri, G., Benjamin, P., Soita, H., Townsend, H., Yost, R., Roberts, B., Andrianov, A. K., Babiuk, L. A. 2007 Poly[di(sodium

- carboxylatoethylphenoxy)phosphazene] (PCEP) is a potent enhancer of mixed Th1/Th2 immune responses in mice immunized with influenza virus antigens. *Vaccine*. **25**, 1204-1213. (doi:10.1016/j.vaccine.2006.10.011)
- 225 Henke, H., Posch, S., Brüggemann, O., Teasdale, I. 2016 Polyphosphazene Based Star-Branched and Dendritic Molecular Brushes. *Macromolecular Rapid Communications*. **37**, 769-774. (doi:10.1002/marc.201600057)
- 226 Gao, M., Zhu, X., Wu, L., Qiu, L. 2016 Cationic Polyphosphazene Vesicles for Cancer Immunotherapy by Efficient in Vivo Cytokine IL-12 Plasmid Delivery. *Biomacromolecules*. (doi:10.1021/acs.biomac.6b00433)
- 227 Tokunaga, T., Yamamoto, H., Shimada, S., Abe, H., Fukuda, T., Fujisawa, Y., Furutani, Y., Yano, O., Kataoka, T., Sudo, T. 1984 Antitumor activity of deoxyribonucleic acid fraction from Mycobacterium bovis BCG. I. Isolation, physicochemical characterization, and antitumor activity. *Journal of the national cancer institute*. **72**, 955-962.
- 228 Krieg, A. M. 2002 CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annual Review of Immunology*. **20**, 709-760. (doi:10.1146/annurev.immunol.20.100301.064842)
- 229 Gursel, I., Gursel, M., Yamada, H., Ishii, K. J., Takeshita, F., Klinman, D. M. 2003 Repetitive Elements in Mammalian Telomeres Suppress Bacterial DNA-Induced Immune Activation. *The Journal of Immunology*. **171**, 1393-1400. (doi:10.4049/jimmunol.171.3.1393)
- 230 Davis, H. L., Weeranta, R., Waldschmidt, T. J., Tygrett, L., Schorr, J., Krieg, A. M. 1998 CpG DNA Is a Potent Enhancer of Specific Immunity in Mice Immunized with Recombinant Hepatitis B Surface Antigen. *The Journal of Immunology*. **160**, 870-876.
- 231 Cornélie, S., Hoebeke, J., Schacht, A.-M., Bertin, B., Vicogne, J., Capron, M., Riveau, G. 2004 Direct Evidence that Toll-like Receptor 9 (TLR9) Functionally Binds Plasmid DNA by Specific Cytosine-phosphate-guanine Motif Recognition. *Journal of Biological Chemistry*. **279**, 15124-15129. (doi:10.1074/jbc.M313406200)
- 232 Datta, S. K., Cho, H. J., Takabayashi, K., Horner, A. A., Raz, E. 2004 Antigen-immunostimulatory oligonucleotide conjugates: mechanisms and applications. *Immunological Reviews*. **199**, 217-226. (doi:10.1111/j.0105-2896.2004.00149.x)
- 233 Aguilar, J. C., Rodríguez, E. G. 2007 Vaccine adjuvants revisited. *Vaccine*. **25**, 3752-3762. (doi:10.1016/j.vaccine.2007.01.111)

- 234 Lustigman, S., Zhang, J., Liu, J., Oksov, Y., Hashmi, S. 2004 RNA interference targeting cathepsin L and Z-like cysteine proteases of *Onchocerca volvulus* confirmed their essential function during L3 molting. *Molecular and Biochemical Parasitology*. **138**, 165-170. (doi:10.1016/j.molbiopara.2004.08.003)
- 235 Islam, M. K., Miyoshi, T., Yamada, M., Tsuji, N. 2005 Pyrophosphatase of the Roundworm *Ascaris suum* Plays an Essential Role in the Worm's Molting and Development. *Infection and Immunity*. **73**, 1995-2004. (doi:10.1128/iai.73.4.1995-2004.2005)
- 236 Aboobaker, A. A., Blaxter, M. L. 2003 Use of RNA interference to investigate gene function in the human filarial nematode parasite *Brugia malayi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. **129**, 41-51. (doi:10.1016/S0166-6851(03)00092-6)
- 237 Hu, M., Abs El-Osta, Y. G., Campbell, B. E., Boag, P. R., Nisbet, A. J., Beveridge, I., Gasser, R. B. 2007 *Trichostrongylus vitrinus* (Nematoda: Strongylida): Molecular characterization and transcriptional analysis of Tv-stp-1, a serine/threonine phosphatase gene. *Experimental Parasitology*. **117**, 22-34. (doi:10.1016/j.exppara.2007.03.008)
- 238 Solano-Parada, J., Gonzalez-Gonzalez, G., de Pablos Torr , L. M., Brazil dos Santos, M. F., Espino, A. M., Burgos, M., Osuna, A. 2010 Effectiveness of intranasal vaccination against *Angiostrongylus costaricensis* using a serine/threonine phosphatase 2 A synthetic peptide and recombinant antigens. *Vaccine*. **28**, 5185-5196. (doi:10.1016/j.vaccine.2010.05.072)
- 239 Hunter, T. 1999 The role of tyrosine phosphorylation in cell growth and disease. *Harvey lectures*. **94**, 81-119.
- 240 Andersen, J. N., Jansen, P. G., Echwald, S. M., Mortensen, O. H., Fukada, T., Del Vecchio, R., Tonks, N. K., M ller, N. p. H. 2004 A genomic perspective on protein tyrosine phosphatases: gene structure, pseudogenes, and genetic disease linkage. *The FASEB Journal*. **18**, 8-30. (doi:10.1096/fj.02-1212rev)
- 241 Barford, D. 1996 Molecular mechanisms of the protein serine/threonine phosphatases. *Trends in Biochemical Sciences*. **21**, 407-412. (doi:10.1016/S0968-0004(96)10060-8)
- 242 David Barford, Amit K. Das, a., Egloff, M.-P. 1998 The structure and mechanism of Protein Phosphatases: Insights into Catalysis and Regulation. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*. **27**, 133-164. (doi:10.1146/annurev.biophys.27.1.133)

- 243 Kennelly, P. J. 2003 Archaeal protein kinases and protein phosphatases: insights from genomics and biochemistry. *Biochemical Journal*. **370**, 373-389. (doi:10.1042/BJ20021547)
- 244 Cozzone, A. J., Grangeasse, C., Doublet, P., Duclos, B. 2004 Protein phosphorylation on tyrosine in bacteria. *Archives of Microbiology*. **181**, 171-181. (doi:10.1007/s00203-003-0640-6)
- 245 Barford, D., Das, A. K., Egloff, M.-P. 1998 THE STRUCTURE AND MECHANISM OF PROTEIN PHOSPHATASES: Insights into Catalysis and Regulation. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*. **27**, 133-164. (doi:10.1146/annurev.biophys.27.1.133)
- 246 Sarmiento, M., Zhao, Y., Gordon, S. J., Zhang, Z.-Y. 1998 Molecular Basis for Substrate Specificity of Protein-tyrosine Phosphatase 1B. *Journal of Biological Chemistry*. **273**, 26368-26374. (doi:10.1074/jbc.273.41.26368)
- 247 Cohen, P. T. W. 1997 Novel protein serine/threonine phosphatases: Variety is the spice of life. *Trends in Biochemical Sciences*. **22**, 245-251. (doi:10.1016/S0968-0004(97)01060-8)
- 248 Herzig, S., Neumann, J. 2000 Effects of Serine/Threonine Protein Phosphatases on Ion Channels in Excitable Membranes. *Physiological Reviews*. **80**, 173-210.
- 249 Krebs, E., Fischer, E. 1964 Phosphorylase and related enzymes of glycogen metabolism. *Vitam Horm.* **22**, 399-410.
- 250 Cohen, P. 1990 The structure and regulation of protein phosphatases. *Advances in second messenger and phosphoprotein research*. **24**, 230-235.
- 251 Faux, M. C., Scott, J. D. 1996 More on target with proteinphosphorylation: conferring specificity by location. *Trends in Biochemical Sciences*. **21**, 312-315. (doi:10.1016/S0968-0004(96)10040-2)
- 252 Armstrong, C. G., Mann, D. J., Berndt, N., Cohen, P. T. 1995 Drosophila PPY, a novel male specific protein serine/threonine phosphatase localised in somatic cells of the testis. *Journal of Cell Science*. **108**, 3367-3375.
- 253 Chin-Sang, I. D., Spence, A. M. 1996 Caenorhabditis elegans sex-determining protein FEM-2 is a protein phosphatase that promotes male development and interacts directly with FEM-3. *Genes & Development*. **10**, 2314-2325. (doi:10.1101/gad.10.18.2314)
- 254 Chun, Y.-S., Park, J.-W., Kim, G.-T., Shima, H., Nagao, M., Kim, M.-S., Chung, M.-H. 2000 A sds22 Homolog That Is Associated with the Testis-Specific

- Serine/Threonine Protein Phosphatase 1 γ 2 in Rat Testis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **273**, 972-976. (doi:10.1006/bbrc.2000.3045)
- 255 Choi, J., Nannenga, B., Demidov, O. N., Bulavin, D. V., Cooney, A., Brayton, C., Zhang, Y., Mbawuiké, I. N., Bradley, A., Appella, E., *et al.* 2002 Mice Deficient for the Wild-Type p53-Induced Phosphatase Gene (Wip1) Exhibit Defects in Reproductive Organs, Immune Function, and Cell Cycle Control. *Molecular and Cellular Biology*. **22**, 1094-1105. (doi:10.1128/mcb.22.4.1094-1105.2002)
- 256 Kitagawa, Y., Sasaki, K., Shima, H., Shibuya, M., Sugimura, T., Nagao, M. 1990 Protein phosphatases possibly involved in rat spermatogenesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **171**, 230-235. (doi:10.1016/0006-291X(90)91381-2)
- 257 Smith, G. D., Wolf, D. P., Trautman, K. C., da Cruz e Silva, E. F., Greengard, P., Vijayaraghavan, S. 1996 Primate sperm contain protein phosphatase 1, a biochemical mediator of motility. *Biology of Reproduction*. **54**, 719-727. (doi:10.1095/biolreprod54.3.719)
- 258 Varmuza, S., Jurisicova, A., Okano, K., Hudson, J., Boekelheide, K., Shipp, E. B. 1999 Spermiogenesis Is Impaired in Mice Bearing a Targeted Mutation in the Protein Phosphatase 1 γ Gene. *Developmental Biology*. **205**, 98-110. (doi:10.1006/dbio.1998.9100)
- 259 Reinke, V., Smith, H. E., Nance, J., Wang, J., Van Doren, C., Begley, R., Jones, S. J. M., Davis, E. B., Scherer, S., Ward, S., *et al.* 2000 A Global Profile of Germline Gene Expression in *C. elegans*. *Molecular Cell*. **6**, 605-616. (doi:10.1016/S1097-2765(00)00059-9)
- 260 Turowski, P., Favre, B., Campbell, K. S., Lamb, N. J. C., Hemmings, B. A. 1997 Modulation of the Enzymatic Properties of Protein Phosphatase 2A Catalytic Subunit by the Recombinant 65-kDa Regulatory Subunit PR65 α . *European Journal of Biochemistry*. **248**, 200-208. (doi:10.1111/j.1432-1033.1997.t01-1-00200.x)
- 261 Goris, J., Hermann, J., Hendrix, P., Ozon, R., Merlevede, W. 1989 Okadaic acid, a specific protein phosphatase inhibitor, induces maturation and MPF formation in *Xenopus laevis* oocytes. *FEBS Letters*. **245**, 91-94. (doi:10.1016/0014-5793(89)80198-X)
- 262 Santoro, M. F., Annand, R. R., Robertson, M. M., Peng, Y.-W., Brady, M. J., Mankovich, J. A., Hackett, M. C., Ghayur, T., Walter, G., Wong, W. W., *et al.* 1998

- Regulation of Protein Phosphatase 2A Activity by Caspase-3 during Apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*. **273**, 13119-13128. (doi:10.1074/jbc.273.21.13119)
- 263 Zimmermann, M., Arachchige-Don, A. S., Donaldson, M. S., Dallapiazza, R. F., Cowan, C. E., Horne, M. C. 2012 Elevated Cyclin G2 Expression Intersects with DNA Damage Checkpoint Signaling and Is Required for a Potent G2/M Checkpoint Arrest Response to Doxorubicin. *Journal of Biological Chemistry*. **287**, 22838-22853. (doi:10.1074/jbc.M112.376855)
- 264 Janssens, V., Goris, J. 2001 Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. *Biochemical Journal*. **353**, 417-439.
- 265 Hong, Y., Sarge, K. D. 1999 Regulation of Protein Phosphatase 2A Activity by Heat Shock Transcription Factor 2. *Journal of Biological Chemistry*. **274**, 12967-12970. (doi:10.1074/jbc.274.19.12967)
- 266 Green, D. D., Yang, S. I., Mumby, M. C. 1987 Molecular cloning and sequence analysis of the catalytic subunit of bovine type 2A protein phosphatase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **84**, 4880-4884.
- 267 Arino, J., Woon, C. W., Brautigan, D. L., Miller, T. B., Johnson, G. L. 1988 Human liver phosphatase 2A: cDNA and amino acid sequence of two catalytic subunit isotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **85**, 4252-4256.
- 268 Stone, S. R., Hofsteenge, J., Hemmings, B. A. 1987 Molecular cloning of cDNAs encoding two isoforms of the catalytic subunit of protein phosphatase 2A. *Biochemistry*. **26**, 7215-7220.
- 269 Khew-Goodall, Y., Hemmings, B. A. 1988 Tissue-specific expression of mRNAs encoding α - and β -catalytic subunits of protein phosphatase 2A. *FEBS Letters*. **238**, 265-268. (doi:10.1016/0014-5793(88)80493-9)
- 270 Berndt, N., Campbell, D. G., Caudwell, F. B., Cohen, P., da Cruz e Silva, E. F., da Cruz e Silva, O. B., Cohen, P. T. W. 1987 Isolation and sequence analysis of a cDNA clone encoding a type-1 protein phosphatase catalytic subunit: Homology with protein phosphatase 2A. *FEBS Letters*. **223**, 340-346. (doi:10.1016/0014-5793(87)80316-2)
- 271 da Cruz e Silva, O. B., Cohen, P. T. W. 1987 A second catalytic subunit of type-2A protein phosphatase from rabbit skeletal muscle. *FEBS Letters*. **226**, 176-178. (doi:10.1016/0014-5793(87)80574-4)

- 272 Ariño, J., Pérez-Callejón, E., Cunillera, N., Camps, M., Posas, F., Ferrer, A. 1993 Protein phosphatases in higher plants: multiplicity of type 2A phosphatases in *Arabidopsis thaliana*. *Plant molecular biology*. **21**, 475-485.
- 273 Hemmings, B. A., Wernet, W., Mayer, R., Maurer, F., Hofsteenge, J., Stone, S. R. 1988 The nucleotide sequence of the cDNA encoding the human lung protein phosphatase 2A beta catalytic subunit. *Nucleic Acids Research*. **16**, 11366.
- 274 Kitagawa, Y., Sakai, R., Tahira, T., Tsuda, H., Ito, N., Sugimura, T., Nagao, M. 1988 Molecular cloning of rat phosphoprotein phosphatase 2A β cDNA and increased expressions of phosphatase 2A α and 2A β in rat liver tumors. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **157**, 821-827. (doi:10.1016/S0006-291X(88)80323-1)
- 275 Stone, S. R., Mayer, R., Wernet, W., Maurer, F., Hofsteenge, J., Hemmings, B. A. 1988 The nucleotide sequence of the cDNA encoding the human lung protein phosphatase 2A alpha catalytic subunit. *Nucleic Acids Research*. **16**, 11365.
- 276 Cormier, P., Osborne, H. B., Bassez, T., Poulhe, R., Bellé, R., Mulner-Lorillon, O. 1991 Protein phosphatase 2A from *Xenopus oocytes*. *FEBS Letters*. **295**, 185-188. (doi:10.1016/0014-5793(91)81414-4)
- 277 Vanhoof, C., Ingels, F., Cayla, X., Stevens, I., Merlevede, W., Goris, J. 1995 Molecular Cloning and Developmental Regulation Expression of Two Isoforms of the Catalytic Subunit of Protein Phosphatase 2A from *Xenopus laevis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **215**, 666-673. (doi:10.1006/bbrc.1995.2516)
- 278 Orgad, S., Brewis, N. D., Alphey, L., Axton, J. M., Dudai, Y., Cohen, P. T. W. 1990 The structure of protein phosphatase 2A is as highly conserved as that of protein phosphatase I. *FEBS Letters*. **275**, 44-48. (doi:10.1016/0014-5793(90)81435-Q)
- 279 MacKintosh, R. W., Haycox, G., Hardie, D. G., Cohen, P. T. W. 1990 Identification by molecular cloning of two cDNA sequences from the plant *Brassica napus* which are very similar to mammalian protein phosphatases-1 and -2A. *FEBS Letters*. **276**, 156-160. (doi:10.1016/0014-5793(90)80531-M)
- 280 Kinoshita, N., Ohkura, H., Yanagida, M. 1990 Distinct, essential roles of type 1 and 2A protein phosphatases in the control of the fission yeast cell division cycle. *Cell*. **63**, 405-415. (doi:10.1016/0092-8674(90)90173-C)
- 281 Sneddon, A. A., Cohen, P. T., Stark, M. J. 1990 *Saccharomyces cerevisiae* protein phosphatase 2A performs an essential cellular function and is encoded by two genes. *The EMBO Journal*. **9**, 4339-4346.

- 282 Ruediger, R., Roeckel, D., Fait, J., Bergqvist, A., Magnusson, G., Walter, G. 1992 Identification of binding sites on the regulatory A subunit of protein phosphatase 2A for the catalytic C subunit and for tumor antigens of simian virus 40 and polyomavirus. *Molecular and Cellular Biology*. **12**, 4872-4882.
- 283 Ruediger, R., Hentz, M., Fait, J., Mumby, M., Walter, G. 1994 Molecular model of the A subunit of protein phosphatase 2A: interaction with other subunits and tumor antigens. *Journal of Virology*. **68**, 123-129.
- 284 Baek, S., Seeling, J. M. 2007 Identification of a novel conserved mixed-isoform B56 regulatory subunit and spatiotemporal regulation of protein phosphatase 2A during *Xenopus laevis* development. *BMC Developmental Biology*. **7**, 139-139. (doi:10.1186/1471-213X-7-139)
- 285 Bosch, M., Cayla, X., Van Hoof, C., Hemmings, B. A., Ozon, R., Merlevede, W., Goris, J. 1995 The PR55 and PR65 Subunits of Protein Phosphatase 2A from *Xenopus laevis*. *European Journal of Biochemistry*. **230**, 1037-1045. (doi:10.1111/j.1432-1033.1995.1037g.x)
- 286 Baysal, B. E., Farr, J. E., Goss, J. R., Devlin, B., Richard, C. W. r. 1998 Genomic organization and precise physical location of protein phosphatase 2A regulatory subunit A beta isoform gene on chromosome band 11q23. *Gene*. **217**, 107-116.
- 287 Calin, G. A., di Iasio, M. G., Caprini, E., Vorechovsky, I., Natali, P. G., Sozzi, G., Croce, C. M., Barbanti-Brodano, G., Russo, G., Negrini, M. 2000 Low frequency of alterations of the alpha (PPP2R1A) and bold beta (PPP2R1B) isoforms of the subunit A of the serine-threonine phosphatase 2A in human neoplasms. *Oncogene*. **19**, 1191-1195.
- 288 Andrade, M. A., Bork, P. 1995 HEAT repeats in the Huntington's disease protein. *Nat Genet*. **11**, 115-116.
- 289 Groves, M. R., Hanlon, N., Turowski, P., Hemmings, B. A., Barford, D. 1999 The Structure of the Protein Phosphatase 2A PR65/A Subunit Reveals the Conformation of Its 15 Tandemly Repeated HEAT Motifs. *Cell*. **96**, 99-110. (doi:10.1016/S0092-8674(00)80963-0)
- 290 Stark, M. J. R. 1996 Yeast Protein Serine/Threonine Phosphatases: Multiple Roles and Diverse Regulation. *Yeast*. **12**, 1647-1675.
- 291 Strack, S., Chang, D., Zaucha, J. A., Colbran, R. J., Wadzinski, B. E. 1999 Cloning and characterization of B δ , a novel regulatory subunit of protein phosphatase 2A. *FEBS Letters*. **460**, 462-466. (doi:10.1016/S0014-5793(99)01377-0)

- 292 Mayer, R. E., Hendrix, P., Cron, P., Matthies, R., Stone, S. R., Goris, J., Merlevede, W., Hofsteenge, J., Hemmings, B. A. 1991 Structure of the 55-kDa regulatory subunit of protein phosphatase 2A: evidence for a neuronal-specific isoform. *Biochemistry*. **30**, 3589-3597.
- 293 Healy, A. M., Zolnierowicz, S., Stapleton, A. E., Goebel, M., DePaoli-Roach, A. A., Pringle, J. R. 1991 CDC55, a *Saccharomyces cerevisiae* gene involved in cellular morphogenesis: identification, characterization, and homology to the B subunit of mammalian type 2A protein phosphatase. *Molecular and Cellular Biology*. **11**, 5767-5780.
- 294 Zolnierowicz, S., Csontos, C., Bondor, J., Verin, A., Mumby, M. C., DePaoli-Roach, A. A. 1994 Diversity in the regulatory B-subunits of protein phosphatase 2A: identification of a novel isoform highly expressed in brain. *Biochemistry*. **33**, 11858-11867. (doi:10.1021/bi00205a023)
- 295 Strack, S., Zaucha, J. A., Ebner, F. F., Colbran, R. J., Wadzinski, B. E. 1998 Brain protein phosphatase 2A: Developmental regulation and distinct cellular and subcellular localization by B subunits. *The Journal of Comparative Neurology*. **392**, 515-527. (doi:10.1002/(SICI)1096-9861(19980323)392:4<515::AID-CNE8>3.0.CO;2-3)
- 296 McCright, B., Virshup, D. M. 1995 Identification of a New Family of Protein Phosphatase 2A Regulatory Subunits. *Journal of Biological Chemistry*. **270**, 26123-26128. (doi:10.1074/jbc.270.44.26123)
- 297 Csontos, C., Zolnierowicz, S., Bakó, E., Durbin, S. D., DePaoli-Roach, A. A. 1996 High complexity in the expression of the B' subunit of protein phosphatase 2A0. Evidence for the existence of at least seven novel isoforms. *Journal of Biological Chemistry*. **271**, 2578-2588. (doi:10.1074/jbc.271.5.2578)
- 298 Tehrani, M. A., Mumby, M. C., Kamibayashi, C. 1996 Identification of a Novel Protein Phosphatase 2A Regulatory Subunit Highly Expressed in Muscle. *Journal of Biological Chemistry*. **271**, 5164-5170. (doi:10.1074/jbc.271.9.5164)
- 299 Hendrix, P., Mayer-Jackel, R. E., Cron, P., Goris, J., Hofsteenge, J., Merlevede, W., Hemmings, B. A. 1993 Structure and expression of a 72-kDa regulatory subunit of protein phosphatase 2A. Evidence for different size forms produced by alternative splicing. *Journal of Biological Chemistry*. **268**, 15267-15276.
- 300 Moreno, C. S., Park, S., Nelson, K., Ashby, D., Hubalek, F., Lane, W. S., Pallas, D. C. 2000 WD40 Repeat Proteins Striatin and S/G(2) Nuclear Autoantigen Are Members

- of a Novel Family of Calmodulin-binding Proteins That Associate with Protein Phosphatase 2A. *The Journal of biological chemistry*. **275**, 5257-5263.
- 301 Seshacharyulu, P., Pandey, P., Datta, K., Batra, S. K. 2013 Phosphatase: PP2A structural importance, regulation and its aberrant expression in cancer. *Cancer Letters*. **335**, 9-18. (doi:10.1016/j.canlet.2013.02.036)
- 302 Picard, A., Capony, J. P., Brautigan, D. L., Dorée, M. 1989 Involvement of protein phosphatases 1 and 2A in the control of M phase- promoting factor activity in starfish. *The Journal of Cell Biology*. **109**, 3347-3354.
- 303 G. Dunphy, W. 1994 The decision to enter mitosis. *Trends in Cell Biology*. **4**, 202-207. (doi:10.1016/0962-8924(94)90142-2)
- 304 Narayanan, U., Nalavadi, V., Nakamoto, M., Pallas, D. C., Ceman, S., Bassell, G. J., Warren, S. T. 2007 FMRP Phosphorylation Reveals an Immediate-Early Signaling Pathway Triggered by Group I mGluR and Mediated by PP2A. *The Journal of Neuroscience*. **27**, 14349-14357. (doi:10.1523/jneurosci.2969-07.2007)
- 305 Xing, H., Hong, Y., Sarge, K. D. 2007 Identification of the PP2A-interacting region of heat shock transcription factor 2. *Cell Stress & Chaperones*. **12**, 192-197. (doi:10.1379/CSC-249R.1)
- 306 Xu, W., Yuan, X., Jung, Y. J., Yang, Y., Basso, A., Rosen, N., Chung, E. J., Trepel, J., Neckers, L. 2003 The Heat Shock Protein 90 Inhibitor Geldanamycin and the ErbB Inhibitor ZD1839 Promote Rapid PP1 Phosphatase-Dependent Inactivation of AKT in ErbB2 Overexpressing Breast Cancer Cells. *Cancer Research*. **63**, 7777-7784.
- 307 Götz, J., Probst, A., Ehler, E., Hemmings, B., Kues, W. 1998 Delayed embryonic lethality in mice lacking protein phosphatase 2A catalytic subunit α . *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **95**, 12370-12375.
- 308 Li, X., Scuderi, A., Letsou, A., Virshup, D. M. 2002 B56-Associated Protein Phosphatase 2A Is Required For Survival and Protects from Apoptosis in *Drosophila melanogaster*. *Molecular and Cellular Biology*. **22**, 3674-3684. (doi:10.1128/MCB.22.11.3674-3684.2002)
- 309 Silverstein, A. M., Barrow, C. A., Davis, A. J., Mumby, M. C. 2002 Actions of PP2A on the MAP kinase pathway and apoptosis are mediated by distinct regulatory subunits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **99**, 4221-4226. (doi:10.1073/pnas.072071699)

- 310 Bakalara, N., Seyfang, A., Baltz, T., Davis, C. 1995 *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi*: Life Cycle-Regulated Protein Tyrosine Phosphatase Activity. *Experimental Parasitology*. **81**, 302-312. (doi:10.1006/expr.1995.1121)
- 311 Brenchley, R., Tariq, H., McElhinney, H., Szöör, B., Huxley-Jones, J., Stevens, R., Matthews, K., Taberner, L. 2007 The TriTryp Phosphatome: analysis of the protein phosphatase catalytic domains. *BMC Genomics*. **8**, 434-434. (doi:10.1186/1471-2164-8-434)
- 312 González, J., Cornejo, A., Santos, M. R. M., Cordero, E. M., Gutiérrez, B., Porcile, P., Mortara, R. A., Sagua, H., Da Silveira, J. F., Araya, J. E. 2003 A novel protein phosphatase 2A (PP2A) is involved in the transformation of human protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. *Biochemical Journal*. **374**, 647-656. (doi:10.1042/BJ20030215)
- 313 Kumar, R., Adams, B., Oldenburg, A., Musiyenko, A., Barik, S. 2002 Characterisation and expression of a PP1 serine/threonine protein phosphatase (PfPP1) from the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*: demonstration of its essential role using RNA interference. *Malaria Journal*. **1**, 5-5. (doi:10.1186/1475-2875-1-5)
- 314 Yokoyama, D., Saito-Ito, A., Asao, N., Tanabe, K., Yamamoto, M., Matsumura, T. 1998 Modulation of the Growth of *Plasmodium falciparum* in Vitro by Protein Serine/Threonine Phosphatase Inhibitors. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **247**, 18-23. (doi:10.1006/bbrc.1998.8730)
- 315 Ghedin, E., Wang, S., Spiro, D., Caler, E., Zhao, Q., Crabtree, J., Allen, J. E., Delcher, A. L., Guiliano, D. B., Miranda-Saavedra, D., *et al.* 2007 Draft Genome of the Filarial Nematode Parasite *Brugia malayi*. *Science (New York, N.Y.)*. **317**, 1756-1760. (doi:10.1126/science.1145406)
- 316 Smith, V. P., Selkirk, M. E., Gounaris, K. 2000 A reversible protein phosphorylation system is present at the surface of infective larvae of the parasitic nematode *Trichinella spiralis*. *FEBS Letters*. **483**, 104-108. (doi:10.1016/S0014-5793(00)02094-9)
- 317 Ahn, D.-H., Singaravelu, G., Lee, S., Ahn, J., Shim, Y.-H. 2006 Functional and phenotypic relevance of differentially expressed proteins in calcineurin mutants of *Caenorhabditis elegans*. *PROTEOMICS*. **6**, 1340-1350. (doi:10.1002/pmic.200500315)
- 318 Boag, P. R., Ren, P., Newton, S. E., Gasser, R. B. 2003 Molecular characterisation of a male-specific serine/threonine phosphatase from *Oesophagostomum dentatum* (Nematoda: Strongylida), and functional analysis of homologues in *Caenorhabditis*

- elegans*. *International Journal for Parasitology*. **33**, 313-325. (doi:10.1016/S0020-7519(02)00263-1)
- 319 Ma, G. X., Zhou, R. Q., Hu, S. J., Huang, H. C., Zhu, T., Xia, Q. Y. 2014 Molecular characterization and functional analysis of serine/threonine protein phosphatase of *Toxocara canis*. *Experimental Parasitology*. **141**, 55-61. (doi:10.1016/j.exppara.2014.03.019)
- 320 Eichhorn, P. J. A., Creyghton, M. P., Bernards, R. 2009 Protein phosphatase 2A regulatory subunits and cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*. **1795**, 1-15. (doi:10.1016/j.bbcan.2008.05.005)
- 321 Mukhopadhyay, A., Tabanor, K., Chaguturu, R., Aldrich, J. V. 2013 Targeting inhibitor 2 of protein phosphatase 2A as a therapeutic strategy for prostate cancer treatment. *Cancer Biology & Therapy*. **14**, 962-972. (doi:10.4161/cbt.25943)
- 322 Keeling, J. 1961 Experimental trichuriasis. II. Anthelmintic screening against *Trichuris muris* in the albino mouse. *The Journal of Pathology*. **47**, 647-651.
- 323 Else, K. J., Hültner, L., Grecnis, R. K. 1992 Cellular immune responses to the murine nematode parasite *Trichuris muris*. II. Differential induction of TH-cell subsets in resistant versus susceptible mice. *Immunology*. **75**, 232-237.
- 324 Rice, P., Longden, I., Bleasby, A. 2000 EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite. *Trends in Genetics*. **16**, 276-277. (doi:10.1016/S0168-9525(00)02024-2)
- 325 Morales-Sanfrutos, J., Lopez-Jaramillo, J., Ortega-Munoz, M., Megia-Fernandez, A., Perez-Balderas, F., Hernandez-Mateo, F., Santoyo-Gonzalez, F. 2010 Vinyl sulfone: a versatile function for simple bioconjugation and immobilization. *Organic & Biomolecular Chemistry*. **8**, 667-675. (doi:10.1039/B920576D)
- 326 Cruz-Bustos, T., González-González, G., Morales-Sanfrutos, J., Megía-Fernández, A., Santoyo-González, F., Osuna, A. 2012 Functionalization of immunostimulating complexes (ISCOMs) with lipid vinyl sulfones and their application in immunological techniques and therapy. *International Journal of Nanomedicine*. **7**, 5941-5956. (doi:10.2147/IJN.S35556)
- 327 Rodríguez-Serrano, F., Mut-Salud, N., Cruz-Bustos, T., Gomez-Samblas, M., Carrasco, E., Garrido, J. M., López-Jaramillo, F. J., Santoyo-Gonzalez, F., Osuna, A. 2016 Functionalized immunostimulating complexes with protein A via lipid vinyl sulfones to deliver cancer drugs to trastuzumab-resistant HER2-overexpressing breast

- cancer cells. *International Journal of Nanomedicine*. **11**, 4777-4785. (doi:10.2147/IJN.S112560)
- 328 Cravatt, B. F., Lerner, R. A., Boger, D. L. 1996 Structure Determination of an Endogenous Sleep-Inducing Lipid, cis-9-Octadecenamide (Oleamide): A Synthetic Approach to the Chemical Analysis of Trace Quantities of a Natural Product. *Journal of the American Chemical Society*. **118**, 580-590. (doi:10.1021/ja9532345)
- 329 Bennion, C., Connolly, S., Gensmantel, N. P., Hallam, C., Jackson, C. G., Primrose, W. U., Roberts, G. C. K., Robinson, D. H., Slaich, P. K. 1992 Design and synthesis of some substrate analog inhibitors of phospholipase A2 and investigations by NMR and molecular modeling into the binding interactions in the enzyme-inhibitor complex. *Journal of Medicinal Chemistry*. **35**, 2939-2951. (doi:10.1021/jm00094a003)
- 330 Campelo, R., Díaz Lozano, I., Figarella, K., Osuna, A., Ramírez, J. L. 2015 Leishmania major Telomerase TERT Protein Has a Nuclear/Mitochondrial Eclipsed Distribution That Is Affected by Oxidative Stress. *Infection and Immunity*. **83**, 57-66. (doi:10.1128/iai.02269-14)
- 331 Schneider, C. A., Rasband, W. S., Eliceiri, K. W. 2012 NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Meth*. **9**, 671-675.
- 332 Ninan, N., Muthiah, M., Park, I.-K., Elain, A., Thomas, S., Grohens, Y. 2013 Pectin/carboxymethyl cellulose/microfibrillated cellulose composite scaffolds for tissue engineering. *Carbohydrate Polymers*. **98**, 877-885. (doi:10.1016/j.carbpol.2013.06.067)
- 333 Banerjee, S., Siddiqui, L., Bhattacharya, S. S., Kaity, S., Ghosh, A., Chattopadhyay, P., Pandey, A., Singh, L. 2012 Interpenetrating polymer network (IPN) hydrogel microspheres for oral controlled release application. *International Journal of Biological Macromolecules*. **50**, 198-206. (doi:10.1016/j.ijbiomac.2011.10.020)
- 334 Derothe, J. M., Loubès, C., Orth, A., Renaud, F., Moulia, C. 1997 Part Special Issue: Origins of Parasitism in the Platyhelminthes. Proceedings of a special session of the VIIIth International Symposium on the Biology of the Turbellaria Comparison between patterns of pinworm infection (*Aspiculuris tetraptera*) in wild and laboratory strains of mice, *Mus musculus*. *International Journal for Parasitology*. **27**, 645-651. (doi:10.1016/S0020-7519(96)00196-8)
- 335 Wakelin, D. 1967 Acquired immunity to *Trichuris muris* in the albino laboratory mouse. *Parasitology*. **57**, 515-524.

- 336 Wakelin, D. 1967 Acquired immunity to *Trichuris muris* in the albino laboratory mouse. *Parasitology*. **57**, 515-524. (doi:10.1017/s0031182000072395)
- 337 Rychlik, W. 1993 Selection of Primers for Polymerase Chain Reaction. In *PCR Protocols: Current Methods and Applications*. (ed.,eds. B. White), 31-40. Totowa NJ: Humana Press.
- 338 Buxbaum, A. R., Wu, B., Singer, R. H. 2014 Single β -Actin mRNA Detection in Neurons Reveals a Mechanism for Regulating Its Translatability. *Science*. **343**, 419-422. (doi:10.1126/science.1242939)
- 339 Martin, I., Cabán-Hernández, K., Figueroa-Santiago, O., Espino, A. M. 2015 Fasciola hepatica Fatty Acid Binding Protein Inhibits TLR4 Activation and Suppresses the Inflammatory Cytokines Induced by Lipopolysaccharide In Vitro and In Vivo. *The Journal of Immunology*. **194**, 3924-3936. (doi:10.4049/jimmunol.1401182)
- 340 Kreuzer, K.-A., Lass, U., Landt, O., Nitsche, A., Laser, J., Ellerbrok, H., Pauli, G., Huhn, D., Schmidt, C. A. 1999 Highly Sensitive and Specific Fluorescence Reverse Transcription-PCR Assay for the Pseudogene-free Detection of β -Actin Transcripts as Quantitative Reference. *Clinical Chemistry*. **45**, 297-300.
- 341 Gurr, G. T. 1973 *Biological Staining Methods*. Eighth ed. 136 New King's Road, London S.W.6
- 342 Suurmeijer, A. J. H. 1994 Optimizing immunohistochemistry in diagnostic tumors pathology with antigen retrieval. *European Journal of Morphology*. **32**, 325-330.
- 343 Bankfalvi, A., Navabi, H., Bier, B., Böcker, W., Jasani, B., Schmid, K. 1994 Wet autoclave pretreatment for antigen retrieval in diagnostic immunohistochemistry. *The Journal of Pathology*. **174**, 233-238.
- 344 Peter, M. M., Istvan, T. 2008 Self-Adjuvanting Lipopeptide Vaccines. *Current Medicinal Chemistry*. **15**, 506-516. (doi:10.2174/092986708783503249)
- 345 Jego, G., Bataille, R., Pellat-Deceunynck, C. 2001 Interleukin-6 is a growth factor for nonmalignant human plasmablasts. *Blood*. **97**, 1817-1822. (doi:10.1182/blood.V97.6.1817)
- 346 Stills, H. F., Bailey, M. Q. 1991 The use of Freund's Complete Adjuvant. *Lab Animal* **20**, 25-31.
- 347 BenMohamed, L., Wechsler, S. L., Nesburn, A. B. 2002 Lipopeptide vaccines—yesterday, today, and tomorrow. *The Lancet Infectious Diseases*. **2**, 425-431. (doi:10.1016/S1473-3099(02)00318-3)

- 348 Tsunoda, I., Sette, A., Fujinami, R. S., Oseroff, C., Ruppert, J., Dahlberg, C., Southwood, S., Arrhenius, T., Kuang, L.-Q., Kubo, R. T., *et al.* 1999 Lipopeptide particles as the immunologically active component of CTL inducing vaccines. *Vaccine*. **17**, 675-685. (doi:10.1016/S0264-410X(98)00250-3)
- 349 Rouaix, F., Gras-Masse, H., Mazingue, C., Diesis, E., Ridet, P. R., Estaquier, J., Capron, A., Tartar, A., Auriault, C. 1994 Effect of a lipopeptidic formulation on macrophage activation and peptide presentation to T cells. *Vaccine*. **12**, 1209-1214. (doi:10.1016/0264-410X(94)90245-3)
- 350 Mohamed Fawzi, E., Cruz Bustos, T., Gómez Samblas, M., González-González, G., Solano, J., González-Sánchez, M. E., De Pablos, L. M., Corral-Caridad, M. J., Cuquerella, M., Osuna, A., *et al.* 2013 Intranasal Immunization of Lambs with Serine/Threonine Phosphatase 2A against Gastrointestinal Nematodes. *Clinical and Vaccine Immunology*. **20**, 1352-1359. (doi:10.1128/CVI.00336-13)
- 351 Petrovsky, N., Aguilar, J. C. 2004 Vaccine adjuvants: Current state and future trends. *Immunol Cell Biol*. **82**, 488-496.
- 352 Abel, L. C. J., Chen, S., Ricca, L. G., Martins, M. F., Garcia, M., Ananias, R. Z., Mussalem, J. S., Squaiella, C. C., Shaw, R. J., Longo-Maugéri, I. M. 2009 Adjuvant effect of LPS and killed *Propionibacterium acnes* on the development of experimental gastrointestinal nematode infestation in sheep. *Parasite Immunology*. **31**, 604-612. (doi:10.1111/j.1365-3024.2009.01132.x)
- 353 González-Sánchez, E., Corral, M.-J., Mohamed Fawzi, E., Rodríguez-Bertos, A., Alunda, J. M., Cuquerella, M. 2014 LPS and inactivated *Propionibacterium acnes* elicit a partially protective response in primary infections of *Heligmosomoides polygyrus*. *Veterinary Parasitology*. **203**, 231-236. (doi:10.1016/j.vetpar.2014.02.026)
- 354 Nhu, Q. M., Cuesta, N., Vogel, S. N. 2006 Transcriptional regulation of lipopolysaccharide (LPS)-induced Toll-like receptor (TLR) expression in murine macrophages: role of interferon regulatory factors 1 (IRF-1) and 2 (IRF-2). *Journal of Endotoxin Research*. **12**, 285-295. (doi:10.1177/09680519060120050401)
- 355 Varshney, P., Yadav, V., Saini, N. 2016 Lipid rafts in immune signaling: Current progress and future perspective. *Immunology*. **149**, 13-24. (doi:10.1111/imm.12617)
- 356 Le Borgne, M., Etchart, N., Goubier, A., Lira, S. A., Sirard, J. C., van Rooijen, N., Caux, C., Aït-Yahia, S., Vicari, A., Kaiserlian, D., *et al.* 2006 Dendritic Cells Rapidly Recruited into Epithelial Tissues via CCR6/CCL20 Are Responsible for CD8⁺ T Cell Crosspriming In Vivo. *Immunity*. **24**, 191-201. (doi:10.1016/j.immuni.2006.01.005)

- 357 Park, H. J., Kim, H. J., Ra, J., Hong, S.-J., Baik, H. H., Park, H.-K., Yim, S. V., Nah, S.-S., Cho, J. J., Chung, J.-H. 2007 Melatonin inhibits lipopolysaccharide-induced CC chemokine subfamily gene expression in human peripheral blood mononuclear cells in a microarray analysis. *Journal of Pineal Research*. **43**, 121-129. (doi:10.1111/j.1600-079X.2007.00452.x)
- 358 Satsangi, J., Parkes, M., Jewell, D. P., Bell, J. I. 1998 Genetics of Inflammatory Bowel Disease. *Clinical Science*. **94**, 473-478. (doi:10.1042/cs0940473)
- 359 Mawdsley, J. E., Rampton, D. S. 2005 Psychological stress in IBD: new insights into pathogenic and therapeutic implications. *Gut*. **54**, 1481-1491. (doi:10.1136/gut.2005.064261)
- 360 Williams, I. R. 2006 CCR6 and CCL20. *Annals of the New York Academy of Sciences*. **1072**, 52-61. (doi:10.1196/annals.1326.036)
- 361 Anthony, R. M., Rutitzky, L. I., Urban, J. F., Stadecker, M. J., Gause, W. C. 2007 Protective immune mechanisms in helminth infection. *Nat Rev Immunol*. **7**, 975-987.
- 362 Min, B., Prout, M., Hu-Li, J., Zhu, J., Jankovic, D., Morgan, E. S., Urban, J. F., Dvorak, A. M., Finkelman, F. D., LeGros, G., *et al.* 2004 Basophils Produce IL-4 and Accumulate in Tissues after Infection with a Th2-inducing Parasite. *The Journal of Experimental Medicine*. **200**, 507-517. (doi:10.1084/jem.20040590)
- 363 Shinkai, K., Mohrs, M., Locksley, R. M. 2002 Helper T cells regulate type-2 innate immunity in vivo. *Nature*. **420**, 825-829. (doi:10.1038/nature01202)
- 364 McGeachy, M. J., Bak-Jensen, K. S., Chen, Y., Tato, C. M., Blumenschein, W., McClanahan, T., Cua, D. J. 2007 TGF- β and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain TH-17 cell-mediated pathology. *Nat Immunol*. **8**, 1390-1397. (doi:10.1038/ni1539)
- 365 Meares, G. P., Ma, X., Qin, H., Benveniste, E. N. 2012 Regulation of CCL20 expression in astrocytes by IL-6 and IL-17. *Glia*. **60**, 771-781. (doi:10.1002/glia.22307)
- 366 Rivino, L., Gruarin, P., Häringer, B., Steinfeldt, S., Lozza, L., Steckel, B., Weick, A., Sugliano, E., Jarrossay, D., Köhl, A. A., *et al.* 2010 CCR6 is expressed on an IL-10-producing, autoreactive memory T cell population with context-dependent regulatory function. *The Journal of Experimental Medicine*. **207**, 565-577. (doi:10.1084/jem.20091021)
- 367 Carramolino, L., Kremer, L., Goya, I., Varona, R., Buesa, J. M., Gutiérrez, J., Zaballos, A., Martínez-A, C., Márquez, G. 1999 Down-regulation of the beta-

- chemokine receptor CCR6 in dendritic cells mediated by TNF-alpha and IL-4. *Journal of Leukocyte Biology*. **66**, 837-844.
- 368 Klaver, E. J., van der Pouw Kraan, T. C. T. M., Laan, L. C., Kringel, H., Cummings, R. D., Bouma, G., Kraal, G., van Die, I. 2015 *Trichuris suis* soluble products induce Rab7b expression and limit TLR4 responses in human dendritic cells. *Genes Immun*. **16**, 378-387. (doi:10.1038/gene.2015.18)
- 369 Daly, C., Rollins, B. J. 2003 Monocyte Chemoattractant Protein-1 (CCL2) in Inflammatory Disease and Adaptive Immunity: Therapeutic Opportunities and Controversies. *Microcirculation*. **10**, 247-257. (doi:10.1038/sj.mn.7800190)
- 370 Lügering, A., Kucharzik, T. 2006 Induction of Intestinal Lymphoid Tissue. *Annals of the New York Academy of Sciences*. **1072**, 210-217. (doi:10.1196/annals.1326.015)
- 371 Van Limbergen, J., Wilson, D. C., Satsangi, J. 2009 The Genetics of Crohn's Disease. *Annual Review Genomics Human Genetics*. **10**, 89-116. (doi:10.1146/annurev-genom-082908-150013)
- 372 Papadakis, K. A. 2004 Chemokines in inflammatory bowel disease. *Current Allergy Asthma Reports*. **4**, 83-89. (doi:10.1159/000320392)
- 373 Jostins, L., Ripke, S., Weersma, R. K., Duerr, R. H., McGovern, D. P., Hui, K. Y., Lee, J. C., Philip Schumm, L., Sharma, Y., Anderson, C. A., *et al.* 2012 Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature*. **491**, 119-124. (doi:10.1038/nature11582)
- 374 Danese, S., Sans, M., Fiocchi, C. 2004 Inflammatory bowel disease: the role of environmental factors. *Autoimmunity Reviews*. **3**, 394-400. (doi:10.1016/j.autrev.2004.03.002)
- 375 Ito, T., Carson Iv, W. F., Cavassani, K. A., Connett, J. M., Kunkel, S. L. 2011 CCR6 as a mediator of immunity in the lung and gut. *Experimental Cell Research*. **317**, 613-619. (doi:10.1016/j.yexcr.2010.12.018)
- 376 Croft, M., So, T., Duan, W., Soroosh, P. 2009 The Significance of OX40 and OX40L to T cell Biology and Immune Disease. *Immunological reviews*. **229**, 173-191. (doi:10.1111/j.1600-065X.2009.00766.x)
- 377 Zhong, W., Zhang, Z., Hinrichs, D., Wu, X., Hall, M., Xia, Z., Rosenbaum, J. T. 2010 OX40 Induces CCL20 Expression in the Context of Antigen Stimulation: An Expanding Role of Co-Stimulatory Molecules in Chemotaxis. *Cytokine*. **50**, 253-259. (doi:10.1016/j.cyto.2010.03.021)

- 378 Weinberg, A. D., Wegmann³, K. W., Funatake, C., Whitham, R. H. 1999 Blocking OX-40/OX-40 Ligand Interaction In Vitro and In Vivo Leads to Decreased T Cell Function and Amelioration of Experimental Allergic Encephalomyelitis. *The Journal of Immunology*. **162**, 1818-1826.
- 379 Flynn, S., Toellner, K.-M., Raykundalia, C., Goodall, M., Lane, P. 1998 CD4 T Cell Cytokine Differentiation: The B Cell Activation Molecule, OX40 Ligand, Instructs CD4 T Cells to Express Interleukin 4 and Upregulates Expression of the Chemokine Receptor, Blr-1. *The Journal of Experimental Medicine*. **188**, 297-304.
- 380 Hirota, K., Yoshitomi, H., Hashimoto, M., Maeda, S., Teradaira, S., Sugimoto, N., Yamaguchi, T., Nomura, T., Ito, H., Nakamura, T., *et al.* 2007 Preferential recruitment of CCR6-expressing Th17 cells to inflamed joints via CCL20 in rheumatoid arthritis and its animal model. *The Journal of Experimental Medicine*. **204**, 2803-2812. (doi:10.1084/jem.20071397)
- 381 Wilson, N. J., Boniface, K., Chan, J. R., McKenzie, B. S., Blumenschein, W. M., Mattson, J. D., Basham, B., Smith, K., Chen, T., Morel, F., *et al.* 2007 Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nat Immunol*. **8**, 950-957. (doi:10.1038/ni1497)
- 382 Yamazaki, T., Yang, X. O., Chung, Y., Fukunaga, A., Nurieva, R., Pappu, B., Martin-Orozco, N., Kang, H. S., Ma, L., Panopoulos, A. D., *et al.* 2008 CCR6 Regulates the Migration of Inflammatory and Regulatory T Cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. **181**, 8391-8401.
- 383 Kao, C.-Y., Huang, F., Chen, Y., Thai, P., Wachi, S., Kim, C., Tam, L., Wu, R. 2005 Up-Regulation of CC Chemokine Ligand 20 Expression in Human Airway Epithelium by IL-17 through a JAK-Independent but MEK/NF- κ B-Dependent Signaling Pathway. *The Journal of Immunology*. **175**, 6676-6685. (doi:10.4049/jimmunol.175.10.6676)
- 384 Sirard, J.-C., Didierlaurent, A., Cayet, D., Sierro, F., Rumbo, M. 2009 Toll-like receptor 5- and lymphotoxin β receptor-dependent epithelial Ccl20 expression involves the same NF- κ B binding site but distinct NF- κ B pathways and dynamics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*. **1789**, 386-394. (doi:10.1016/j.bbagr.2009.03.001)
- 385 Kanda, N., Shibata, S., Tada, Y., Nashiro, K., Tamaki, K., Watanabe, S. 2009 Prolactin enhances basal and IL-17-induced CCL20 production by human keratinocytes. *European Journal of Immunology*. **39**, 996-1006. (doi:10.1002/eji.200838852)

- 386 Ito, T., Wang, Y.-H., Duramad, O., Hanabuchi, S., Perng, O. A., Gilliet, M., Qin, F., X.-F., Liu, Y.-J. 2006 OX40 ligand shuts down IL-10-producing regulatory T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **103**, 13138-13143. (doi:10.1073/pnas.0603107103)
- 387 Heiseke, A. F., Faul, A. C., Lehr, H. A., Förster, I., Schmid, R. M., Krug, A. B., Reindl, W. 2012 CCL17 Promotes Intestinal Inflammation in Mice and Counteracts Regulatory T Cell-Mediated Protection From Colitis. *Gastroenterology*. **142**, 335-345. (doi:10.1053/j.gastro.2011.10.027)
- 388 Inngjerdigen, M., Damaj, B., Maghazachi, A. A. 2000 Human NK Cells Express CC Chemokine Receptors 4 and 8 and Respond to Thymus and Activation-Regulated Chemokine, Macrophage-Derived Chemokine, and I-309. *The Journal of Immunology*. **164**, 4048-4054. (doi:10.4049/jimmunol.164.8.4048)
- 389 Ness, T. L., Ewing, J. L., Hogaboam, C. M., Kunkel, S. L. 2006 CCR4 Is a Key Modulator of Innate Immune Responses. *The Journal of Immunology*. **177**, 7531-7539. (doi:10.4049/jimmunol.177.11.7531)
- 390 Sallusto, F., Lanzavecchia, A. 1999 Mobilizing Dendritic Cells for Tolerance, Priming, and Chronic Inflammation. *The Journal of Experimental Medicine*. **189**, 611-614.
- 391 Semmling, V., Lukacs-Kornek, V., Thaiss, C. A., Quast, T., Hochheiser, K., Panzer, U., Rossjohn, J., Perlmutter, P., Cao, J., Godfrey, D. I., *et al.* 2010 Alternative cross-priming through CCL17-CCR4-mediated attraction of CTLs toward NKT cell-licensed DCs. *Nat Immunol*. **11**, 313-320. (doi:10.1038/ni.1848)
- 392 Lee, I., Wang, L., Wells, A. D., Dorf, M. E., Ozkaynak, E., Hancock, W. W. 2005 Recruitment of Foxp3(+) T regulatory cells mediating allograft tolerance depends on the CCR4 chemokine receptor. *The Journal of Experimental Medicine*. **201**, 1037-1044. (doi:10.1084/jem.20041709)
- 393 Reiss, Y., Proudfoot, A. E., Power, C. A., Campbell, J. J., Butcher, E. C. 2001 CC Chemokine Receptor (CCR)4 and the CCR10 Ligand Cutaneous T Cell-attracting Chemokine (CTACK) in Lymphocyte Trafficking to Inflamed Skin. *The Journal of Experimental Medicine*. **194**, 1541-1547.
- 394 Yuan, Q., Bromley, S. K., Means, T. K., Jones, K. J., Hayashi, F., Bhan, A. K., Luster, A. D. 2007 CCR4-dependent regulatory T cell function in inflammatory bowel disease. *The Journal of Experimental Medicine*. **204**, 1327-1334. (doi:10.1084/jem.20062076)

- 395 Gounni, A. S., Hamid, Q., Rahman, S. M., Hoeck, J., Yang, J., Shan, L. 2004 IL-9-Mediated Induction of Eotaxin1/CCL11 in Human Airway Smooth Muscle Cells. *The Journal of Immunology*. **173**, 2771-2779. (doi:10.4049/jimmunol.173.4.2771)
- 396 Kara, E. E., Comerford, I., Bastow, C. R., Fenix, K. A., Litchfield, W., Handel, T. M., McColl, S. R. 2013 Distinct chemokine receptor axes regulate Th9 cell trafficking to allergic and autoimmune inflammatory sites. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. **191**, 1110-1117. (doi:10.4049/jimmunol.1203089)
- 397 Goswami, R., Kaplan, M. H. 2012 Yoking OX40 to regulation of IL-9. *Nature immunology*. **13**, 942-943. (doi:10.1038/ni.2421)
- 398 Richard, M., Grecis, R. K., Humphreys, N. E., Renaud, J.-C., Van Snick, J. 2000 Anti-IL-9 vaccination prevents worm expulsion and blood eosinophilia in *Trichuris muris*-infected mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **97**, 767-772.
- 399 Turner, J.-E., Morrison, P. J., Wilhelm, C., Wilson, M., Ahlfors, H., Renaud, J.-C., Panzer, U., Helmby, H., Stockinger, B. 2013 IL-9-mediated survival of type 2 innate lymphoid cells promotes damage control in helminth-induced lung inflammation. *The Journal of Experimental Medicine*. **210**, 2951-2965. (doi:10.1084/jem.20130071)
- 400 Licona-Limón, P., Henao-Mejía, J., Temann, A. U., Gagliani, N., Licona-Limón, I., Ishigame, H., Hao, L., Herbert, D. B. R., Flavell, R. A. 2013 Th9 cells drive host immunity against gastrointestinal worm infection. *Immunity*. **39**, 744-757. (doi:10.1016/j.immuni.2013.07.020)
- 401 Faulkner, H., Renaud, J. C., Van Snick, J., Grecis, R. K. 1998 Interleukin-9 Enhances Resistance to the Intestinal Nematode *Trichuris muris*. *Infection and Immunity*. **66**, 3832-3840.
- 402 Li, H., Rostami, A. 2010 IL-9: Basic Biology, Signaling Pathways in CD4+ T Cells and Implications for Autoimmunity. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*. **5**, 198-209. (doi:10.1007/s11481-009-9186-y)
- 403 Goswami, R., Kaplan, M. H. 2011 A Brief History of IL-9. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. **186**, 3283-3288. (doi:10.4049/jimmunol.1003049)
- 404 Purwar, R., Schlapbach, C., Xiao, S., Kang, H. S., Elyaman, W., Jiang, X., Jetten, A. M., Khoury, S. J., Fuhlbrigge, R. C., Kuchroo, V. K., *et al.* 2012 Robust tumor immunity to melanoma mediated by interleukin 9. *Nature medicine*. **18**, 1248-1253. (doi:10.1038/nm.2856)

- 405 Shin, M. H., Lee, Y. A., Min, D.-Y. 2009 Eosinophil-Mediated Tissue Inflammatory Responses in Helminth Infection. *The Korean Journal of Parasitology*. **47**, S125-S131. (doi:10.3347/kjp.2009.47.S.S125)
- 406 Taub, D. D., Turcovski-Corrales, S. M., Key, M. L., Longo, D. L., Murphy, W. J. 1996 Chemokines and T lymphocyte activation: I. Beta chemokines costimulate human T lymphocyte activation in vitro. *The Journal of Immunology*. **156**, 2095-2103.
- 407 Levison, S. E., Fisher, P., Hankinson, J., Zeef, L., Eyre, S., Ollier, W. E., McLaughlin, J. T., Brass, A., Grecnis, R. K., Pennock, J. L. 2013 Genetic analysis of the *Trichuris muris*-induced model of colitis reveals QTL overlap and a novel gene cluster for establishing colonic inflammation. *BMC Genomics*. **14**, 1-13. (doi:10.1186/1471-2164-14-127)
- 408 Hasnain, S. Z., Wang, H., Ghia, J. E., Haq, N., Deng, Y., Velcich, A., Grecnis, R. K., Thornton, D. J., Khan, W. I. 2010 Mucin Gene Deficiency in Mice Impairs Host Resistance to an Enteric Parasitic Infection. *Gastroenterology*. **138**, 1763-1771. (doi:10.1053/j.gastro.2010.01.045)
- 409 Ishikawa, N., Wakelin, D., Mahida, Y. R. 1997 Role of T helper 2 cells in intestinal goblet cell hyperplasia in mice infected with *Trichinella spiralis*. *Gastroenterology*. **113**, 542-549. (doi:10.1053/gast.1997.v113.pm9247474)
- 410 Khan, W. I., Abe, T., Ishikawa, N., Nawa, Y., Yoshimura, K. 1995 Reduced amount of intestinal mucus by treatment with anti-CD4 antibody interferes with the spontaneous cure of *Nippostrongylus brasiliensis*-infection in mice. *Parasite Immunology*. **17**, 485-491. (10.1111/j.1365-3024.1995.tb00919.x)
- 411 Hasnain, S. Z., Evans, C. M., Roy, M., Gallagher, A. L., Kindrachuk, K. N., Barron, L., Dickey, B. F., Wilson, M. S., Wynn, T. A., Grecnis, R. K., *et al.* 2011 Muc5ac: a critical component mediating the rejection of enteric nematodes. *The Journal of Experimental Medicine*. **208**, 893-900. (doi:10.1084/jem.20102057)
- 412 Linden, S. K., Sutton, P., Karlsson, N. G., Korolik, V., McGuckin, M. A. 2008 Mucins in the mucosal barrier to infection. *Mucosal Immunol.* **1**, 183-197. (doi:10.1038/mi.2008.5)
- 413 Kim, Y. S., Ho, S. B. 2010 Intestinal Goblet Cells and Mucins in Health and Disease: Recent Insights and Progress. *Current Gastroenterology Reports*. **12**, 319-330. (doi:10.1007/s11894-010-0131-2)
- 414 Artis, D., Grecnis, R. K. 2008 The intestinal epithelium: sensors to effectors in nematode infection. *Mucosal Immunol.* **1**, 252-264. (doi:10.1038/mi.2008.21)

- 415 Hogan, S. P., Seidu, L., Blanchard, C., Groschwitz, K., Mishra, A., Karow, M. L., Ahrens, R., Artis, D., Murphy, A. J., Valenzuela, D. M., *et al.* 2006 Resistin-like molecule β regulates innate colonic function: Barrier integrity and inflammation susceptibility. *The Journal of allergy and clinical immunology*. **118**, 257-268. (doi:10.1016/j.jaci.2006.04.039)
- 416 Khan, W. I., Blennerhasset, P., Ma, C., Matthaei, K. I., Collins, S. M. 2001 Stat6 dependent goblet cell hyperplasia during intestinal nematode infection. *Parasite Immunology*. **23**, 39-42. (doi:10.1046/j.1365-3024.2001.00353.x)
- 417 Wang, H., Kim, J. J., Denou, E., Gallagher, A., Thornton, D. J., Shajib, M. S., Xia, L., Schertzer, J. D., Grecis, R. K., Philpott, D. J., *et al.* 2016 New Role of Nod Proteins in Regulation of Intestinal Goblet Cell Response in the Context of Innate Host Defense in an Enteric Parasite Infection. *Infection and Immunity*. **84**, 275-285. (doi:10.1128/iai.01187-15)
- 418 Li, Q., Laumonier, Y., Syrovets, T., Simmet, T. 2013 Recruitment of CCR6-expressing Th17 cells by CCL20 secreted from plasmin-stimulated macrophages. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*. **45**, 593-600. (doi:10.1093/abbs/gmt049)
- 419 Ahrens, R., Waddell, A., Seidu, L., Blanchard, C., Carey, R., Forbes, E., Lampinen, M., Wilson, T., Cohen, E., Stringer, K., *et al.* 2008 Intestinal macrophage/epithelial cell-derived CCL11/Eotaxin-1 mediates eosinophil recruitment and function in pediatric ulcerative colitis. *Journal of immunology*. **181**, 7390-7399. (doi:10.4049/jimmunol.181.10.7390)
- 420 Disteldorf, E. M., Krebs, C. F., Paust, H.-J., Turner, J.-E., Nouailles, G., Tittel, A., Meyer-Schwesinger, C., Stege, G., Brix, S., Velden, J., *et al.* 2015 CXCL5 Drives Neutrophil Recruitment in T(H)17-Mediated GN. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. **26**, 55-66. (doi:10.1681/ASN.2013101061)
- 421 Schmitz, J. M., McCracken, V. J., Dimmitt, R. A., Lorenz, R. G. 2007 Expression of CXCL15 (Lungkine) in Murine Gastrointestinal, Urogenital, and Endocrine Organs. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. **55**, 515-524. (doi:10.1369/jhc.6A7121.2007)
- 422 Neutra, M. R., Frey, A., Kraehenbuhl, J.-P. 1996 Epithelial M Cells: Gateways for Mucosal Infection and Immunization. *Cell*. **86**, 345-348. (doi:10.1016/S0092-8674(00)80106-3)

- 423 Fujimura, Y., Iida, M. 2001 A new marker for cup cells in the rabbit small intestine: expression of vimentin intermediate filament protein. *Medical Electron Microscopy: official journal of the Clinical Electron Microscopy Society of Japan*. **34**, 223-229.
- 424 Gerbe, F., Legraverend, C., Jay, P. 2012 The intestinal epithelium tuft cells: specification and function. *Cellular and Molecular Life Sciences*. **69**, 2907-2917. (doi:10.1007/s00018-012-0984-7)
- 425 Gerbe, F., van Es, J. H., Makrini, L., Brulin, B., Mellitzer, G., Robine, S., Romagnolo, B., Shroyer, N. F., Bourgaux, J.-F., Pignodel, C., *et al.* 2011 Distinct ATOH1 and Neurog3 requirements define tuft cells as a new secretory cell type in the intestinal epithelium. *The Journal of Cell Biology*. **192**, 767-780. (doi:10.1083/jcb.201010127)
- 426 Howitt, M. R., Lavoie, S., Michaud, M., Blum, A. M., Tran, S. V., Weinstock, J. V., Gallini, C. A., Redding, K., Margolskee, R. F., Osborne, L. C., *et al.* 2016 Tuft cells, taste-chemosensory cells, orchestrate parasite type 2 immunity in the gut. *Science*. **351**, 1329-1333. (doi:10.1126/science.aaf1648)
- 427 von Moltke, J., Ji, M., Liang, H.-E., Locksley, R. M. 2016 Tuft-cell-derived IL-25 regulates an intestinal ILC2–epithelial response circuit. *Nature*. **529**, 221-225. (doi:10.1038/nature16161)
- 428 Reynolds, Joseph M., Lee, Y.-H., Shi, Y., Wang, X., Angkasekwinai, P., Nallaparaju, Kalyan C., Flaherty, S., Chang, Seon H., Watarai, H., Dong, C. 2015 Interleukin-17B Antagonizes Interleukin-25-Mediated Mucosal Inflammation. *Immunity*. **42**, 692-703. (doi:10.1016/j.immuni.2015.03.008)
- 429 Tizzano, M., Gulbransen, B. D., Vandenbeuch, A., Clapp, T. R., Herman, J. P., Sibhatu, H. M., Churchill, M. E. A., Silver, W. L., Kinnamon, S. C., Finger, T. E. 2010 Nasal chemosensory cells use bitter taste signaling to detect irritants and bacterial signals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **107**, 3210-3215. (doi:10.1073/pnas.0911934107)
- 430 Owyang, A. M., Zaph, C., Wilson, E. H., Guild, K. J., McClanahan, T., Miller, H. R. P., Cua, D. J., Goldschmidt, M., Hunter, C. A., Kastelein, R. A., *et al.* 2006 Interleukin 25 regulates type 2 cytokine-dependent immunity and limits chronic inflammation in the gastrointestinal tract. *The Journal of Experimental Medicine*. **203**, 843-849. (doi:10.1084/jem.20051496)

- 431 Höchstetter, R., Dobos, G., Kimmig, D., Dulkys, Y., Kapp, A., Elsner, J. 2000 The CC chemokine receptor 3 CCR3 is functionally expressed on eosinophils but not on neutrophils. *European Journal of Immunology*. **30**, 2759-2764.
- 432 Dixon, H., Blanchard, C., deSchoolmeester, M. L., Yuill, N. C., Christie, J. W., Rothenberg, M. E., Else, K. J. 2006 The role of Th2 cytokines, chemokines and parasite products in eosinophil recruitment to the gastrointestinal mucosa during helminth infection. *European Journal of Immunology*. **36**, 1753-1763. (doi:10.1002/eji.200535492)
- 433 Schütz, B., Jurastow, I., Bader, S., Ringer, C., von Engelhardt, J., Chubanov, V., Gudermann, T., Diener, M., Kummer, W., Krasteva-Christ, G., *et al.* 2015 Chemical coding and chemosensory properties of cholinergic brush cells in the mouse gastrointestinal and biliary tract. *Frontiers in Physiology*. **6**, 87. (doi:10.3389/fphys.2015.00087)
- 434 Angkasekwinai, P., Chang, S. H., Thapa, M., Watarai, H., Dong, C. 2010 Regulation of IL-9 expression by IL-25 signaling. *Nature immunology*. **11**, 250-256. (doi:10.1038/ni.1846)
- 435 Steenwinckel, V., Louahed, J., Orabona, C., Huaux, F., Warnier, G., McKenzie, A., Lison, D., Levitt, R., Renaud, J.-C. 2007 IL-13 Mediates In Vivo IL-9 Activities on Lung Epithelial Cells but Not on Hematopoietic Cells. *The Journal of Immunology*. **178**, 3244-3251. (doi:10.4049/jimmunol.178.5.3244)
- 436 Bettelli, E., Oukka, M., Kuchroo, V. K. 2007 TH-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity. *Nat Immunol*. **8**, 345-350. (doi:10.1038/ni0407-345)
- 437 Veldhoen, M., Hocking, R. J., Atkins, C. J., Locksley, R. M., Stockinger, B. 2006 TGF β in the Context of an Inflammatory Cytokine Milieu Supports De Novo Differentiation of IL-17-Producing T Cells. *Immunity*. **24**, 179-189. (doi:10.1016/j.immuni.2006.01.001)
- 438 Korn, T., Bettelli, E., Gao, W., Awasthi, A., Jäger, A., Strom, T. B., Oukka, M., Kuchroo, V. K. 2007 IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells. *Nature*. **448**, 484-487. (doi:10.1038/nature05970)
- 439 Elyaman, W., Bradshaw, E. M., Uyttenhove, C., Dardalhon, V., Awasthi, A., Imitola, J., Bettelli, E., Oukka, M., van Snick, J., Renaud, J.-C., *et al.* 2009 IL-9 induces differentiation of T(H)17 cells and enhances function of FoxP3(+) natural regulatory T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **106**, 12885-12890. (doi:10.1073/pnas.0812530106)

- 440 Stritesky, G. L., Yeh, N., Kaplan, M. H. 2008 IL-23 promotes maintenance but not commitment to the Th17 lineage. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. **181**, 5948-5955.
- 441 Chin, C.-C., Chen, C.-N., Kuo, H.-C., Shi, C.-S., Hsieh, M. C., Kuo, Y.-H., Tung, S.-Y., Lee, K.-F., Huang, W.-S. 2015 Interleukin-17 induces CC chemokine receptor 6 expression and cell migration in colorectal cancer cells. *Journal of Cellular Physiology*. **230**, 1430-1437. (doi:10.1002/jcp.24796)
- 442 Tesmer, L. A., Lundy, S. K., Sarkar, S., Fox, D. A. 2008 Th17 cells in human disease. *Immunological Reviews*. **223**, 87-113. (doi:10.1111/j.1600-065X.2008.00628.x)
- 443 Liang, S. C., Tan, X.-Y., Luxenberg, D. P., Karim, R., Dunussi-Joannopoulos, K., Collins, M., Fouser, L. A. 2006 Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *The Journal of Experimental Medicine*. **203**, 2271-2279. (doi:10.1084/jem.20061308)
- 444 Xia, W., Bai, J., Wu, X., Wei, Y., Feng, S., Li, L., Zhang, J., Xiong, G., Fan, Y., Shi, J., *et al.* 2014 Interleukin-17A Promotes MUC5AC Expression and Goblet Cell Hyperplasia in Nasal Polyps via the Act1-Mediated Pathway. *PLoS ONE*. **9**, e98915. (doi:10.1371/journal.pone.0098915)
- 445 Sutherland, T. E., Logan, N., Ruckerl, D., Humbles, A. A., Allan, S. M., Papayannopoulos, V., Stockinger, B., Maizels, R. M., Allen, J. E. 2014 Chitinase-like proteins promote IL-17-mediated neutrophilia in a trade-off between nematode killing and host damage. *Nature immunology*. **15**, 1116-1125. (doi:10.1038/ni.3023)
- 446 Nakajima, S., Kitoh, A., Egawa, G., Natsuaki, Y., Nakamizo, S., Moniaga, C. S., Otsuka, A., Honda, T., Hanakawa, S., Amano, W., *et al.* 2014 IL-17A as an Inducer for Th2 Immune Responses in Murine Atopic Dermatitis Models. *Journal of Investigative Dermatology*. **134**, 2122-2130. (doi:10.1038/jid.2014.51)
- 447 Nakae, S., Komiyama, Y., Nambu, A., Sudo, K., Iwase, M., Homma, I., Sekikawa, K., Asano, M., Iwakura, Y. 2002 Antigen-Specific T Cell Sensitization Is Impaired in IL-17-Deficient Mice, Causing Suppression of Allergic Cellular and Humoral Responses. *Immunity*. **17**, 375-387. (doi:10.1016/S1074-7613(02)00391-6)
- 448 Chen, F., Wu, W., Millman, A., Craft, J. F., Chen, E., Patel, N., Boucher, J. L., Urban, J. F., Kim, C. C., Gause, W. C. 2014 Neutrophils prime a long-lived effector macrophage phenotype that mediates accelerated helminth expulsion. *Nature immunology*. **15**, 938-946. (doi:10.1038/ni.2984)

- 449 Pesce, J. T., Liu, Z., Hamed, H., Alem, F., Whitmire, J., Lin, H., Liu, Q., Urban, J. F., Gause, W. C. 2008 Neutrophils Clear Bacteria Associated with Parasitic Nematodes Augmenting the Development of an Effective Th2-Type Response. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. **180**, 464-474.
- 450 Kleinschek, M. A., Owyang, A. M., Joyce-Shaikh, B., Langrish, C. L., Chen, Y., Gorman, D. M., Blumenschein, W. M., McClanahan, T., Brombacher, F., Hurst, S. D., *et al.* 2007 IL-25 regulates Th17 function in autoimmune inflammation. *The Journal of Experimental Medicine*. **204**, 161-170.
- 451 Spolski, R., Leonard, W. J. 2014 Interleukin-21: a double-edged sword with therapeutic potential. *Nat Rev Drug Discov*. **13**, 379-395. (doi:10.1038/nrd4296)
- 452 Pelletier, M., Girard, D. 2007 Biological Functions of Interleukin-21 and Its Role in Inflammation. *The Scientific World JOURNAL*. **7**, 1715-1735 (doi:10.1100/tsw.2007.275)
- 453 Avery, D. T., Bryant, V. L., Ma, C. S., de Waal Malefyt, R., Tangye, S. G. 2008 IL-21-induced isotype switching to IgG and IgA by human Naive B Cells is differentially regulated by IL-4. *The Journal of Immunology*. **181**, 1767-1779. (doi:10.4049/jimmunol.181.3.1767)