



Vaccimonitor

ISSN: 1025-0298

vaccimonitor@finlay.edu.cu

Instituto Finlay

Cuba

Zumaquero-Ríos, José Lino; Pérez-Santos, Martín; Villa-Mancera, Abel; Sarracent-Pérez, Jorge

La inmunización con productos de excreción-secreción de *Trichinella spiralis* unido al bloqueo de CTLA-4 produce un elevado grado de protección ante un reto con el parásito

Vaccimonitor, vol. 26, núm. 1, enero-abril, 2017, pp. 24-30

Instituto Finlay

Ciudad de la Habana, Cuba

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=203450395004>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica

Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal

Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

La inmunización con productos de excreción-secreción de *Trichinella spiralis* unido al bloqueo de CTLA-4 produce un elevado grado de protección ante un reto con el parásito

José Lino Zumaquero-Ríos,^{1*} Martín Pérez-Santos,¹ Abel Villa-Mancera,¹ Jorge Sarracent-Pérez^{1,2}

¹ Laboratorio de Parásitos y Vectores, Facultad de Ciencias Biológicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México.

² Departamento de Parasitología, Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri”, Habana Cuba.

email: zumaquerojl@gmail.com

En la búsqueda de una vacuna experimental efectiva contra *Trichinella spiralis* se han utilizado diferentes estrategias, pero el grado de protección alcanzado en la casi totalidad de los ensayos es insuficiente para lograr un adecuado control de la enfermedad. En la literatura hay evidencias de que moléculas inhibitoras de la activación de los linfocitos T están implicadas en la regulación de la respuesta inmune contra los helmintos. El bloqueo de estas moléculas puede ser un blanco potencial para el tratamiento de las infecciones causadas por estos parásitos. Por otra parte, se ha informado que la inmunización con productos de excreción-secreción de larvas musculares de *T. spiralis* proporciona una inmunidad protectora parcial. La infección con el parásito induce una elevada población de linfocitos T reguladores que modulan la respuesta inmune. En este trabajo encontramos que la inmunización con antígenos de excreción-secreción de larvas musculares, más el bloqueo de la molécula inhibitora CTLA-4 en los linfocitos T, causa una significativa reducción de las larvas del parásito en un modelo experimental murino. De esta forma, queda demostrado que la eliminación del efecto supresor inducido por el helminto da por resultado una respuesta Th2 protectora más potente.

Palabras clave: *Trichinella spiralis*, CTLA-4, vacunas parasitarias.

Introducción

Trichinella spiralis es un nemátodo (Adenophorea: Enoplida) (1) que puede infectar a una amplia variedad de huéspedes vertebrados, incluido el hombre, en muchas zonas del mundo. El ciclo biológico de este parásito tiene características particulares, debido a que las larvas se enquistan en el tejido muscular del hospedero y los adultos habitan en el intestino delgado. La infección del humano se produce por la ingestión de carne poco cocida y embutidos, provenientes de un animal infectado (2). Bajo la acción del jugo gástrico, las larvas son liberadas en el estómago y penetran en los enterocitos del intestino donde se desarrollan hasta adultos en un breve tiempo.

El apareamiento ocurre en el intestino y poco después la hembra libera las larvas que penetran en las vénulas mesentéricas e invaden tejidos y órganos y finalmente van a los músculos esqueléticos, donde se encapsulan y dan lugar a las células nodrizas. La localización intracelular de *T. spiralis* tiene lugar en dos tipos de

tejidos diferentes, en los enterocitos intestinales y en el músculo esquelético del hospedero (3).

La infección primaria con el parásito induce en el huésped una respuesta inmune que no protege necesariamente ante una reinfección. La resistencia a una infección secundaria en cerdos depende de la cantidad de parásitos ingeridos. La infección con más de 25000 larvas musculares induce resistencia completa a la reinfección (4). La falta de una vacuna eficaz capaz de controlar la enfermedad permite que el parásito pueda invadir el tejido muscular del hospedero y así dar lugar al surgimiento de brotes más o menos intensos en muchos países (2).

Algunas de las proteínas de la superficie del parásito, tales como las glicoproteínas de superficie, denominadas de tipo 1 de larvas musculares (en inglés TSL-1), por su interacción con las células inmunes del huésped, así como los productos de excreción-secreción de las larvas (ES-L1) que se encuentran en el tejido muscular han sido evaluados como vacunas. Tales productos

* Profesor e Investigador Titular C, Dr. en Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Biológicas, Coordinador del Laboratorio de Parásitos y Vectores, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México.

participan en la interacción con enterocitos, células musculares y células inmunes del hospedero (5-7). ES-L1 se originan a partir de los gránulos del esticocoma, el orgánulo secretor de las larvas musculares del parásito y está compuesto por 13 glicoproteínas diferentes (8), la mayoría de ellas altamente glicosiladas. La función exacta de la mayoría de estas proteínas está todavía por esclarecer.

El nivel de protección alcanzado por los candidatos vacunales, no ha sido suficiente para el control de la enfermedad (9-11). Basado en estudios en modelos animales, es evidente que *T. spiralis* a través de sus productos ES-L1 desarrolla estrategias de evasión del sistema inmune, modula la respuesta del hospedero y produce un incremento de células T reguladoras e interleuquina (IL) 10 (12) por lo que son necesarias nuevas estrategias para lograr una vacuna efectiva.

La activación de los linfocitos T en la respuesta inmune involucra la interacción entre los péptidos presentes en el complejo mayor de histocompatibilidad clase II de las células presentadoras y el receptor de los linfocitos T, así como otras señales secundarias de las células presentadoras que interactúan a través de otros receptores en los linfocitos T y que actúan como estimuladores positivos o negativos de la respuesta.

La relación entre estimulación e inhibición regula la magnitud y la calidad de la respuesta inmune (13). Por otro lado el bloqueo de la molécula inhibidora CTLA-4 (citotoxic T lymphocyte antigen 4, en inglés) se ha utilizado experimentalmente en el tratamiento de diferentes enfermedades parasitarias, con resultados variables acorde al parásito estudiado y al modelo experimental utilizado (13). Durante la infección por *Trichinella spiralis* aumenta la expresión de CTLA-4 en las células del bazo. El tratamiento con los anticuerpos anti-CTLA-4 resultó en el incremento de los niveles de IgE en suero, un aumento de la producción de IL-4 y en un número menor de parásitos recuperados en tejido muscular (14).

En este estudio evaluamos la eficacia de la inmunización con antígenos ES-L1 de *T. spiralis* junto con el bloqueo de la molécula inhibidora CTLA-4 ante una infección experimental en un modelo murino.

Materiales y Métodos

Se utilizaron ratones Balb/c de 8 a 10 semanas de edad, de peso entre 18 y 20 g, libres de patógenos, suministrados por el bioterio “Claude Bernard” de la Benemérita

Universidad Autónoma de Puebla (BUAP). Los animales se mantuvieron en condiciones de luz y temperatura controladas. Los experimentos con animales fueron aprobados por el Comité de ética, manejo y cuidado de los animales de laboratorio de la BUAP, acorde a la regulación mexicana para estos propósitos (15).

Parásitos y producción de antígenos

La cepa de *T. spiralis* MSUS/ME/92/CM suministrada por el Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológica se mantuvo en ratas Wistar. Las larvas musculares del parásito se recuperaron de las ratas oralmente infectadas 6 semanas después del inicio de la infección, por digestión de la carcasa de los animales con una solución de pepsina, 1 g/100mL en agua acidulada a 37 °C y con agitación constante por 4 h. La eutanasia de las ratas se realizó por inhalación gradual de CO₂.

Después de la recuperación de las larvas musculares, se obtuvieron los antígenos ES-L1. De forma breve: las larvas musculares obtenidas de las ratas se incubaron por 24 h en atmósfera al 95 % de aire y 5 % de CO₂ en medio RPMI 1640 (Gibco, BRL, Grand Island, NY, EUA) adicionado con 100 UI de penicilina y 100 µg/mL de estreptomycinina.

Después de la incubación, se recuperó el sobrenadante y se centrifugó a 10000 g por 1 h para eliminar cualquier partícula. El sobrenadante se concentró utilizando una membrana YM-10 (Amicon, Lexington, EUA) y posteriormente se cuantificó la concentración de proteínas usando el estuche comercial Pierce BCA Protein Assay Kit según las recomendaciones descritas por el fabricante (Thermo Fisher Scientific Inc, EUA) (16).

Protocolo de inmunización de los animales

Se emplearon 4 grupos de 6 animales cada uno. Los ratones del primer y segundo grupo fueron inmunizados con 50 µg de ES-L1 en solución salina tamponada de fosfatos (SSTF): Na₂HPO₄ 3,2 mM; KH₂PO₄ 0,5 mM; KCL 1,3 mM; NaCl 135 mM, pH 7,4; diluido 1:1 (v/v) emulsionado con adyuvante completo de Freund. Se inoculó 0,3 mL vía subcutánea en diferentes sitios del área de inoculación a cada ratón.

Otras dos dosis adicionales fueron administradas a los 7 y 14 días de la dosis inicial, con 50 µg de antígenos en SSTF por igual vía, pero con adyuvante incompleto de Freund. El tercero y cuarto grupo de ratones fueron inmunizados por igual vía, siguiendo el mismo protocolo, con adyuvante completo e incompleto, pero solo con SSTF sin el antígeno.

Tratamiento con el anticuerpo monoclonal anti CTLA-4

Diez días después de la última inmunización, al segundo grupo de ratones (inmunizado con antígenos ES-L1) y al tercer grupo (control inmunizado solo con adyuvante sin antígenos) se les suministró por vía intraperitoneal 250 µg de anticuerpo monoclonal contra CTLA-4 (Hamster Anti-Mouse CD152, BD Pharmingen, 553718, EUA) diluido en 0,4 mL de SSTF, un día antes de reto con los parásitos y una segunda vez, 4 días después del reto.

Reto con parásitos

Once días después de la última inmunización, todos los ratones de los cuatro grupos fueron retados con 300 larvas musculares de la cepa de *T. spiralis* MSUS/ME/92/CM obtenidas de ratas como se describe en la literatura (16). Las larvas se suspendieron en SSTF y se administraron por vía oral con la ayuda de una pipeta de punta adecuada.

A los ratones se les practicó eutanasia por inhalación gradual de CO₂ seis semanas después del reto. El tejido muscular se diseccionó, las larvas musculares se recuperaron mediante digestión artificial con pepsina para la digestión del tejido durante 4 h a 37 °C (1g de pepsina en 100 mL de agua del grifo y acidificada con HCl 0,32 M) (16).

La determinación del número de larvas musculares se realizó microscópicamente con cámara de Neubauer con un objetivo de 100X. La inmunidad protectora se calculó como el porcentaje de reducción de la media de las larvas musculares recuperadas por gramo de músculo de los ratones de los grupos 1, 2, y 3 frente a los del grupo 4, control (17).

Anticuerpos y citoquinas

La respuesta de anticuerpos de clase IgG contra ES-L1 se evaluó en el plasma de los ratones 7 días después de la última inmunización con este inmunógeno (4 días antes del reto) y en el suero se cuantificaron los niveles de IgE, y de IL-4 a los 7 y 40 días después del reto.

El plasma se obtuvo a través de punción retro orbital con el uso de capilares heparinizados. Las muestras de sangre obtenidas se centrifugaron a 1000 g durante 10 min para separar la fracción, que se conservó a -80 °C hasta su evaluación.

Para la cuantificación de IgG se utilizaron placas MaxiSorp, (Nunc, EUA) que se recubrieron con 1 µg/mL de ES-L1 diluido en tampón de recubrimiento (NaHCO₃ 35 mM, Na₂CO₃ 11 mM, pH 9,4-9,6). Estas se incubaron a 37 °C

durante 2 h en cámara húmeda. Posteriormente las placas se lavaron 4 veces con solución de lavado (SSTF+Tween-20 0,05%), se realizó el bloqueo de los sitios inespecíficos con 300 µL por pozo de SSTF con albúmina de suero bovino (Sigma, A 4503, EUA) 2,5 g/100 mL durante 1 h a 37 °C.

Una vez transcurrido el tiempo de bloqueo, se lavaron 4 veces con solución de lavado y posteriormente se adicionaron las muestras de suero de los 4 grupos de ratones, 100 µL por pozo, a una dilución 1:1000 en SSTF+Tween-20 0,05%.

Después de 1h de incubación a 37 °C, en cámara húmeda, se lavaron las placas y se añadió 100 µL por pozo de anti IgG de ratón (Fab específico) conjugado a peroxidasa (Sigma, A2304, EUA), diluido 1:1000 en SSTF+Tween-20 0,05% con albúmina de suero bovino 0,5g/100 mL.

Las placas se incubaron con el conjugado durante 1 h a 37 °C en cámara húmeda, después se lavaron 6 veces y se adicionó para el revelado 100 µL por pozo de orto-fenilenediaminadihidrocloride (Sigma, EUA) y las placas se mantuvieron en la oscuridad a temperatura ambiente durante 30 min.

La reacción se detuvo por adición de 50 µL de solución de H₂SO₄ 2,5 M, y la densidad óptica (DO) se leyó a 492 nm en un lector de micro placas (BioTek Instruments, EUA). Los resultados se expresaron en unidades de DO.

Las determinaciones de IgE e IL-4 se realizaron en el suero de los ratones obtenido por sangrado de la cola a los 7 y 40 días después del reto. La sangre obtenida se incubó a 37 °C durante 1 h y se centrifugó a 1000 g por 10 min para obtener el suero, que se conservó a -80 °C.

Para la determinación de IgE se empleó un estuche comercial (Sigma, RAB0799, EUA), según las recomendaciones descritas por el fabricante, y para la determinación de IL-4 se utilizó un juego de reactivos comercial de la firma Thermo Fisher Scientific (EMIL 4, mouse IL-4 Elisa kit EUA). El experimento completo se realizó dos veces menos la determinación del título de IgG que solo se realizó en uno de los experimentos.

Análisis estadístico

Para los análisis estadísticos se utilizó el paquete de programas SPSS para Windows, versión 17 (SPSS Inc., Chicago, IL). Los datos se expresaron como la media ± la desviación estándar. La normalidad de los datos se comprobó mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov y la homogeneidad de la varianza mediante la prueba de Barlet. Las diferencias entre las medias se determinaron por la prueba t-Student al comparar dos grupos o el

análisis de comparaciones múltiples según la prueba de Tukey, previa comprobación de diferencias entre los grupos mediante un análisis de varianza (ANOVA) de clasificación simple. Las diferencias estadísticas se consideraron significativas para valores a partir de $p \leq 0,05$.

Resultados

Se encontró un elevado título de IgG en los ratones inmunizados con antígenos ES-L1 (grupos 1 y 2) en comparación con los tratados con adyuvante sin el antígeno (grupos 3 y 4). Los resultados se expresan en unidades de DO (Tabla 1).

Después del reto con los parásitos, se observó una reducción del 44 % en la media de la carga parasitaria de larvas musculares en el grupo 1, en comparación con el grupo 4 (control) inmunizados solo con adyuvante, (sin antígenos ES-L1) y no tratado con el anticuerpo monoclonal contra CTLA-4.

El grupo 2, que se inmunizó con antígenos de ES-L1 y administró el anticuerpo monoclonal contra CTLA-4, mostró una reducción de un 92 % de la carga parasitaria, en comparación con el grupo 4 (control) (Tabla 2).

En el grupo 3, inmunizado solo con adyuvante, (sin antígenos ES-L1) y tratado con el anticuerpo monoclonal contra CTLA-4, la reducción de la carga parasitaria de larvas musculares fue de un 47 % en comparación con el grupo 4. Estos resultados muestran que la inmunización con antígenos ES-L1 combinado con el tratamiento con el anticuerpo monoclonal anti CTLA-4 produce una inmunidad protectora significativa contra larvas musculares del parásito. Los grupos 1 y 3 mostraron comportamientos similares a los ya informados en la literatura (10,11,14).

En la tabla 3 se muestran los resultados de las determinaciones de los niveles de IgE, e IL-4 en el suero

Tabla 1. Respuesta de anticuerpos de clase IgG en los ratones inmunizados.

Ratones inmunizados (n=12)	Media	D.E.
con ES-L1	1.04*	0.10
con SSTF	0.11	±0.03

* $p \leq 0.01$

de los ratones después del reto con larvas musculares de *T. spiralis*. El análisis estadístico se realizó comparando los grupos 1, 2 y 3 con el control, en cada tiempo (7 y 40 días).

El grupo 1, inmunizado con antígenos ES-L1 en adyuvante de Freund, no tratado con el anticuerpo monoclonal, no mostró aumento de los niveles de IgE en comparación con el grupo control, en ninguno de los tiempos evaluados.

En los animales del grupo 2 y 3 el aumento en los niveles de IgE a los 7 días fue significativo en comparación con el grupo control (grupo 2 $p=0,028$; grupo 3 $p=0,036$) más significativo en el caso del grupo 2, que mostró niveles elevados tanto a los 7 como a los 40 días ($p=0,009$), este resultado sugiere que la respuesta Th2 incrementada en este grupo se mantuvo estable durante todo el tiempo del experimento.

En el grupo 3 los niveles aumentados de IgE disminuyen a los 40 días, pero siguen siendo significativos al ser comparados con el grupo control ($p=0,030$), lo que permite admitir que en ese grupo, la respuesta Th2 no es tan mantenida como en el grupo 2.

En relación con la IL-4, en los ratones de los grupos 1, 2 y 3 hay incremento significativo en los niveles en el suero de los animales en relación con el control, a los 7 días (grupo 1 $p=0,027$; grupo 2 $p=0,008$; grupo 3 $p=0,025$). A los 40 días, se mantuvo el incremento en

Tabla 2. Larvas musculares de *T. spiralis* recuperadas de los esquemas de tratamiento y reto.

Grupo n=12	Media ± desviación estándar de larvas musculares por gramo de tejido	% de reducción de larvas musculares en comparación con el grupo inmunizado con SSFT
1- Inmunizados con ES-L1	3024 ± 288 *	44 %
2- Inmunizados con ES-L1 y tratados con monoclonal anti CTLA-4	448 ± 506 *	92 %
3- Inmunizados con SSFT y tratados con monoclonal anti CTLA-4	2860 ± 310*	47 %
4- Inmunizados con SSFT	5400 ± 575	

* $p \leq 0,05$

Tabla 3. Valores de IgE e IL-4 en el suero después del reto.

Grupo n=12	IgE, día 7	IgE, día 40	IL 4, día 7	IL 4, día 40
1- Inmunizados con ES-L1	25,6 ± 3,1 ng/mL	12,4 ± 2,9 ng/mL	390 ± 32 pg/mL *	180 ± 23 pg/ml
2- Inmunizados con ES-L1 y tratados con monoclonal anti CTLA-4	85,8 ± 9,2 ng/mL*	78,4 ± 6,7 ng/mL**	978 ± 76 pg/mL**	935 ± 82 pg/mL**
3- Inmunizados con SSFT y tratados con monoclonal anti CTLA-4	48,4 ± 5,5 ng/mL*	27 ± 4,2 ng/mL*	567 ± 61 pg/mL*	413 ± 52 pg/mL*
4- Inmunizados con SSFT	22,2 ± 4,6 ng/mL	10,2 ± 3,2 ng/mL	170 ± 21 pg/mL	168 ± 24 pg/mL

*p<0,05 **p<0,01

los grupos 2 y 3. En el grupo 2 los valores obtenidos son similares a los detectados a los 7 días y el grupo 1 no mostró diferencias significativas con el control (grupo 1 p=0,340; grupo 2 p=0,001; grupo 3 p=0,035).

Discusión

El sistema inmune de los vertebrados ha evolucionado para protegerlos de un amplio repertorio de agentes patógenos, entre ellos los nemátodos. Estos a su vez han desarrollado mecanismos efectivos para regular la respuesta inmune de sus hospederos y para crear un ambiente favorable a la supervivencia del parásito por largos periodos de tiempo (18). La inmunidad contra *T. spiralis* es mediada por una respuesta de tipo Th2, pero estos parásitos promueven mecanismos regulatorios para garantizar su supervivencia, por lo que son necesarias nuevas estrategias para lograr una respuesta inmune que garantice su eliminación (18).

En la búsqueda de una vacuna efectiva contra *T. spiralis* con el empleo de modelos murinos se han utilizado una amplia gama de estrategias que incluyen, entre otros, extractos completos del parásito, productos de excreción-secreción, proteínas recombinantes, péptidos y vacunas de ADN, junto con una amplia variedad de adyuvantes y diferentes vías de administración de los antígenos. Hasta el presente, el grado de protección alcanzado no es suficiente para el control de la enfermedad (5).

Este insuficiente grado de protección, a pesar de la gran variedad de estrategias utilizadas, puede ser causado por la complejidad del ciclo de vida del parásito, la diversidad de antígenos específicos en las diferentes etapas, las estrategias de evasión del parásito y sus efectos moduladores sobre la respuesta inmune del hospedero (18).

La infección con *T. spiralis* se inicia cuando el hospedador ingiere carne cruda o mal cocida, contaminada con larvas musculares enquistadas (2,19) por lo que una reducción de la carga parasitaria de larvas musculares en animales vacunados podría ser una buena estrategia para la eliminación de la transmisión de este parásito. Esta infección cursa con dos grandes etapas: la llamada aguda, o reconocida como intestinal, cuando los adultos copulan en el intestino y liberan larvas al torrente circulatorio; la segunda, llamada también febril, es posterior a los quince días de inicio de la infección y se caracteriza por la formación de células nodrizas en el tejido muscular (2).

Durante la fase intestinal de la infección con el parásito, la respuesta inmune del huésped es mixta, Th1 y Th2. Inicialmente, la infección induce una respuesta Th1, inmediatamente seguida por una respuesta Th2. Una vez el gusano adulto ocupa un nicho dentro de los enterocitos de la mucosa intestinal comienza una respuesta Th2 dominante, caracterizada por la producción de elevados niveles de citoquinas IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 así como IgE y la participación de eosinófilos, basófilos y mastocitos (19).

La fase muscular de la infección se caracteriza por la existencia de una elevada población de células T reguladoras CD4⁺ CD25⁺ y algunas células efectoras Th2 (20).

Estas células modulan la respuesta inmune Th2 del huésped, lo protegen del daño inflamatorio a la vez que permiten el establecimiento de las larvas musculares y la supervivencia del parásito.

Algunos autores han especulado que la estimulación crónica producida por la liberación de antígenos ES-L1 durante la fase muscular de la infección pueda activar las redes de reguladores y estimular la aparición

temprana de la fase de contención de la respuesta inmune adaptativa (6,18).

Este estudio demuestra que la vacunación de ratones con antígenos ES-L1 de *T. spiralis* en combinación con el bloqueo de la molécula inhibidora CTLA-4 (grupo 2) produce una reducción significativa en la carga parasitaria en el músculo de ratones infectados de forma experimental.

Los valores de IgE y de IL-4 encontrados en este grupo, demuestran un reforzamiento de la respuesta Th2, que se mantiene durante todo el tiempo del experimento, al parecer producto del sinergismo entre los dos procedimientos.

El bloqueo de la molécula inhibidora CTLA-4, puede ser importante para superar el reto de este parásito con capacidad intrínseca inmunosupresora, una vez que los gusanos adultos han penetrado en los enterocitos.

Seleccionamos los antígenos de ES-L1 para su empleo como vacuna en este estudio porque son fáciles de obtener y porque con estos antígenos se habían ensayado numerosos adyuvantes y vías para los estudios de inmunoprotección con resultados hasta el presente no satisfactorios (5).

Esta combinación experimental de inmunización y bloqueo pudiera funcionar igual o quizás mejor con otras preparaciones antigénicas y otros adyuvantes, lo que debe ser verificado de manera experimental.

En los grupos 1 (inmunizado con el antígeno y no tratado con el anticuerpo anti CTLA-4) y 3 (no inmunizado y tratado con el anticuerpo monoclonal), los valores de protección son similares a los obtenidos por otros autores (10,11,14).

En el grupo 1 solo encontramos valores significativos en relación al control, no vacunado con ES-L1, en los valores de IL-4 a los 7 días después de la infección, quizás como un indicio de un ligero reforzamiento en la respuesta Th2 en los inicios de la infección, que puede justificar en parte el decrecimiento del número de larvas musculares por una mayor eliminación de adultos en los enterocitos.

En el grupo 3, tratado solo con el anticuerpo monoclonal, encontramos aumento tanto de IgE como de IL-4 a los 7 y los 40 días, lo que justifica el menor número de larvas musculares en este grupo, hecho que ya había sido informado (14).

El hecho de que la infección con *T. spiralis* induce un aumento en la expresión de CTLA-4, podía convertir

a estas moléculas reguladoras en objetivos potenciales para la eliminación de este parásito, sin dejar de tener en cuenta que el bloqueo de estas moléculas puede ser un estímulo potente para las funciones efectoras de las células T y afectar la fase de contención (homeostasis) de la respuesta inmune adaptativa e inducir alguna manifestación de autoinmunidad (13).

Referencias

1. Brusca RC, Moore W, Shuster SM. Invertebrates. Third Edition. Sunderland, MA: Sinauer Associates; 2016.
2. Gottstein B, Pozio E, Nockler K. Epidemiology, diagnosis, treatment and control of trichinellosis. Clin Microbiol Rev 2009;22(1):127-45.
3. Pozio E, Zarlenga DS. New pieces of the *Trichinella* puzzle. Int J Parasitol 2013;43(12-13):983-97.
4. Dea-Ayuela MA, Bolas-Fernández F. Dynamics of the IgG3 responses following immunisation of Balb/c mice with somatic and excretory-secretory antigens from various *Trichinella* species. Folia Parasitol 2000;47(3):172-80.
5. Ortega-Pierres G, Vaquero-Vera A, Fonseca-Liñan R, Bermúdez-Cruz RM, Arguello-García R. Induction of protection in murine experimental models against *Trichinella spiralis*: an up-to date review. J Helminthol 2015;89(5):526-39.
6. Bruschi F, Chiumiento L. Immunomodulation in trichinellosis: does *Trichinella* really escape the host immune system? Endocr Metab Immune Disord Drug Targets 2012;12(1):4-15.
7. Bai X, Wu X, Wang X, Liu X, Song Y, Gao I, et al. Inhibition of mammalian muscle differentiation by excretory secretory products of muscle larvae of *Trichinella spiralis* in vitro. Parasitol Res 2012;110(6):2481-90.
8. Robinson MW, Connolly B. Proteomics analysis of the excretory-secretory proteins of the *Trichinella spiralis* L1 larva, a nematode parasite of skeletal muscle. Proteomics 2005;5(17):4525-32.
9. Gamble HR. *Trichinella spiralis*: Immunization of mice using monoclonal antibody affinity isolated antigens. Exp Parasitol 1985;59(3):394-404.
10. Ortega-Pierres G, Muñiz E, Coral-Vázquez R, Parkhouse RM. Protection against *Trichinella spiralis* induced by purified stage-specific surface antigens of infective larvae. Parasitol Res 1989;75(7):563-7.
11. Dea-Ayuela MA, Rama-Iñiguez S, Bolas-Fernandez F. Vaccination of mice against intestinal *Trichinella spiralis* infections by oral administration of antigens microencapsulated in methacrylic acid copolymers. Vaccine 2006;24(15):2772-80.
12. Gruden-Movsesijan A, Ilic N, Mostarica-Stojkovic M, Stosic-Grujicic S, Milic M, Sofronic-Milosavljevic L. Mechanism of modulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by chronic *Trichinella spiralis* infection in Dark Agouti rats. Parasite Immunol 2010;32(6):450-9.
13. Lepenies B, Jacobs T. The role of negative costimulators during parasitic infection. Endocr Metab Immune Disord Drug Targets 2008;8(4):279-88.

14. Furze RC, Culley FJ, Selkirk ME. Differential roles of the costimulatory molecules GITR and CTLA-4 in the immune response to *Trichinella spiralis*. *Microbes Infect.* 2006;8(12-13):2803-10.
15. NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Ciudad de México: Diario Oficial de la Federación; 2001.
16. De la Rosa-Arana JL, Campos-Rodríguez R, Rivera-Aguilar V, Escobar-Gutiérrez A, Miliar-García A, Herrera-González NE, et al. Comparative effects of levamisole, *Staphylococcus*, and Freund's adjuvant on rat immunization with excretory and secretory antigens of *Trichinella spiralis* muscle larvae. *Parasitol Res* 2012;111:1599-605.
17. Wang ZQ, Cui J, Wei HY, Han HM, Zhang HW, Li YL: Vaccination of mice with DNA vaccine induces the immune response and partial protection against *T. spiralis* infection. *Vaccine* 2006;24(8):1205-12.
18. Hewitson JP, Maizels RM. Vaccination against helminth parasite infection. *Expert Rev Vaccines* 2014;13(4):473-87.
19. Bruschi F., Gómez-Morales MA. The translational immunology of trichinellosis: from rodents to humans. En: Jirillo E, Magrone T, Miragliotta G. Immune response to parasitic infections: Immunity to helminths and novel therapeutic approaches. Sharjah, United Arab Emirates: Bentham Science Publishers; 2014. p.125-61.
20. Beiting DP, Gagliardo LF, Hesse M, Bliss SK, Meskill D, Appleton JA. Coordinated control of immunity to muscle stage *Trichinella spiralis* by IL 10 regulatory T cells and TGF β . *J Immunol* 2007;178(2):1039-47.

Immunization with excretion-secretion products of *Trichinella spiralis* combined to CTLA-4 blockade produces a high degree of protection against a challenge with the parasite

Abstract

Different approaches to vaccination against *T. spiralis* using murine experimental models have been used, but the levels of protection observed in most experimental trials may not be sufficient to provide a good disease control. There is increasing evidence that inhibitors molecules on T cells are critically involved in the regulation of immune response against helminths infections, thus negative stimulators represent possible drug targets since their blockade leads to an increased immune response. Moreover, it has been reported that immunization with excretory-secretory products of *T. spiralis* muscular larvae could provide partial protective immunity against parasite infection. *T. spiralis* induce a population of cells with elevated levels of known markers of T regulatory, manipulation of which influences the immune response and parasite load. In the present work we found that immunization with muscle larvae excretory secretory products of *T. spiralis* and blockade of CTLA-4 displayed remarkable high reduction of muscle larvae burdens in a murine model, showing that elimination of suppressive regulatory pathways results in a more potent and protective response which reduces muscle larval establishment.

Keywords: *Trichinella spiralis*, CTLA-4, immune response.

Recibido: Noviembre de 2016

Aceptado: Enero de 2017